

Rassegna

Review

Leptospirosi: aspetti epidemiologici, diagnostici e clinici, *Leptospirosis: epidemiology, diagnosis and clinical aspects*

Rosario Russo, Giovanna Panarello

Istituto di Malattie Infettive, Università degli Studi di Catania

Le leptospire sono batteri aerobi, Gram negativi, appartenenti al genere *Leptospira*, famiglia *Leptospiraceae*, ordine *Spirochetales*; sono batteri sottili (5-15µm x 0.1-0.2µm) spiraliiformi, estremamente mobili in virtù di un peculiare apparato locomotore costituito da uno o più fasci di fibrille siti entro il corpo cellulare. Il ridotto diametro trasverso, al limite del potere di risoluzione della microscopia ottica, ne consente l'osservazione solo previo utilizzo di metodiche di sovracolorazione (impregnazione argentica) o ricorrendo all'osservazione in campo oscuro. Le leptospire sono le sole spirochete patogene coltivabili in terreni acellulari.

La tassonomia delle leptospire si basa attualmente su due distinte modalità classificative: una genomica, l'altra antigenica: la classificazione genetica consente una organizzazione a livello di specie, quella sierologica a livello di varianti sierologiche (serovar) e di sierogruppi; pertanto ceppi sierologicamente indistinguibili possono appartenere a specie totalmente diverse dal punto di vista genomico.

La tipizzazione genomica si avvale della metodica di ibridazione delle sequenze desossiribonucleotidiche, dell'uso in PCR di sonde-DNA specie-specifiche o, anche, dell'analisi delle sequenze geniche del rRNA. Il termine specie individua i ceppi la cui analisi genomica evidenzia una omogeneità superiore al 70%, con una divergenza inferiore al 5% [1].

La tipizzazione antigenica si avvale soprattutto del Micro-agglutination test (MAT), il più valido e più frequentemente impiegato, o dell'Agglutinin-absorption test [2, 3]. Sistemi alternativi per la identificazione dei serovar si basano sull'impiego di Ab monoclonali [4], della factor analysis [5] e della gel-elettroforesi (PFGE) [6]. Il serovar costituisce la base tassonomica della classificazione antigenica dei ceppi batterici [7]; due ceppi vengono considerati appartenenti a serovar differenti se, dopo assorbimento crociato con adeguate

quantità di siero eterologo, più del 10% dei titoli omologhi rimangono, in test ripetuti, in almeno uno dei due antisieri [8]. Il sierogruppo non ha invece, validità tassonomica, ma esclusivamente pratica, accomunando un insieme di serovar con analoghe caratteristiche antigeniche.

La speciazione su base genomica ha portato alla individuazione di 13 specie, entro le quali si riconoscono più di 300 serovar; in entrambi i sistemi classificativi viene, comunque, riconosciuta e mantenuta la distinzione (biochimicamente definita) tra specie saprofiti e specie patogene: le leptospire saprofiti sono: *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, *L. parva* e *L. illini*; le specie patogene: *L. interrogans* s.s., *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. inadai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. kirshneri*, *L. fainii*; nell'ambito delle specie patogene si identificano 24 distinti sierogruppi.

Le semplici esigenze nutrizionali delle leptospire ne consentono la sopravvivenza per molti giorni, al di fuori dell'ospite, in adeguate condizioni ambientali di pH (7.2-7.6) umidità e temperatura (28-30°C); sono facilmente distrutte da essiccamento, esposizione a disinfettanti e detergenti e calore a 50°C per 5 min [9].

L'infezione colpisce ubiquitariamente un'ampia varietà di animali selvatici e domestici che, tramite eliminazione urinaria, divengono responsabili della disseminazione delle leptospire nell'ambiente, per molto tempo dopo l'infezione, in assenza, spesso, di alcuna manifestazione clinica [10]. I roditori sono i più importanti serbatoi, con una frequenza che può raggiungere il 50% per *Rattus norvegicus* [11]; gli animali domestici, il bestiame da allevamento, gli equini svolgono un ruolo epidemiologico di importanza crescente.

Le leptospirosi umana è meno frequente e la sua epidemiologia dipende, spesso, dall'animale serbatoio [12]; l'uomo contrae l'infezione in seguito al contatto diretto o indiretto con gli animali infetti: la cute abrasa, le mucose rinofaringee, la congiuntiva costituiscono la via d'ingresso per le

leptospire contaminanti suoli fangosi o raccolte d'acqua dolce, in seguito ad immersione anche parziale; l'ingestione di acqua contaminata è ormai certo possa costituire una ulteriore modalità di contrarre la leptospirosi (Pietracuta 1984, Costa Rica 1996) [13, 14].

Anche l'uomo, superata l'infezione, rimane escrettore urinario delle leptospire per un lasso di tempo non definito, ma il suo potenziale ruolo epidemiologico in zone rurali con carenti condizioni igienico-sanitarie è da valutare, anche in considerazione dell'ampiezza del serbatoio animale [15]; non si può, per contro, escludere che l'uomo malato, durante la fase di leptospiremia, possa avere un ruolo nella trasmissione della leptospire, al personale sanitario di assistenza [16].

Le modalità di circolazione delle leptospire ancora una volta marcano un confine tra paesi industrializzati con moderne abitudini di vita, ove la leptospirosi umana è rara e limitata a particolari gruppi, a rischio per attività ricreative o per modalità abitative, e paesi sottosviluppati, economicamente dipendenti dall'attività agricola e dall'allevamento di bestiame [17]. Nelle zone a clima temperato casi sporadici e/o piccole epidemie di leptospirosi si verificano con un andamento stagionale, caratterizzato da incidenza massima nei mesi più caldi e piovosi; nei paesi tropicali, invece, il clima caldo-umido fornisce una delle condizioni ambientali essenziali per la crescita delle leptospire, favorendone l'endemicità con frequenti riaccensioni epidemiche. Locali differenze climatiche, ambientali e socio-economiche condizionano il quadro epidemiologico; la naturale creazione di ecoambienti particolari può talvolta creare le basi per la diffusione delle leptospire; la sorprendente registrazione di un crescente numero di casi di leptospirosi urbana in assenza di un riconoscibile rischio occupazionale o ricreazionale si spiega con la precarietà delle condizioni abitative ed igienico-sanitarie che facilitano la proliferazione di ratti, serbatoio della siero-varietà *L. interrogans* [18]. Stabilire un legame etio-epidemiologico tra i serovar ottenuti da campionamento ambientale (acqua, fango, animali domestici e selvatici), animali serbatoio e patologia umana può essere estremamente difficile. Studi epidemiologici hanno evidenziato un'associazione tra l'infezione da serovar *L. grippityphosa* e il possesso di cani, da *L. australis* e lo stretto contatto con i bovini, da *L. canicola* e l'abitudine a bagnarsi in pozze d'acqua naturali [19]; negli USA l'esposizione indiretta (tramite acqua e suolo contaminati dalla popolazione murina) dei cavalli ai serovar

