



**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**KIRIKKALE YÖRESİNDE İNSANLARDA LEPTOSPIRA
SEROPREVALANSININ SAPTANMASI**

Dr. Kenan ECEMİŞ

UZMANLIK TEZİ

KIRIKKALE

2014



**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**KIRIKKALE YÖRESİNDE İNSANLARDA LEPTOSPIRA
SEROPREVALANSININ SAPTANMASI**

Dr. Kenan ECEMİŞ

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Sedat KAYGUSUZ**

KIRIKKALE

2014

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM
DALI

Uzmanlık Öğrencisinin Adı: Dr. Kenan ECEMİŞ

Çalışmanın Başlığı: Kırıkkale Yöresinde İnsanlarda Leptospira Seroprevalansının Saptanması

“Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Eğitimi” çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıda belirtilen jüri üyeleri tarafından **UZMANLIK TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 26/08/2014

Prof. Dr. Dilek KILIÇ
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Sedat KAYGUSUZ
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik
Mikrobiyoloji AD
Üye

Prof. Dr. Canan AĞALAR
Fatih Sultan Mehmet Eğitim ve
Araştırma Hastanesi
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik
Mikrobiyoloji Kliniği
Üye

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi, beceri ve tecrübelerini aktararak, yetişmemde emeği olan, tez çalışmam boyunca planlanmasından yazılmasına kadar her aşamasında değerli katkılarıyla bana destek veren, ilgisini ve yardımlarını hiç esirgemeyen değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Sedat KAYGUSUZ'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi, beceri ve tecrübelerini aktararak, yetişmemde emeği olan, her türlü yardımı esirgemeyen değerli hocam, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Dilek KILIÇ'a teşekkür ederim.

Klinik eğitimimde, bilgi ve becerimin artmasında katkıları ve desteği olan, bu süre boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Canan AĞALAR, Sayın Prof. Dr. Ergin AYAŞLIOĞLU, Sayın Doç. Dr. Birgül KAÇMAZ ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Serdar GÜL ve uyumlu bir çalışma ve yardımlaşma içerisinde bulunduğum tüm Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji personeline teşekkür ederim.

Bu projenin gerçekleşmesinde maddi destek sağlayan Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca her türlü desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, her zaman yanımda olan sevgili eşim Emine Ecemiş'e, bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme teşekkür ederim.

Dr. Kenan ECEMİŞ

ÖZET

Ecemiş K, Kırıkkale Yöresinde İnsanlarda Leptospira Seroprevalansının Saptanması, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Kırıkkale, 2014.

Leptospirozun dünyada en sık görülen zoonoz olduğu düşünülmektedir. İnsanlarda olgu sayıları giderek artmaktadır. Hastalık insanlara hasta hayvanın idrarı ile doğrudan veya dolaylı olarak bulaşmaktadır. Ciddi leptospirozda fatalite hızı yüksektir. Tanınması zor ve tedavi edilmediğinde ölümcül olabilen leptospirozun Kırıkkale yöresinde insanlarda seroprevalansının araştırılması ile farkındalığın sağlanması hedeflenmiştir.

Bu çalışmada, 2013 yılında Kırıkkale ilinde leptospiroz açısından riskli 200 (Grup 1) ve kontrol grubu olarak risk grubunda olmayan 200 kişiden (Grup 2) kan örnekleri alındı. Bu örneklerden enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi ile leptospira immünglobulin M (IgM) ve immünglobulin G (IgG) testleri çalışıldı. Serum örneklerinin % 2,25'inde Leptospira IgG pozitif bulunurken, IgM pozitifliği saptanmadı. Grup 1'deki 200 olgudan 8 olguda (% 4), Grup 2'deki 200 olgudan ise 1 olguda (% 0,5) Leptospira IgG pozitif saptandı. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,037$). Kırsal alanda yaşamak ($p=0,031$), ev çevresinde fare görmek ($p=0,001$) ve bahçede köpek beslemek ($p=0,001$) seroloji pozitifliğinde istatistiksel olarak anlamlı risk faktörleri olarak saptandı.

Çalışma sonuçlarının, leptospiroz için farkındalığı sağlayarak, leptospirozun ayırıcı tanıda akla getirilmesini sağlayacağı, tanı konulan hastalarda erken tedavi ile ölümcül olabilecek komplikasyonların önlenmesine katkı sağlayacağı ve ileride yapılacak epidemiyolojik çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Leptospira, zoonoz, Kırıkkale, seroprevalans, ELISA

ABSTRACT

Ecemiş K, Investigation of Leptospira Seroprevalance in Humans in Kırıkkale Region, Kırıkkale University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Thesis of Speciality, Kırıkkale, 2014.