L. icterohaemorrhagiae, *L. grippityphosa* e *L. canicola* giustifica l'elevata incidenza di leptospirosi tra soggetti a contatto con la popolazione equina [20]; la leptospirosi canina da *L. grippityphosa* e *L. pomona* è spesso responsabile di casi sporadici in ambiente urbano [21]. In Italia, negli anni '50-'60, quando la leptospirosi era una malattia professionale legata soprattutto alla risicoltura, la sua elevata frequenza era sostenuta dalla associazione del serovar *L. icterohaemorrhagiae* con roditori del genere *Rattus* (aree periferiche ai campi di riso) e del serovar *L. bataviae* con topi del genere *Micromys* (entro i campi di riso) [22, 23]; negli anni '70 le modifiche delle condizioni ambientali e delle attività agricole, nonché l'acquisita resistenza ai preesistenti serovar, hanno favorito l'emergenza di nuovi serovar (*L. poi*) [24]; negli anni '80-'90 il progressivo incremento dei casi sostenuti da leptospire del gruppo *L. australis* è da attribuire alla crescente frequentazione da parte dell'uomo, a scopo ricreativo, delle zone boschive invase dal riccio che funge da reservoir; analogamente nei campi e nei prati l'uomo è esposto al contatto con il topo campagnolo *Mus musculus*, serbatoio di leptospire del gruppo *L. sejroe* [24].

Nei paesi meno sviluppati o nelle aree tropicali la leptospirosi, per la sua ampia diffusione, deve essere considerata una malattia ambientale piuttosto che professionale, anche se l'attività agricola o l'allevamento del bestiame rappresentano fattori di rischio addizionali [25, 26]; l'esposizione ad acque alluvionali, contaminate dall'urina di animali infetti può scatenare l'esplosione di epidemie [27]; le strade, spesso allagate e con estesa popolazione murina, delle grandi città dell'Estremo Oriente offrono le condizioni ideali per la diffusione delle leptospire; l'estesa epidemia dell'ottobre 1995 in Nicaragua (2000 casi di cui 40 morti per emorragia polmonare e/o insufficienza respiratoria acuta) dopo recente alluvione [28], ed i casi verificatisi dopo il passaggio dell'uragano Mitch nel 1998 (Honduras, Guatemala, Nicaragua) ne sono una inconfutabile conferma [29].

Dagli anni '70 in tutti i paesi industrializzati si è assistito [15] alla progressiva riduzione del rischio professionale (addetti alla pulizia delle fogne, minatori, pescatori, veterinari, addetti alla macellazione), con incremento del rischio legato ad attività ludiche (canottaggio, nuoto in raccolte d'acqua naturali, caccia, trekking) o a particolari condizioni ambientali in ambito domestico (precarie condizioni igienico-sanitarie favorevoli lo sviluppo della popolazione murina, il

cattivo uso di sistemi di raccolta dell'acqua piovana, il contatto con animali domestici) [30, 31]. Negli USA vengono notificati annualmente circa 100-200 casi, il 50% dei quali nelle Hawaii; la malattia si presenta in forma sporadica, con occasionali epidemie, spesso in ambito ricreativo, come accaduto nel luglio '98 ad atleti partecipanti a competizioni di triathlon in Illinois e Wisconsin, a causa della immersione in acque dolci [32]. In Gran Bretagna, per la crescita della popolazione murina nelle tenute, il contatto con gli animali rende ancora oggi gli agricoltori e i coltivatori i gruppi occupazionali maggiormente a rischio [33]; i serovar più frequentemente in causa sono *L. hardjo* (bestiame di allevamento) e *L. icterohaemorrhagiae*; l'assenza del serovar *L. canicola* sin dal 1985 potrebbe essere attribuita alla immunizzazione canina [9].

In Italia, dagli anni '70, si è osservata una progressiva riduzione di incidenza, con marcata riduzione dei casi in ambito professionale (*L. bataviae*, *L. icterohaemorrhagiae*), ed aumento di quelli legati alle attività ricreative (*L. javanica*, *L. canicola*, *L. australis*, *L. hebdomadis*, *L. pomona*, *L. pyrogenes*); *L. poi*, *L. bratislava* e *L. lora* sono risultati i serovar emergenti; negli anni '80 una epidemia legata alla contaminazione di acqua potabile, verificatasi a Pietracuta, piccolo centro in provincia di Pesaro, fu attribuita a *L. bratislava* del sierogruppo *L. australis* [13], responsabile, peraltro, di un numero crescente di casi sporadici in altre aree; negli anni '90, oltre a *L. javanica* (*L. poi*) e *L. australis*, prevalgono i serovar appartenenti al sierogruppo *L. sejroe* [17].

La diffusione delle infezioni da leptospire risulta, fin dagli ultimi anni '80, ben più ampia di quanto i casi clinicamente manifesti facessero presupporre (Veneto 40.3%, Lombardia 26.6%), con circolazione silente anche in regioni con casi clinici relativamente rari (Calabria 4.4%, Sicilia 13.2%); la leptospirosi sembra, quindi, caratterizzata da diverse modalità di circolazione: ampia diffusione di "leptosirosi minori", da ceppi a bassa virulenza (*L. sejroe*, *L. australis* e *L. javanica*), più contenuta circolazione delle "leptosirosi maggiori", da ceppi ad alta virulenza, quali serovar dei sierogruppi *L. icterohaemorrhagiae* e *L. canicola* [24].

Nell'ultima decade in Italia sono stati notificati circa 80 casi/anno, il 75% dei quali in Veneto, Lombardia e Piemonte, con picco di incidenza nella stagione estivo-autunnale; prevalentemente colpito il sesso maschile (93%) tra i 20-50 anni. Il rischio occupazionale ha subito un progressivo decremento (20% dei casi) a confronto

con il crescente rischio legato alle attività ricreative (18%) e alle cause accidentali (14%); persiste un'ampia quota (48%) per la quale non è identificabile la modalità di esposizione [17].

La periodica variazione, con cadenza approssimativamente decennale, dei serovar più frequentemente responsabili di leptosirosi animale ed umana potrebbe essere correlata a variazioni nelle abitudini lavorative e di vita delle popolazioni con conseguenti contatti con nuovi ecosistemi contenenti nuovi serovar; tuttavia, anche uno stato immunitario, progressivamente sviluppatosi negli animali serbatoio, potrebbe favorire la diffusione dei nuovi serovar: esperimenti *in vivo* dimostrano che una popolazione animale infetta produce una progenie resistente al serovar infettante, creando così le basi per la diffusione di serovar nuovi [34].

La patogenesi della malattia nell'uomo riproduce la bifasicità che ne caratterizza l'andamento clinico. Penetrate attraverso soluzioni di continuità della cute, mucose orofaringee o congiuntive, le leptospire patogene invadono rapidamente il circolo ematico, raggiungendo tutti i distretti dell'organismo, inclusi il SNC e l'umore acqueo, e dando luogo ad una prima fase setticemica con i sintomi tipici di un processo infettivo sistemico. La seconda fase, con le localizzazioni d'organo e i sintomi ad esse correlabili, si attua in un particolare terreno immunologico, con il progressivo incremento, a titolo sempre maggiore, degli anticorpi specifici e la progressiva scomparsa delle leptospire dal sangue. Ciò che più sorprende è l'estremo contrasto tra la gravità dei sintomi delle forme più gravi e la paucità delle alterazioni istopatologiche, il che farebbe supporre un'azione tossica confinata a livello subcellulare. Da recenti indagini immunoistochimiche emerge l'importanza dell'azione tossica diretta esercitata inizialmente dalle leptospire integre e, successivamente, dal materiale antigenico, prodotto della loro degradazione ad opera dei macrofagi; l'azione lesiva si estrinseca nei confronti di tutte le membrane cellulari, in virtù di una rilevante affinità degli antigeni batterici per le proteine di membrana. La specificità dell'adesione e dell'invasione delle cellule epiteliali ed endoteliali sono state confermate *in vitro* quali proprietà esclusive delle leptospire patogene [35]. L'invasione si attua tramite un processo di endocitosi recettore-mediata, per il quale è irrinunciabile l'integrità e la vitalità (motilità) delle stesse leptospire [36]. L'accumulo intracellulare sarebbe all'origine del danno funzionale, forse identificabile con la inibizione della Na-, K-

ATPasi di membrana ad opera della frazione glicoproteica della membrana cellulare delle leptospire patogene [37]; altri enzimi cellulari, in relazione all'organo/tessuto interessato, potrebbero essere il potenziale bersaglio dell'azione tossica; indagini in vivo hanno dimostrato, in ratti sperimentalmente infettati, l'alterazione dell'attività della G6PD microsomiale epatica [38]. Tale processo patogenetico esteso a tutte le membrane cellulari sarebbe responsabile delle alterazioni funzionali e, solo secondariamente, strutturali che esitano in necrosi. Indagini *in vitro* hanno evidenziato la capacità, esclusiva dei ceppi virulenti, di indurre l'apoptosi delle cellule invase; è da valutare se in vivo le cellule dei tessuti bersaglio subiscano una analoga induzione di "morte programmata" [39, 40]. La leptospirosi andrebbe, quindi, rivista come una patologia che colpisce tutte le membrane cellulari: infatti, il legame di leptospire ancora integre o di loro antigeni alle cellule dell'epitelio tubulare del rene, ai macrofagi, alle cellule endoteliali di tutti i distretti capillari giustificerebbe il quadro clinico sistemico [41, 42, 43].

Sebbene un'azione tossica diretta esercitata dalle leptospire circolanti sia stata definitivamente confermata, molte delle manifestazioni sistemiche, che si verificano soprattutto negli stadi più tardivi della malattia, potrebbero conseguire ad un meccanismo indiretto mediato dalla partecipazione del sistema immune: la persistenza del materiale antigenico in alcuni tessuti, per lungo tempo dopo la clearance delle leptospire vive, potrebbe perpetuare un processo infiammatorio responsabile di un quadro clinico molto simile a quello riscontrabile in una patologia da immunocomplessi.

Si è ipotizzato, inoltre, che il peptidoglicano delle spirochete o una sostanza endotossino-simile, liberata in seguito alla lisi della parete cellulare, possa indurre il rilascio del TNF- α e di altre citochine, responsabili delle manifestazioni della sepsi. Elevati livelli plasmatici di TNF- α sono stati associati anche con un più grave coinvolgimento renale, epatico, polmonare così come con una più spiccata tendenza al sanguinamento e una maggiore mortalità, per cui i livelli della citochina circolante potrebbero essere assunti quale potenziale indice prognostico; non si può escludere, pertanto, l'eventualità del duplice ruolo svolto dal TNF- α , cioè l'azione difensiva in fase iniziale che diviene successivamente lesiva [44].

Le leptospire sono in grado di eludere la risposta immune specifica e non: a) inducendo l'apop-

tososi dei macrofagi dai quali sono state fagocitate; b) colonizzando siti privilegiati dove il sistema immune è meno efficiente (tubuli prossimali del rene, umor acqueo); c) inducendo nell'ospite uno stato di tolleranza immunologica tale da prevenire o modulare la reazione immune [45]. La leptospirosi si presenta sotto forma di malattia febbrile acuta sistemica dalle manifestazioni cliniche proteiformi, essenzialmente conseguenti ad una vasculite generalizzata.

Il periodo di incubazione varia da 2 a 30 giorni, con una latenza media di 5-10 giorni. L'esordio clinico è sovrapponibile per tutti i tipi di leptospirosi, indipendentemente dal sierotipo in causa e dal successivo decorso, che è, invece, influenzato dal serovar responsabile, dall'età, dallo stato di salute del paziente e dalla tempestività del trattamento.

La malattia nell'85-90% dei casi si presenta sotto forma sistemica-autolimitantesi, in meno del 10% dei casi come sindrome grave e potenzialmente fatale; anche serovar tipicamente più virulenti (*L. icterohaemorrhagiae*, *L. bataviae* e *L. copenhageni*) sono più frequentemente responsabili di forme non gravi. Le infezioni subcliniche e inapparenti sono frequenti.

Nel decorso caratteristicamente bifasico si susseguono una fase setticemica (o leptospiremica) ed una fase di patologia d'organo, che spesso, tuttavia, risultano non facilmente distinguibili. La fase setticemica, la sola riconoscibile nelle forme lievi, dura circa 4-7 giorni e si manifesta con improvvisa ascesa della temperatura corporea (39-40°C), cefalea, mialgie, rachialgie, astenia, ipotensione e bradicardia, lieve alterazione della funzionalità renale ed epatica; si associano, talvolta, rigidità nucale, iperemia congiuntivale, transitorio rash, esteso a cute (tronco e addome) e mucose, che può esitare in esantema morbilliforme, più raramente petecchiale; frequenti l'iperemia del faringe e la faringodinia; le mialgie dominano l'intero decorso della malattia; più rara l'artrite.

Questa fase esita in guarigione completa o solo in temporaneo benessere, seguito, dopo alcuni giorni, dai sintomi propri della cosiddetta fase tissutale: ricomparsa della febbre con cefalea grave, rigidità nucale, brividi, prostrazione, segni e sintomi di insufficienza epatica e renale, segni di flogosi meningea, nonché tendenza ad emorragie. Le leptospire non sono più reperibili nel sangue, ma continuano ad essere eliminate con le urine. Si possono osservare anche quadri clinici a carico del tratto g.e. (nausea con o senza vomito, ma anche colecistite alitiasica o

appendicite), dell'apparato respiratorio polmonare (tosse secca, infiltrati polmonari, emoftoe), del miocardio. La guarigione si ottiene in 6-12 settimane; nei casi fatali il decesso è dovuto a insufficienza renale, cardiaca o, sempre più frequentemente, respiratoria.