Leptospirosis is considered to be the most common zoonosis in the world. The number of cases of leptospirosis in humans is increasing. The disease is transmitted to humans by direct contact with animal urine or indirectly. The fatality rate is high in severe leptospirosis. The aim of this study is to provide awareness of leptospirosis which is difficult to recognize and can be fatal if not treated, by investigation of leptospira seroprevalance in humans in Kırıkkale region.

In this study blood samples were taken from 200 people (Group 1) who were at risk for leptospirosis and 200 people (Group 2) who were not in the risk group. From these samples with Leptospira immunoglobulin M (IgM) and immunoglobulin G (IgG) tests were performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Leptospira IgG were positive in the 2,25 % of samples. IgM seropositivity was not detected. In the Group 1, 8 in 200 patients (4 %) and in the Group 2, 1 in 200 patients (0,5 %) were positive for Leptospira IgG. The difference between the two groups was statistically significant ($p = 0,037$). Living in rural areas ($p = 0,031$), to see mouse around the house ($p = 0,001$) and to feed dog in the garden ($p = 0,001$) was found to be statistically significant risk factors for positive serology.

We believe that our study results will contribute to the prevention of potentially fatal complications with early treatment with keeping leptospirosis in mind in the differential diagnosis, by providing awareness for leptospirosis and will shed light on future seroepidemiological studies.

KeyWords: Leptospira, zoonosis, Kırıkkale, seroprevalance, ELISA

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER ve TABLOLAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Taksonomi	5
2.3. Epidemiyoloji.....	8
2.4. Mikrobiyoloji.....	13
2.5. Patogenez ve Virulans	16
2.6. Klinik.....	20
2.7. Laboratuvar.....	27
2.8. Ayırıcı Tanı.....	28
2.9. Tanı.....	29
2.10. Tedavi.....	37
2.11. Korunma	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1. Etik Kurul Onayı.....	42
3.2. Çalışma Grubunun Seçimi	42
3.3. Laboratuvar Analizleri.	43
3.4. İstatistiksel Analiz.....	45
4. BULGULAR	46
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
7. KAYNAKLAR.....	58

KISALTMALAR

ARDS	:	Akut respiratuvar distress sendromu
BOS	:	Beyin omirilik sıvısı
CPHS	:	Ciddi pulmoner hemoraji sendromu
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
EDTA	:	Etilendiamin tetra asetik asit
ELISA	:	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMJH	:	Ellinghausen-Mc Cullough-Johnson-Harris
Fla	:	Flagella
HLA	:	İnsan lökosit antijeni
IgG	:	İmmünglobulin G antikoru
IgM	:	İmmünglobulin M antikoru
LAMP	:	Loop-mediated izotermal amplifikasyon
Lip	:	Lipoprotein
LPS	:	Lipopolisakkarit
MAT	:	Mikroaglutinasyon testi
MLST	:	Multilocus sequence typing
MLVA	:	Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis
Omp	:	Dış membran proteini
PZR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
rRNA	:	Ribozomal ribonükleik asit
T2SS	:	Tip 2 sekresyon sistemi
TLR	:	Toll like reseptör

ŞEKİLLER

Şekil 1. Hastalık Günü-Antikor Titresi Grafiği.....	36
Şekil 2. Grup 1'deki Meslekler.....	48

TABLolar

Tablo 1. Leptospira Cinsinde Tanımlanmış 20 Tür.....	7
Tablo 2. Leptospiroz Tedavisi ve Kemoproflaksisi.....	38
Tablo 3. Grupların Cinsiyet ve Yaş Dağılımı.....	46
Tablo 4. Olguların Öğrenim Durumları.....	47
Tablo 5. Gruplara Göre Leptospira Seropozitifliği Oranları.....	48
Tablo 6. Leptospira Seroloji Sonuçlarına Göre Değişkenlerin Değerlendirilmesi...50	

1. GİRİŞ

Leptospiroz, patojenik leptospira cinsi spiroket enfeksiyonu sonucu gelişen, tüm dünyada görülebilen bir zoonozdur. Hastalık özellikle tropikal bölgelerde beklenenden daha az bildirilmekle birlikte sürveyans çalışmaları dünyada en yaygın zoonoz olabileceğini düşündürmektedir (1,2).