Nell'80% dei casi, anche più blandi, si riscontrano segni di alterata funzionalità renale: microematuria, leucocituria, cristalluria, proteinuria, mioglobinuria; modeste iperazotemia e ipercreatinemia sono conseguenti alla disidratazione e all'ipermetabolismo tipici di tutte le malattie altamente febbrili [46]. L'insufficienza renale acuta è complicanza tipica delle forme più gravi di leptospirosi, può decorrere in forma oligurica [47], ma, più spesso, predomina un difetto di concentrazione con poliuria e conseguente perdita di liquidi ed elettroliti; il riscontro di una marcata oliguria deve, quindi, essere interpretato come un segno prognostico negativo. L'azione tossica diretta delle leptospire nonché l'ineadeguata perfusione (ipovolemia, aggravata dalle emorragie, ipotensione, da compromissione miocardica) espongono il tubulo renale ad uno stress ipossico che può esitare in necrosi tubulare acuta. Negli stadi più tardivi non è infrequente il riscontro di lesioni flogistiche dei glomeruli renali, quali depositi di complemento e di corpi elettrondensi, ma senza Ig [48]. Non si può escludere che casi di IRA, soprattutto da *L. grippotyphosa*, possano essere conseguenti ad una coinfezione da Hantaanvirus, che condividono, in alcune aree geografiche lo stesso serbatoio animale (topi di campo) [49].

L'infezione sostenuta da alcuni serovar (*L. icterohaemorrhagiae*) sembra più frequentemente associata ad importante coinvolgimento epatico, benché dati ematochimici indicativi di compromissione epatica (ipoalbuminemia, iperglobulinemia, riduzione dei fattori della coagulazione Vit-K dipendenti, modico aumento di transaminasi e γ -GT) siano costanti. Nei pazienti itterici, l'iperbilirubinemia compare intorno al 4°-6° giorno di malattia, riducendosi alla defervescenza; o permanendo, nelle forme più gravi, per mesi. Essa è causata prevalentemente da danno epatocellulare focale con rilevante colestasi intraepatica, e, solo in minima parte, dall'emolisi che si verifica nelle aree di emorragia. All'esame istologico si evidenziano marcate alterazioni dimensionali di isolati epatociti a sede medio-centro-lobulare, fenomeni di degenerazione balloniforme e/o grassa, costante formazione di corpi acidofili, trombi biliari. Il quadro istopatologico non giustifica, tuttavia, l'en-

tità della iperbilirubinemia. Clinicamente un incremento dei livelli di bilirubina con valori normali (o solo lievemente alterati) di transaminasi è fortemente suggestivo di leptospirosi.

Le forme più gravi di leptospirosi sono caratterizzate da diatesi emorragica generalizzata con sanguinamento, più frequentemente dal tratto g.e. o respiratorio. Nonostante la deplezione di alcuni fattori della coagulazione e la costante trombocitopenia, la patogenesi delle manifestazioni emorragiche è più probabilmente legata al danno endoteliale, sia indotto da prodotti batterici che mediato da citochine. La trombocitopenia, quindi, non sarebbe causa diretta della coagulopatia, ma conseguenza di una compartimentalizzazione nel distretto capillare [42].

L'ingresso delle leptospire nel liquor, negli stadi più precoci della fase setticemica, causa solo una modica reazione infiammatoria, documentata da un lieve aumento della pressione liquorale; i classici segni della sindrome meningea compaiono nella seconda settimana di malattia, durante la fase tissutale. Il liquor, di aspetto limpido, si presenta a pressione aumentata con iperproteinorachia, pleiocitosi (prima granulocitica, quindi linfocitica) e glicorachia normale [30]. L'eventuale comparsa di edema cerebrale non è conseguenza diretta di lesioni neurologiche, ma complicanza della terapia di supporto impiegata per il trattamento dell'IRA.

Una tardiva complicanza da *L. pomona*, è la panarterite cerebrale, malattia occlusiva dei vasi cerebrali (carotide interna), responsabile dei casi di ischemia cerebrale e di infarti soprattutto in bambini [50]. Alterazioni psichiatriche sono state descritte quali complicanze tardive, senza alcun rapporto con le manifestazioni neurologiche della fase acuta; esse sono di intensità variabile (da lievi alterazioni dell'umore sino a vere e proprie sindromi depressive) e possono persistere mesi o anni [51].

Nel 20-70% dei casi si riscontrano alterazioni respiratorie minori; manifestazioni respiratorie gravi (emorragie alveolari ed interstiziali con emottisi, edema polmonare e ARDS), sono, tuttavia, riportate sempre più frequentemente [52], soprattutto in epidemie del sud-est asiatico [53, 54] o del centro-America [28].

Il riscontro sempre più numeroso di casi dal decorso atipico e, spesso, grave, dominato dalle manifestazioni emorragiche, dall'insufficienza respiratoria, dall'insufficienza renale, inficia la validità della tradizionale classificazione della leptospirosi nelle forme anitterica, autolimitante, e itterica, grave; l'assenza dell'ittero non

consente affatto di escludere un decorso grave e potenzialmente fatale. Maggiore praticità acquista, quindi, la distinzione delle forme cliniche più frequentemente riscontrate sulla base dei segni e sintomi dominanti il singolo caso: sindrome similinfluenzale (11%), meningea (8%), meningo-renale (3%), renale (7%), epatica (12%), epato-renale (11%), meningo-epato-renale (45%), epato-meningea (2%), polmonare (1%). Domina il quadro il frequente coinvolgimento renale [17]. La prognosi è condizionata dal quadro clinico; generalmente favorevole nelle forme febbrili similinfluenzali e nella meningite, diviene seria nei casi caratterizzati da grave interessamento epato-renale e/o polmonare. La tempestività del trattamento chemioantibiotico è essenziale per un esito favorevole, ma, nonostante i benefici clinici, la terapia antibiotica non sempre è in grado di influenzare il tasso di mortalità. Tra i fattori in grado di influenzare la prognosi, il buono stato di salute preesistente [55] e l'età infantile [56] sembrano determinanti; clinicamente una leucocitosi >13000/mm³, l'oliguria, la dispnea, le turbe della ripolarizzazione e gli infiltrati alveolari vanno interpretati come fattori prognostici negativi [55].

La dimostrazione di leptospire patogene nei fluidi corporei o nei tessuti è la sola metodica che fornisca evidenza inequivocabile di infezione attiva. Per la coltura del germe lo stadio dell'infezione è critico: durante la fase acuta, leptospiremia, che dura pochi giorni, le leptospire possono essere coltivate dal liquor o dal sangue, da cui, tuttavia, scompaiono con l'avvento della specifica risposta anticorpale (7°-10° giorno di malattia); nella seconda settimana inizia la eliminazione urinaria delle leptospire, che può persistere per 4-6 settimane, talvolta, persino per mesi [57], spesso in forma di batteriuria intermittente; la coltura, tuttavia, ne risulta particolarmente difficile, causa la ridotta sopravvivenza dei germi nelle urine acide dell'uomo.