Hastalık, taşıyıcı hayvanlardaki kronik renal enfeksiyon aracılığı ile doğada varlığını sürdürmektedir. Taşıyıcı hayvanların idrarındaki spiroketler ile çevre kontaminasyonu gerçekleşmektedir. İnsanlarda, çoğunlukla su ve nemli topraktaki spiroketlerle ile indirekt, daha az sıklıkta ise enfekte idrar veya dokular ile direkt olarak sağlam olmayan cilt ile temas sonucu enfeksiyon gelişmektedir. İnsanlardaki enfeksiyonların çoğu muhtemelen asemptomatiktir. Hastalık, ayırt edilemeyen ateşli bir hastalıktan, mortalite oranının yüksek olduğu multisistemik bir hastalığa kadar değişen geniş bir klinik spektruma sahiptir. Hastalığın teşhis edilememesinin nedenlerinden biri de klinik tablodaki bu çeşitliliştir (1).

Tanıma kültür, seroloji ve moleküler yöntemler kullanılmakla birlikte, genellikle mikroskopik aglütinasyon testi (MAT), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) gibi serolojik yöntemler kullanılmaktadır (3-7).

MAT yöntemi altın standart olup ancak referans laboratuvarlarında çalışılabilmektedir. ELISA yöntemi ise özellikle fazla sayıda örneğin çalışıldığı seroprevalans çalışmalarında daha çok tercih edilmektedir (8-12).

Ciddi leptospirozda fatalite hızı yüksek olduğundan ayırıcı tanıda akla gelmelidir. Kırıkkale yöresinde insanlarda leptospira seroprevalansının saptanması, ayırıcı tanıda leptospirozun akla gelmesinde bölgesel verileri teşkil edeceği için büyük öneme sahiptir.

Tanınması zor ve tedavi edilmediğinde ölümcül olabilen leptospirozun Kırıkkale yöresinde seroprevalansının araştırılması ile farkındalığın sağlanması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Leptospiraların kaynağının Rusya olduğu ve 1729 yılında kahverengi ratların Baltık limanlarından gemilerle İngiltere'ye taşındığı ve buradan tüm dünyaya yayıldığı düşünülmektedir (13). Leptospiroz ile ilgili ilk çalışmalar 1886 yılında Prag'da Weiss ve Almanya'da Weil isimli araştırmacılar tarafından yapılmıştır (14). Şiddetli sarılık ve böbrek fonksiyonlarında bozulmayla seyreden ciddi multisistemik hastalık sendromu Adolf Weil tarafından 1886 yılında Almanya'da Heidelberg'de tanımlanmıştır (1). Leptospiroza benzer başka hastalık tanımları daha öncesinde yapılmış olmakla birlikte, bu hastalıkların hiçbirinin kesin olarak leptospiral enfeksiyona bağlı olmadığı düşünülmüştür (15).

Leptospira ilk kez New Orleans'da Sarı Humma hastalığından öldüğü düşünülen bir hastanın otopsisinde böbrek doku kesitlerinde gümüş boyama tekniği ile tespit edilmiştir (16). Ancak uzunca yıllar etken izole edilememiştir. Wolbach ve Binger 1914 yılında bir gölet suyunda leptospiraları tanımlamışlar, ancak kültürde üretememişlerdir (17). Etken, 1915 yılında eş zamanlı olarak Almanya ve Japonya'da izole edilebilmiştir. Japonya'da 1915 yılında İnado ve arkadaşları bir hastanın kanını kobaya inoküle etmişler ve kobayın karaciğerinden Weil Hastalığı etkenini izole ederek, *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* olarak isimlendirmişlerdir (18). Ciddi ikterik leptospiroz ile Sarı Humma için tanıda karışıklık devam etmiştir.

Stokes ve Noguchi etkeni tanımlamak için o dönemde öne çıkan araştırmacılarıdır (19).