Metodi alternativi di ricerca delle leptospire nei campioni biologici (immunofluorescenza [58, 59], immunoperossidasi [60], ibridazione del DNA [61]) si sono dimostrati insoddisfacenti per la scarsa sensibilità che ne vanifica l'utilità ai fini di una diagnostica di routine. La PCR utilizza come target il set di oligonucleotidi contenuti entro la sequenza rrs specifica del genere *Leptospira* e presente nel gene codificante per la subunità ribosomiale 16S; si dispone, in tal modo, di un sistema altamente sensibile e specifico per la individuazione del genoma delle leptospire, ma senza distinzione alcuna tra specie patogene

e non, il che, tuttavia, non ha conseguenze pratiche dato che le leptospire saprofiti non sono generalmente trovate nei campioni umani. La PCR garantisce una sensibilità superiore a quella offerta dalle tecniche microbiologiche: in urine, sangue e liquor sino a 10 batteri possono essere evidenziati; anche la rapidità dell'isolamento è superiore rispetto a quanto ottenibile con la coltura: 1 giorno vs 1-8 settimane [10]. Mentre la PCR su siero e/o liquor sarebbe utile solo nei primi 10 giorni di malattia [62], l'analisi in PCR delle urine costituisce una buona alternativa per la prolungata eliminazione urinaria e perché in grado di positizzarsi anche in presenza di batteri morti; poiché i pazienti cominciano ad eliminare, seppur in minima quantità, le leptospire con le urine in uno stadio precoce, l'analisi in PCR potrebbe consentire di giungere alla diagnosi rapidamente, con tempi inferiori rispetto alla sierologia che acquista valore solo dopo la prima settimana [63]; le urine possono essere raccolte anche in quantità considerevoli, consentendo così di superare i problemi di sensibilità legati al numero di leptospire realmente presenti nel campione. Un ulteriore vantaggio della PCR rispetto ai test sierologici è la possibilità di evitare le false positività legate alla cross-reattività delle leptospire con *Borrelia burgdorferi* [64]. Resta da valutare se la amplificazione in PCR possa essere impiegata con efficienza routinariamente, soprattutto in quelle zone in cui è presente in forma endemica.

Al di là della capacità di individuazione del genoma delle leptospire, la PCR fornisce anche la possibilità di distinguere le diverse specie qualora vengano impiegate come sequenza target delle sequenze specie-specifiche [65]. Ancora sperimentale è il tentativo di una ulteriore specificità della PCR tale da cogliere la variabilità genetica esistente tra i diversi serovar [66, 67].

I test sierologici sono di scarso ausilio per il paziente, in quanto raramente consentono di giungere alla diagnosi con precocità tale da influenzare la terapia [68]; essi sono, quindi, appropriati solo per confermare un iniziale sospetto clinico e non per guidare la decisione se iniziare o meno il trattamento [9]; inoltre, il trattamento antibiotico precoce, inibendo la risposta anticorpale, inficia il valore predittivo di un test negativo [69].

Nel sospetto clinico di leptospirosi il più rapido presidio diagnostico è il test di agglutinazione rapida su vetrino (MACROSCOPIC SLIDE TEST): ad occhio nudo viene valutata l'agglutinazione su vetrino, cimentando il siero del paziente con un pool antigenico ottenuto da serovar di

leptospire uccise localmente prevalenti [70]. Il test è valido soltanto nelle infezioni in atto o recenti e impone sempre il ricorso ad un ulteriore test di conferma. Il test di agglutinazione microscopica (MICROSCOPIC AGGLUTINATION TESTMAT) è il metodo di laboratorio di riferimento, a scopi diagnostici, epidemiologici e classificativi; utilizzando, quale materiale antigenico, leptospire vive, garantisce una maggiore sensibilità e specificità; il titolo anticorpale raggiunge i valori massimi in 3^a-4^a settimana, decrescendo successivamente, ma permanendo a lungo positivo a basso titolo a dimostrazione della pregressa infezione [8]. La necessità di leptospire vive compromette, però, la praticità del metodo, imponendo la disponibilità di colture recenti per ciascuno dei ceppi locali. I risultati del MAT possono essere falsati dalla concentrazione di leptospire vive nella sospensione (2×10^8 leptospire/ml), dalle proprietà morfo-dimensionali delle leptospire impiegate, dalla eventuale esclusione del serovar responsabile dal pool di leptospire vive, dalla comparsa di "anticorpi paradossi" (fenomeno frequente soprattutto nelle prime settimane di malattia e consistente nella produzione di anticorpi diretti verso serovar diversi da quello responsabile dell'infezione) [71].

Un test immunoenzimatico (ELISA) consente la individuazione delle IgM specifiche già in 3^a-4^a giornata di malattia; pur essendo sufficientemente sensibile e specifico [72], il test va impiegato come indagine di screening e impone comunque una conferma mediante MAT. Il ricorso al dot-ELISA amplia il range di classi immunoglobuliniche includendo non solo le IgM, ma anche IgG e IgA [73], acquisendo in tal modo importanza epidemiologica, essendo stata dimostrata la persistenza delle IgA nel 100% dei pazienti sino a 9 mesi dopo l'infezione [74]. Anche l'impiego del dot-ELISA, però, è limitato esclusivamente alle indagini di screening.

L'IFA costituisce una valida alternativa al più complesso MAT, garantendo risultati comparabili in specificità e persino superiori in sensibilità, ma necessita ancora di standardizzazione [75].

Il test di agglutinazione al latex (LEPTO RLA) e il DIPSTICK assay consentono la rapida (2') individuazione di IgM specifiche precocemente nel corso della malattia, offrendo il vantaggio della facilità di esecuzione del test; il rischio di falsi positivi (malattie da spirochete diverse dalla leptospirosi) e di falsi negativi esigono, tuttavia, un test di conferma [76, 77].

La malattia, nell'85-90% dei casi, decorre in for-

ma benigna-autolimitantesi, che, sfuggendo alla diagnosi etiologica, va incontro a guarigione anche in assenza di trattamento antibiotico. L'efficacia degli antibiotici nel trattamento della leptospirosi umana è ancora dubbio; il massimo beneficio si ottiene quando gli antibiotici sono somministrati entro i primi 4 giorni di malattia, cioè, prima che sia stata posta una diagnosi di certezza [9]; un elevato indice di sospetto clinico-epidemiologico per leptospirosi acquista, quindi, un'importanza essenziale per garantire un intervento tempestivo. Un'ampia gamma di antibiotici è attiva nei confronti delle leptospire: penicillina (1.5-2 milioni di UI ogni 6 ore), ampicillina (1 g ogni 6 ore), amoxicillina (500 mg - 1 g ogni 8 ore), doxiciclina (200 mg/die), tetraciclina (500 mg ogni 6 ore), cefotaxime, ceftriaxone, chinoloni. Contrastanti sono i risultati di una terapia non tempestiva; recenti studi in doppio cieco hanno, comunque, dimostrato che la penicillina, anche se somministrata tardivamente, può migliorare il decorso clinico, riducendo la durata della febbre e l'entità della disfunzione renale [78]; tutti i pazienti affetti da leptospirosi dovrebbero, quindi, essere trattati, indipendentemente dallo stadio di malattia in cui viene posta diagnosi. Fondamentale risulta, invece, il trattamento di supporto dell'insufficienza renale, per la quale, talvolta, si impone il ricorso alla dialisi peritoneale o all'emodialisi. Le massive emorragie polmonari richiedono la pronta intubazione e la ventilazione meccanica [79].

Sono stati segnalati rari casi di grave insufficienza respiratoria, conseguenti a reazione di Jarisch-Herxheimer da somministrazione e.v. di penicillina, che necessitano di un attento trattamento di supporto [80].

Non dimostrata, finora, è l'utilità di una terapia steroidea nelle fasi più avanzate della malattia, correlabili ad una patogenesi immunitaria [81]; l'uso combinato di penicillina e cortisone sembrerebbe efficace nel trattamento delle forme epatiche [82].

La totale prevenzione o eradicazione della leptospirosi è impossibile. I mezzi più efficaci di prevenzione sono le misure comportamentali volte a ridurre il rischio di esposizione: evitare l'immersione in acque dolci naturali; sciacquarsi dopo attività ricreative quali il canottaggio, il windsurf, lo sci d'acqua o il nuoto in acque dolci; indossare indumenti protettivi (stivali, guanti) nelle attività professionali a rischio [9].

L'assunzione della doxiciclina (200 mg una volta la settimana) è utile per coloro che sono esposti ad un rischio elevato per un breve lasso di

tempo: personale militare, lavoratori agricoli; utile la chemioprolifassi anche dopo morso di ratto [83, 84]; analoga efficacia in profilassi non sembra garantita dalla penicillina.

La vaccinazione degli animali domestici e d'allevamento su larga scala potrebbe prevenire l'infezione animale riducendo alcune tipologie di contagio professionale. In gruppi ad alto rischio, nei paesi in via di sviluppo, sono stati utilizzati vaccini, ottenuti da leptospire uccise (con formolo o radiazioni ionizzanti), che, tuttavia, forniscono una protezione di breve durata e sono gra-

vati da molteplici effetti collaterali, spesso gravi. La realizzazione di un vaccino efficace e sicuro per il controllo della leptospirosi umana rimane il principale obiettivo della ricerca, attualmente focalizzata nella biosintesi del lipopolisaccaride di membrana, putativo antigene protettivo: la lipoproteina di membrana LipL41, comune a tutte le specie patogene di leptospira (eccetto *L. inadai*), è uno dei probabili candidati [85].

Key words: leptospirosis, epidemiology, clinical aspects

RIASSUNTO

Le leptospire, spirochete a diffusione ubiquitaria, infettano un'ampia varietà di mammiferi; numerosi serovar della specie *Leptospira interrogans* s.l. possono, talora, essere responsabili di manifestazioni cliniche nell'uomo, che contrae l'infezione per contatto di cute abrasa o mucose con acqua o suolo contaminati da urine di animali infetti; i ratti sono la principale fonte di infezione, ma gli animali domestici e il bestiame da allevamento hanno un ruolo epidemiologico rilevante. A fronte della costante endemicità delle aree tropicali, nei paesi sviluppati, casi sporadici e/o episodi epidemici, ad andamento stagionale, si verificano con una nuova tendenza epidemiologica che vede attività ricreative, o condizioni abitative e igienico-sanitarie scadenti, sostituire il tipico rischio professionale.

L'esordio clinico è acuto, simile ad una sindrome influenzale, e il decorso generalmente bifasico. I quadri clinici sono estremamente proteiformi e, non sempre, in rapporto diretto con il sierotipo responsabile, ma tutti sostenuti da una vasculite generalizzata. Non sono ancora noti i fattori predisponenti alla comparsa delle forme più gravi (insufficienza renale, ittero, emorragie).

Le leptospire possono essere isolate dal sangue o dal liquor solo nei primi giorni di malattia; la diagnosi sierologica si avvale di tecniche di microagglutinazione, IFA ed ELISA; la PCR potrebbe consentire una diagnosi etiologica precoce, durante la fase di latenza della risposta anticorpale. La tempestività della terapia condiziona la prognosi delle forme più gravi.

SUMMARY

*Leptospires, world-wide distributed spirochetes, affect a great variety of mammalian hosts; several serovars belonging to the *L. interrogans* s.l. species can cause clinical manifestations in humans, becoming infected through the contact of skin cuts and mucous membranes with water and soil polluted by infected animals' urine; rodents serve as the main reservoirs but the epidemiological importance of pets and cattle, as leptospire shedder is increasing.*

While the infection remains endemic in tropical regions, there is a new epidemiological trend in developed countries where, with the typical seasonal pattern, sporadic cases and/or outbreaks occur related more to recreational activities and poor sanitation than to occupational activities.

The sudden onset presents a "flu-like" syndrome; the course is usually characterised by two clearly defined stages.

All of the variable clinical manifestations, often independent of the responsible serovar, arise from the effects of a general vasculitis.

The prognostic factors associated with severe forms (renal failure, jaundice, haemorrhages) are not defined.

Within the first days of illness, the leptospire can be isolated from blood and cerebrospinal fluid; serological diagnosis relies on microagglutination, IFA and ELISA; PCR early in the course, before the appearance of specific antibodies, allows etiological diagnosis. Prompt treatment has an enormous impact on outcome.