Noguchi, 1917 yılında etkeni spiroketler içinde ayrı bir cins olarak leptospira şeklinde isimlendirmiştir. Leptos küçük, ince anlamında, spira ise sarmal anlamındadır. Bu tarihten sonra farklı ülkelerden yeni leptospira serovarları bildirilmiştir. İnsanlarda görülen leptospiral enfeksiyonlar sebep olan serotiplere göre isimler almışlardır (13,20). Serotip *icterohaemorrhagiae* için Weil Hastalığı, serotip *batavia* için Pirinç Tarlası Humması, serotip *pomona* için Domuz Çobanı Humması isimleri kullanılmıştır (21). İdo ve arkadaşları, 1917 yılında *L. heptomadis*'i Yedi Gün Humması, Shiozowa ve Kiyatoma ise 1925 yılında *L. autumnalis*'i Sonbahar Humması, Tarassof 1928 yılında *L. grippotyphosa*'yı Karasu (Çamur) Humması etkeni olarak izole etmişlerdir (18). Veteriner hekimlikte ise köpeklerdeki serotip *icterohaemorrhagiae* için Yellows, serotip *canicola* için Stuttgart Hastalığı veya Köpek Tifosu ve sığırlardaki serotip *grippotyphosa* için İnfeksiyöz Hemoglobüri gibi isimler kullanılmıştır (21). Sonraki dönemde yapılan çalışmalarda farklı isimlendirilen bazı hastalıklarda tek bir leptospira serovarının etken olduğu ve tek bir isimle anılan hastalıkta ise farklı leptospira serovarlarının etken olabileceği saptanmıştır (22,23).

Leptospiroz olguları 1921-1925 ve 1946-1952 yılları arasında artış göstermiş ve Avrupa'da birçok yerde gözlenmiştir (24).

Ülkemizde leptospiroz insanlarda ilk kez 1915 yılında Reşat Rıza Bey tarafından tanımlanmıştır (25-28). Etken izolasyonu ise ilk kez 1921 yılında İstanbul'da Hüsamettin Şerif tarafından yapılmıştır (29). Leptospirozun kontrolü için

aşı 1939 yılında köpeklerde, daha sonra domuz ve sığırlarda kullanılmaya başlanmıştır (30). İkinci Dünya Savaşı yıllarında Kemal Hüseyin Plevnelioğlu erlerden leptospira izole ederek çamurdan geçtiği için Çamur Humması denilen hastalığın etkeni olarak *L. grippotyphosa*'nın Türkiye'de bulunduğunu belirtmiştir (31). Türkiye'de hayvanlarda leptospirozun varlığı ilk kez Filistin'e ihraç edilen sığırlarda seropozitifliğin saptanması ile anlaşılmıştır (32). Akçay ve Pamukçu 1950 yılında hayvanlarda leptospirozu saptamışlardır (14).

Hakioğlu tarafından 1957 yılında yapılan bir çalışmada, ülkemizdeki leptospira serovarlarının *L. bovis* ve *L. grippotyphosa* olduğu saptanmıştır (33). Aktan 1959 yılında çeltik tarlalarında çalışan tarım işçilerinde, Adana ve çevresinde 300 serum örneğinin 31'inde *L. grippotyphosa*, 2'sinde *L. bovis*, Hatay ve çevresinde 250 serum örneğinin 34'ünde *L. grippotyphosa*, 3'ünde *L. bovis*, 5'inde *L. icterohaemorrhagiae*, Maraş ve çevresinde ise 150 serum örneğinin 16'sında *L. grippotyphosa* saptamıştır (34). Brewen ve arkadaşları 1960 yılında çeltik yetiştirilen bölgelerde yaptıkları bir çalışmada, 240 insan serumunun 19'unda *L. grippotyphosa*, 2'sinde *L. autumnalis* ve 1'inde *L. sejroe* saptamışlardır (35).

2.2. Taksonomi

Leptospiranın filogenetik sınıflaması (36) :

Sınıf: Schizomycetes

Takım: Spirochaetales

Aile 1: Spirochaetaceae

- Cins 1. Treponema + Serpula hyodysenteria ve benzer organizmalar
2. Spirochaeta
3. Borrelia
4. Cristaspira

Aile 2: Leptospiraceae

- Cins 1. Leptonema
2. Leptospira

Tür 1. *Leptospira biflexa*

Tür 2. *Leptospira interrogans*

Tarihi olarak leptospira cinsi patojenik suşları içeren *L. interrogans* ve nonpatojenik suşları içeren *L. biflexa* olarak 2 tür şeklinde sınıflandırılmıştır. Aglütine olan antikorların kullanımı ile her tür içinde çok sayıda serovar tanımlanmıştır (1). Serovar spesifitesi lipopolisakkarit O antijenleri ile ilişkilidir (37). Bu sınıflandırmada 250'den fazla patojenik leptospira türü tanımlanmıştır. Çok sayıda serovar olduğundan serolojik testlerde kolaylık sağlaması açısından antijenik olarak ilişkili serovarlar için serogruplar oluşturulmuştur (1).

Leptospiralar günümüzde genetik yakınlık derecelerine göre türlere ayrılmıştır. Buna göre *Leptospira* cinsi 20 tür içermektedir (Tablo 1). Bunlardan 9'u patojenik, 5'i intermediate veya patojenitesi bilinmeyen ve kalan 6'sı da nonpatojenik serbest yaşayan ve hayvanları enfekte etmeyen saprofitik türlerdir (38,39). Genetik taksonomi 16S ribozomal ribonükleik asit (rRNA) gen sekans

analizine dayanmaktadır ancak bu serolojik sınıflama ile uyumlu değildir (40). Birçok leptospira tür ve suşunun genom sekans analizleri yapılmış ve leptospira patogenezinin daha iyi anlaşılması sağlanmıştır (1,41-44).

Bazı serovaryolar birden fazla leptospira türünde yer almaktadır. Sonuçta izolatların hem tür hem serovar olarak tanımlanmasına karar verilmiştir. Uluslararası Mikrobiyoloji Dernekleri Birliği'nin (IUMS) Leptospira Taksonomi Komitesi'nde 2002 yılında leptospira serovaryolarının isimlendirilmesinde cins ve türün italik yazılması, serovar adının ise italik yazılmaması ve ilk harfinin de büyük yazılması kabul edilmiştir (ör: *L. interrogans* serovar Copenhageni) (45). Tür seviyesinden daha ileri seviyede sınıflandırma için moleküler metodlar geliştirilmiştir. Multilocus Sequence Typing (MLST) ve Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA) bu metodlardandır (46,47).

Tablo 1. Leptospira Cinsinde Tanımlanmış 20 Tür (48)

Türler	Serogrup	Serovar	Suş
Patojenik			
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Fiocruz LI-130
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214 K
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M84
<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni
<i>L. santarosai</i>	Tarassovi	Atlantae	LT81

<i>L. alexanderi</i>	Manhao	Manhao	3 L 60
<i>L. alstonii</i>	Tanımlanmamış	Sichuan	79,601
<i>L. kmetyi</i>	Tanımlanmamış	Tanımlanmamış	Bejo-Iso 9
Intermediate			
<i>L. wolffii</i>	Tanımlanmamış	Tanımlanmamış	Korat-H2
<i>L. licerasiae</i>	Tanımlanmamış	Varillal	VAR010
<i>L. inadai</i>	Tarassovi	Kaup	LT64-68
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	Hurstbridge	BUT6
<i>L. broomii</i>	Tanımlanmamış	Tanımlanmamış	5399
Saprofit			
<i>L. wolbachii</i>	Codice	Codice	CDC
<i>L. meyeri</i>	Semarang	Semarang	Veldrat
<i>L. biflexa</i>	Semarang	Patoc	Patoc 1
<i>L. vanthielii</i>	Holland	Holland	WaZ Holland
<i>L. terpstrae</i>	Tanımlanmamış	Tanımlanmamış	LT 11-33
<i>L. yanagawae</i>	Semarang	Saopaulo	Sao Paulo

2.3. Epidemiyoloji

Leptospiroz hem ılıman hem de tropikal bölgelerde görülmekte olan, dünya genelinde en yaygın olduğu düşünülen bir zoonotik hastalıktır. Pik insidansını

tropikal bölgelerde yağışlı mevsimlerde yapmakta iken, pik ılıman bölgelerde yaz sonu ve sonbahar başında görülmektedir. Aşırı yağış sonrası salgınlar görülebilmektedir (49). Tropikal bölgelerdeki insidansı ılıman bölgelerdekini yaklaşık 10 katı kadardır. Birçok memeli hayvan doğal konaktır. İnsanlar hayvanlarla veya çevreyle temas sonucu tesadüfen enfekte olmaktadır (50). Leptospiroz, beklenenden daha az bildirilmekte olup, dünya genelinde insidans verileri net değildir. Hastalığın yaygın olarak görüldüğü bölgelerdeki tanı imkanlarının kısıtlılığı bunun nedenlerindedir (2). Dünya Sağlık Örgütü'nün Leptospiroz Epidemiyoloji Grubu dünya genelinde yılda 873000 vaka ve 48600 ölüm olduğunu tahmin etmektedir (51).