■ BIBLIOGRAFIA

- [1] International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on Taxonomy of *Leptospira* Meeting, Praha 1994.
- [2] International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on Taxonomy of *Leptospira* Meeting, Munich 1978.
- [3] International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on Taxonomy of *Leptospira* Meeting, Boston 1982.
- [4] Jost B.H., Adler B., Faine S. Reaction of monoclonal antibodies with species specific determinants in leptospiral outer envelope. *J. Med. Microbiol.* 27, 51-57, 1988.
- [5] Kmety E. Factoreanalyse von Leptospiren der Icteraemorrhagiae und einiger verwandter Serogruppen. Bratislava Slovack Academy of Sciences, Thesis, 1967.
- [6] Herrmann J.L., Bellenger E., Perolat P., Baranton G., Saint Girons I. Pulse-field gel electrophoresis of Not 1 digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1696-1702, 1992.
- [7] Dikken H., Kmety E. Serological types method of leptospire. *Methods Microbiol.* 11, 259-307, 1978.
- [8] International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on Taxonomy of *Leptospira* Meeting, Manchester 1986.
- [9] Ferguson I.R. Leptospirosis update. *BMJ.* 302, 128-129, 1991.
- [10] Merien F., Amoriaux P., Perolat P., Baranton G., Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2219-2224, 1992.
- [11] Watt G. Leptospirosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 10, 149-152, 1997.
- [12] Faine S. *Leptospira* and Leptospirosis. Boca Raton, CRC Press 1994.
- [13] Cacciapuoti B., Ciceroni L., Maffei C., et al. A waterborne outbreak of leptospirosis. *Am. J. Epidemiol.* 126, 535-545, 1987.
- [14] Centers for Diseases Control and Prevention. Outbreak of Leptospirosis among White-Water Rafters, Costa Rica, 1996. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 46(25), 577-579, 1997.
- [15] Vinetz J. Leptospirosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 10, 357-361, 1997.
- [16] Chandrasekaran S., Mallika M., Pankajalakshini V.V. Studies on the incidence of leptospirosis and possible transmission of *Leptospira* during leptospiraemia. *India J. Pathol. Microbiol.* 38(2), 133-137, 1995.
- [17] Cacciapuoti B., Ciceroni L., Pinto A., et al. Survey on the prevalence of leptospira infections in the Italian population. *Eur. J. Epidemiol.* 10, 173-180, 1994.
- [18] Vinetz J.M., Glass G.E., Flexner C.E., Mueller P., Kaslow D.C. Sporadic urban Leptospirosis. *Ann. Intern. Med.* 125, 794-798, 1996.
- [19] Murhekar M.V., Sugunan A.P., Vijayachari P., Sharma S., Sehgal S.C. Risk factors in the transmission of leptospiral infection. *Indian J. Med. Res.* 107, 218-223, 1998.
- [20] Barwick R.S., Mohammed H.O., McDonough P.L., White M.E. Epidemiologic features of equine *Leptospira* interrogans of human significance. *Pre. Vet. Med.* 36(2), 153-165, 1998.
- [21] Birnbaum N., Barr S.C., Center S.A., Schermerhorn T., Randolph J.F., Simpson K.W. Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs: serological and clinicopathological features. *J. Small. Anim. Pract.* 38(5), 231-236, 1998.
- [22] Babudieri B. Epidemiology of Leptospirosis in Italian ricefields. In: *Advances in the control of zoonoses*. WHO Monograph Series. 19, 117-126, 1953.
- [23] Babudieri B. Les leptospire et la leptospire en Italie. *Soc. Med. Ital.* 5, 657-700, 1957.
- [24] Cacciapuoti B. Leptospirosi. *Giorn. Mal. Inf. Parass.* 42, 954-962, 1990.
- [25] Merien F., Perolat P. Public Health importance of human Leptospirosis in the South Pacific: a five-year study in New Caledonia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55(2), 174-178, 1996.
- [26] Perrocheau A., Perolat P. Epidemiology of leptospirosis in New Caledonia (South Pacific): a one-year survey. *Eur. J. Epidemiol.* 13(2), 161-167, 1997.
- [27] Trevejo R.T., Rigau-Perez J.G., Ashford D.A., et al. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary haemorrhage-Nicaragua 1995. *J. Infect. Dis.* 178(5), 1457-1463, 1998.
- [28] Centers for Diseases Control and Prevention. Outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage-Nicaragua, 1995. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 44, 839-843, 1995.
- [29] Centers for Diseases Control and Prevention. Travel conditions in Honduras, Nicaragua and Guatemala after hurricane Mitch. *CDC Travel information* 1998.
- [30] Farr R.W. Leptospirosis. *Clin. Infect. Dis.* 21, 1-8, 1995.
- [31] Binder W.D., Mermel L.A. Leptospirosis in urban setting: case report and review of an emerging infectious disease. *J. Emerg. Med.* 16(6), 851-856, 1998.
- [32] Centers for Diseases Control and Prevention. Leptospirosis and unexplained acute febrile illness among triathlon participants - Illinois and Wisconsin, 1998. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 47(32), 673-676, 1998.
- [33] Thomas D.R., Salmon R.L., Kench S.M., et al. Zoonotic illness-determining risks and measuring effects: association between current animal exposure and a history of illness in a well characterised rural population in the UK. *J. Epidemiol. Community Health.* 48(2), 151-155, 1994.
- [34] Ciceroni L., Pinto A., Cacciapuoti B. Recent trends in human leptospirosis in Italy. *Eur. J. Epidemiol.* 4, 49-54, 1988.
- [35] Thomas D.D., Higbie L.M. In vitro association of leptospire with host cells. *Infect. Immun.* 58, 581-585, 1990.
- [36] Charon N.W., Lawrence C.W., O'Brien S. Movement of antibody coated latex beads attached to the spirochete *Leptospira interrogans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 7166-7170, 1981.
- [37] Younes-Ibrahim M., Buffin-Meyer B., Cheval L., et al. Na,K-ATPase: a molecular target for *Leptospira interrogans* endotoxin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30(2), 213-223, 1997.
- [38] Dobrosielski-Vergona K. Alterations in specific activity of glucose-6-phosphatase in laboratory rats after leptospiral exposure followed by triiodothyronine administration. *Am. J. Vet. Res.* 58(2), 143-145, 1997.
- [39] 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.* 65, 729-738, 1997.
- [40] Merien F., Truccolo J., Rougier Y., Baranton G., Perolat P. In vivo apoptosis of hepatocytes in guinea pigs infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. *FEMS Microbiol. Letter.* 169(1), 95-102, 1998.