2.3.1. Hayvan Enfeksiyonu

Leptospira birçok vahşi ve evcil memeliyi enfekte etmektedir. Kemiriciler, sığırlar, domuzlar, köpekler, atlar, koyunlar ve keçiler en çok etkilenen hayvanlardır. Hastalık kedilerde nadiren görülmektedir. Hayvanlarda enfeksiyon asemptomatik olabileceği gibi klinik enfeksiyon da gelişebilir ve ölümcül olabilir. Köpeklerde mortalitenin yaklaşık % 10 olduğu tahmin edilmektedir. Sığırlar, domuzlar, koyunlar ve keçilerde leptospiroza bağlı spontan düşük yaygındır (52).

Leptospiroz doğada hayvanların renal taşıyıcılığı ile yayılmaktadır. Rezervuarlar kemiriciler ve küçük memelilerdir ancak çiftlik hayvanları ve evcil hayvanlar da insan enfeksiyonu için önemli kaynaktır (1). Çoğu durumda bulaşın devamı için en önemli rezervuar kemiricilerdir. Küçük kemiricilerde enfeksiyon genellikle infant döneminde meydana gelir ve bir kez enfekte olduktan sonra

hayvanlar yaşamları boyunca mikroorganizmayı aralıklı veya sürekli idrarları aracılığıyla yayarak çevrenin özellikle de suyun kontaminasyonuna neden olurlar (53). Mikroorganizmalar toprakta ve göletler, gölcükler gibi alkali pH'daki su birikintilerinde günlerce, aylarca yaşayabilir. Bazı leptospira serovarları uzun süreli taşıyıcılıkta özel konaklara uyum sağlamışlardır. Örneğin serovar Icterohaemorrhagiae sıçanlar (*Rattus rattus*) tarafından taşınırken, serovar Hardjo sığırlar tarafından taşınmaktadır (52).

Hayvan sütlerinde leptospira bulunabilir, ancak laktik asit maturasyonu ile bakteriler asidik ortamda inaktive olmaktadır (54). Leptospiroz nadiren fare, sıçan, köpek ısırması ile bulaşabilmektedir. Enfeksiyöz kabul edilmemekle birlikte, hastalığın akut fazında hayvanların tükürüklerinde leptospira bulunabilmektedir. Tüm vücut sıvıları akut fazda leptospiraları içerebilmektedir (55).

2.3.2. İnsan Enfeksiyonu

İnsan enfeksiyonu genellikle hayvan idrarı, kontamine su ve toprak, enfekte hayvan dokuları gibi çevresel kaynaklarla direkt veya indirekt temas sonucu gelişmektedir. Direkt temas özellikle riskli mesleklerde görülmektedir. İndirekt temas ise daha yaygın olup, çamur ve su ile temas sonrası gelişen hastalığa yol açmaktadır. Tropikal bölgelerde olguların çoğu indirekt temas ile gelişmektedir (1). Kesikler, sıyrıklar, müköz membranlar ve konjonktiva enfeksiyon için giriş kapılarıdır. Enfeksiyon nadiren idrarla kontamine gıda alımı ve aerosoller aracılığıyla gerçekleşebilmektedirler. Leptospiranın sağlam deriden penetre olabileceği konusu tartışmalıdır (52).

Tropikal bölgelerde endemik leptospiroz, yoksulluk (düşük eğitim düzeyi, kötü barınma koşulları, hijyenin olmaması, düşük gelir düzeyi) ile ilişkili bir hastalıktır (57). Leptospiroz çiftçilik gibi mesleklerle uğraşanlar ve kemiricilerin yaygın olduğu, sele maruz kalabilen kenar mahallelerde yaşayanlarda görülebilmektedir (58). Binlerce insanı etkileyen ve yüzlerce kişinin ölümüne neden olan büyük salgınlar sıkça görülmektedir. Bu durum sıklıkla artmış yağış ile ilişkilidir (59,60). Guyana ve Queensland Avustralya'da sele bağlı kontamine su ile temas riskinin artması sonucu epidemiler görülmüştür (61,62). Tayland'da 1995-2005 yılları arasında devam eden tek bir patojenik klonla bağlı salgın meydana gelmiştir (63).