- [41] Vihn T., Adler B., Faine S. Glycolipoprotein cytoxin from *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. *J. Gen. Microbiol.* 132, 11-123, 1986.
- [42] Nicodemo A.C., Duarte M.I.S., Alves V.A.F., Takakura C.F.H., Santos R.T.M., Nicodemo E.L. Lung lesions in human leptospirosis: microscopic immunohistochemical and ultrastructural features related thrombocytopenia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56(2), 181-187, 1997.
- [43] Pereira M.M., Andrade J., Lacerda M.D., Batoreu N.M., Marchevsky R.S., Ribeiro dos Santos R. Demonstration of leptospiral antigens on tissues using monoclonal antibodies and avidin-biotin peroxidase staining. *Exp. Toxicol. Pathol.* 49(6), 505-511, 1997.
- [44] Tajiki M.H., Salomao R. Association of plasma levels of tumor necrosis factor alpha with severity of disease and mortality among patients with leptospirosis. *Clin. Infect. Dis.* 23, 1177-1178, 1996.
- [45] Haake D.A., Martinich C., Summers T.A. et al. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase and mammalian infection. *Infect. Immun.* 66(4), 1579-1587, 1998.
- [46] Sitprija V. Renal involvement in leptospirosis. *Nephrology*, Robinson RR, Ed Springer Verlag. 1041-1052, New York 1984.
- [47] Seguro A.C., Lomar A.V., Rocha A.S. Acute renal failure of leptospirosis: nonoliguric and hypokalemic forms. *Nephron.* 55, 146-151, 1990.
- [48] Lai K.N., Aarons L., Woodroffe A.J., Clarkson A.R. Renal lesions in leptospirosis. *Aust. NZ. J. Med.* 12, 276-279, 1982.
- [49] Gerding M.N., Groen J., Brouwer R.L.M., Jordans J.G.M., Osterhaus A.D.M. Acute renal failure due to *Leptospira* grippityphosa. *Infection* 25, 379-380, 1997.
- [50] Chen Y. Clinical analysis of 12 cases of cerebrovascular leptospirosis. *Chinese J. Neurol. Psychiat.* 23, 226-228, 1990.
- [51] Faine S. Clinical leptospirosis in humans. In: Faine S. *Leptospira and Leptospirosis*. Boca Raton, CRC Press 1994.
- [52] Perani V., Farina C., Maggi L., et al. Pneumonia due to *Leptospira* spp.: results of an epidemiological and clinical study. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2(9), 766-770, 1998.
- [53] Shim Y.H., Shim B.S., Choe K.H., et al. Epidemic pulmonary haemorrhagic fever. I. Epidemiological and clinical observations. *J. Korean Med. Ass.* 23, 131-144, 1980.
- [54] Choi I.J., Kim T.S., Jin S.Y., et al. Acute febrile alveolar haemorrhage. An autopsy proven leptospirosis case. *J. Korean Med. Ass.* 28, 362-370, 1985.
- [55] Dupont H., Dupont-Perdrizet D., Perie J.L., Zehner-Hansen S., Jarrige B., Daijardin J.B. Leptospirosis: prognostic factors associated with mortality. *Clin. Infect. Dis.* 25, 720-724, 1997.
- [56] Marotto P.C.F., Schettini Marotto M., Santos D.L., Souza T.N.L., Seguro A.C. Outcome of leptospirosis in children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56(3), 307-310, 1997.
- [57] Johnson D.W. The Australian leptospires. *Med. J. Aust.* 2, 724-731, 1950.
- [58] Sheldon W.R. Leptospiral antigen demonstrated by the fluorescent antibody technique in human muscle lesions of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 84, 165-167, 1953.
- [59] White F.H., Ristic M. Detection of *Leptospira pomona* in guinea pig and bovine urine with fluorescein-labelled antibody. *J. Infect. Dis.* 105, 118-123, 1959.
- [60] Terpstra W.J., Jabboury-Postema J., Korver H. Immunoperoxidase staining of leptospires in blood and urine. *Zentralbl Bacteriol Microbiol Hyg.* 254, 534-539, 1983.
- [61] Terpstra W.J., Schoone G.J., Schegget J. Detection of leptospiral DNA by nucleic acid hybridization with 32P and biotin-labelled probes. *J. Med. Microbiol.* 22, 23-28, 1986.
- [62] Merien F., Baranton G., Perolat P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of Leptospirosis. *J. Infect. Dis.* 172, 281-285, 1995.
- [63] Bal A.E., Gravekamp C., Hartskeerl R.A., De-Meza Brewster J., Korver H., Terpstra W.J. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1894-1898, 1994.
- [64] Raoult D., Hechemy K.E., Baranton G. Cross-reaction with *Borrelia burgdorferi* antigen of sera from patients with human immunodeficiency virus infection, syphilis and leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2152-2155, 1989.
- [65] Letocart M., Baranton G., Perolat P. Rapid identification of pathogenic *Leptospira* species (*Leptospira interrogans*, *L. borgpetersenii* and *L. kirschneri*) with species-specific probes produced by arbitrarily primed PCR. *J. Clin. Microbiol.* 35, 248-253, 1997.
- [66] Zuerner R.L., Bolin C.A. Differentiation of *Leptospira interrogans* isolates by IS1500 hybridization and PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 35(10), 2612-2617, 1997.
- [67] Zuerner R.L., Alt D., Bolin C.A. IS1533-based PCR assay for identification of *Leptospira interrogans sensu lato* serovars. *J. Clin. Microbiol.* 33(12), 3284-3289, 1995.
- [68] Turner L.H. Leptospirosis. *BMJ* 279, 231-235, 1969.
- [69] Feigin R.D., Anderson D.C. Human Leptospirosis. *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 5, 413-467, 1975.
- [70] Brandao A.P., Camargo E.D., da Silva M.V., Abrão R.V. Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 36(11), 3138-3142, 1998.
- [71] Kmety E. Betrachtungen zum Problem der paradoxen Reaktion und deren Bedeutung in der Serodiagnostik einiger Leptospiren. *Zbl Bakt. Par. Infekt. Hyg. I*, 170, 597-608, 1957.
- [72] Winslow W.E., Merry D.J., Pire M.L., Devine P.L. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospira infection. *J. Clin. Microbiol.* 35(8), 1938-1942, 1997.
- [73] DaSilva M.V., et al. Immunodiagnosis of human leptospirosis by dot-ELISA for the detection of IgM, IgG and IgA antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56(6), 650-655, 1997.
- [74] DaSilva M.V., Nakamura P.M., Camargo E.D., et al. Behaviour of specific IgM, IgG and IgA class antibodies in human leptospirosis during the acute phase of the disease and during convalescence. *J. Trop. Med. Hyg.* 98(4), 268-272, 1995.
- [75] Appassakij H., Silpapojakul K., Wansit R., Woodtanyakorn J. Evaluation of the immunofluorescent antibody test for the diagnosis of human leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52(4), 340-343, 1995.
- [76] Petchchai B., Srisarin A., Potha U., Hiranras S., Wongpaitoon V. Evaluation of two screening tests for human leptospirosis. *J. Med. Assoc Thai.* 73(2); 64-67, 1990.
- [77] Gussenhoven G.C., van der Hoorn M.A., Goris M.G., et al. LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. *J. Clin. Microbiol.* 35(1), 92-97, 1997.
- [78] Watt G., Tuazon M.L., Santiago E. et al. Placebo-con-

trolled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. *Lancet*. 1, 433-435, 1988.

[79] Zaki S.R., Shieh W.J. and the Epidemic Working Group. Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage. Nicaragua, 1995. *Lancet*. 347, 535-536, 1996.

[80] Watt G., Warrel D.W. Leptospirosis and the Jarisch-Herxheimer reaction. *Clin. Infect. Dis.* 20, 1437-1438, 1995.

[81] Emmanouilides C.E., Kohn O.F., Garibaldi R. Leptospirosis complicated by a Jarish-Herxheimer reaction and Adult Respiratory Distress Syndrome: case report. *Clin. Infect. Dis.* 18, 1004-1006, 1994.

[82] Gioannini P. Infezioni da *Leptospira*. In Gioannini P.

Malattie Infettive Ed. Minerva Medica, Torino 1993, pp 320-331.

[83] Takafuji E.T., Kirikpatrick J.W., Miller R.N., et al. An efficacy trial of doxycycline chemoprophylaxis against leptospirosis. *N. Engl. J. Med.* 310, 497-500, 1984.

[84] Gonzalez C.R., Casseb J., Montero F.G., et al. Use of doxycycline for leptospirosis after high risk exposure in Sao Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 40(1), 59-61, 1998.

[85] Shang E.S., Summers T.A., Haake D.A. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect. Immun.* 64, 2322-2330, 1996.