Enfeksiyon için risk faktörleri şunlardır (64-68):

- Mesleki maruziyet (çiftçiler, reñçberler, mezbahane çalışanları, avcılar, veterinerler, kanalizasyon işçileri, çeltik işçileri, evcil hayvan eğiticileri, askeri personel, laboratuvar çalışanları)
- Doğa aktiviteleri (tatlı suda yüzmek, kano kullanmak, kayık kullanmak, dağ bisikleti kullanmak, izcilik)
- Ev ile ilişkili faktörler (evcil köpekler, evcil çiftlik hayvanları, yağmur suyu toplama sistemleri, enfekte kemiricilerle bulaş)
- Diğer faktörler (sulu zeminde çıplak ayakla yürümek, cilt lezyonları, vahşi kemiricilerle temas, laboratuvarda kaza ile temas)

Avrupa’da erkek cinsiyet (E/K oranı 4/1), erişkin yaş, tatlı su ile mesleki veya doğa aktiviteleri ile temas öne çıkan risk faktörleridir (69-73). Bunların dışında Avrupa’dan sele maruziyet, triatlon yarışmaları ve aşırı yağışlar, kürek sporu, nehirde yıkanma ve balık avı sonrasında gelişen küçük salgınlar da bildirilmiştir. Son yıllarda Avrupa’da Almanya, Rusya, Fransa gibi gelişmiş ülkelerde şehirlerde ve şehre yakın bölgelerde bulaş bildirimleri artmıştır. Fransa’da sıçan sayısındaki artışın olası kaynak olabileceği düşünülmüştür (69,70,73-78).

İnsanlarda enfeksiyon genellikle sporadiktir ancak ortak kaynak ile temas sonucu salgınlar gelişebilir. Triatlon yarışmalarında tatlı suda yüzme bölümü birçok leptospiroz salgınına neden olmuştur (79-82). Almanya’da 2006 yılında, Avusturya’da ise 2010 yılında triatlonu takiben salgınlar gelişmiştir (81,82).

Ülkemizde leptospiroz ile ilgili çalışmalar genellikle hayvanlarda yapılan seroepidemiolojik çalışmalar ile insanlarda olgu sunumları şeklindedir. İnsanlarda yapılan seroepidemiolojik çalışmalarda % 2-12, hayvanlarda ise % 3,5-63 oranlarında leptospira seropozitifliği saptanmıştır (3).

Transplasental enfeksiyon gelişebilmektedir ancak fetal geçiş ve fetal komplikasyonların şekli ve sıklığı bilinmemektedir (83-85). Bir derlemede aktif enfeksiyonu olan 14 gebenin 8’inde spontan düşük, 4 bebekte aktif enfeksiyon saptanırken, 2 bebek sağlıklı doğmuştur (83). Onbir vakalık bir seride düşük ve fetal ölüm riski % 50’nin üzerinde saptanmıştır (84). Yaşayan bebeklerde sekel ile ilgili veri bulunmamaktadır (52).

Klinik bulgular izole ateşten çoklu organ yetmezliğine kadar geniş bir spektrumda görülebildiğinden tanı koymak zorlaşmaktadır. Tanıdaki gecikme

leptospiroza bağlı ölüm vakalarının görülmesiyle sonuçlanabilmektedir (86). Zira İngiltere ve Galler’de 1988-2006 yılları arasında ölümle sonuçlanan 18 vaka bildirilmiştir (75). Leptospira ile çevresel temas riskinin yüksek olduğu Güneydoğu Asya gibi bölgelere seyahat eden, doğa aktivitelerine katılanlar ve diğer riskli gruplarda leptospiroz olasılığı akılda tutulmalıdır (52).

2.4. Mikrobiyoloji

Leptospira ismi Yunanca’da ince anlamına gelen ‘leptos’ ve Latince’de sarmal anlamına gelen ‘spira’ kelimelerinden gelmektedir. Adından da anlaşıldığı şekilde genişliği sadece 0,1 mikrometre (μm) iken boyu ise 6 ila 20 μm ’dir (1). Bakterinin sarmalı sağa doğrudur ve bir dalga amplitüdü 0,1 ila 0,5 μm arasında değişmektedir (40,87-89).

Sıvı besiyerinde leptospiralar kendi eksenini etrafında bükülerek ve rotasyon ile karakteristik hızlı, dalga şeklindeki hareketlerini yapmaktadırlar (90). Motilite membran kılıfı altındaki 2 aksiyel flajellanın rotasyonu ile sağlanmaktadır. Bu flajellalar (Fla) hücrenin 2 karşıt ucunda bulunur ve merkeze doğru uzanmaktadırlar (1). Flajella kılıfı ve ekirdeği FlaA ve FlaB proteinleri tarafından oluşturulmaktadır. Elektron mikroskopunda bir FlaB mutantının endoflajellasının olmadığı ve non-motil olduğu gösterilmiştir (91).

Leptospiralarda tipik olarak çift membran yapısı bulunmaktadır. Bu yapıda sitoplazmik membran ve peptidoglikan hücre duvarı bulunmakta ve bu yapı bir dış membran ile çevrelenmektedir (91). Dış membrandaki ana antijen lipopolisakkarittir

(LPS). Bu LPS yapı Gram negatif mikroorganizmadakilerle yapısal ve immünolojik olarak benzerdir. Bununla birlikte hücrelere ve hayvanlara göreceli olarak daha az toksiktir. *Escherichia coli* LPS yapısı ile kıyaslandığında fareler üzerinde 12 kat daha az ölümcül etkisi vardır (15). Leptospiralardaki Lipid A metillenmiş ve fosforlanmış modifiye glukozamin disakkarit ünitesi gibi farklı özelliklere sahiptir (92). Dış membran yapısında LPS dışında yapısal ve fonksiyonel proteinler de bulunmaktadır. Bu proteinlerin büyük bir kısmını, hücre yüzeyinde daha çok olmak üzere lipoproteinler (LipL32, LipL21, LipL41) oluşturmaktadır (93). Dış membranda porin OmpL1 ve tip 2 sekresyon sistemi (T2SS) sekretin GspD gibi antijenik özellikleri olduğu gösterilmiş integral membran proteinleri bulunmaktadır (94,95).

Leptospiralar spiral şekilli, çok hareketli, zorunlu aerobik spiroketlerdir. Bir hücrede 18 veya üzerinde sarmal bulunmaktadır (52). Hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere benzer özellikleri bulunmaktadır. Görülebilecek dalga boyundan daha ince oldukları için ışık mikroskopunda görülememektedirler (87,89,96-98). Sık kullanılan laboratuvar boyaları ile zayıf boyanma eğilimindedirler. En iyi şekilde karanlık alan mikroskopisi, gümüş boyama ve floresan mikroskopisi ile görülmektedir. Morfolojik olarak diğer spiroketlerden bakterinin uç kısmındaki soru işareti şeklindeki kanca görünümü ile ayırt edilebilmektedirler (52).

Leptospiralar kuru ortamda, 42-45 °C'nin üzerindeki ısılarda, pH'nın 7'nin altında olduğu asidik ve 7,8'in üzerinde olduğu alkali şartlarda ölmektedirler. Fenoller, kuarterner amonyum derivatları, halojenler, aldehitler gibi dezenfektanlar ile ölmektedirler. Protein içeren ortamlarda -70 °C'de saklanabilirler. Leptospiralar

suda iki hafta, hafif ıslak toprakta haftalarca canlı kalabilmektedir. Deniz suyunda 4-5 gün, çeşme suyunda 3-4 hafta yaşayabilmektedir. Parafilmlediği takdirde lamel arasında 24 saat dayanırlar ve liyofilize edilebilirler (36).

Leptospiraların üremesi için nitrojen kaynağı olarak amonyum tuzları, karbon ve enerji kaynağı olarak uzun zincirli yağ asitleri, tiamin ve siyanokobalamin gerekmektedir. Uzun zincirli yağ asitleri beta oksidasyon ile metabolize edilirler. Serum veya albümin içeren besiyeri ve protein içermeyen sentetik besiyerinde üreme olduğu saptanmıştır (99). Primidinlere gerek duymazlar. Karbonhidratları fermente etmezler (36).

Patojenik leptospira türleri kan, idrar ve serebrospinal sıvı örneklerinden in vitro olarak üretilmektedir. Kültür için optimum sıcaklık 28-30 °C iken, optimum pH ise 7,2-7,6 arasındadır. İzolasyon için yarı katı besiyeri Fletcher ve Noguchi, sıvı besiyerleri Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), Korthof, Stuart, Vervoost, katı besiyeri Cox ve polisorbitat-albümin besiyeri gibi özel besiyerleri gerekmektedir (40,87,89,97). Bu yüzden leptospira düşünüldüğü takdirde laboratuvara bilgi verilmelidir.

Seçici besiyerine 5 florourasil, gentamisin, nalidiksik asit, rifampisin gibi diğer bakterilerin üremesini engellemek için inhibitörler eklenmektedir. Patojenik ve saprofitik leptospiraların ayırımında 13 °C'de üreme ve 8 azaguanine duyarlılık kullanılmaktadır (99-101). Üreme genellikle bir-iki haftada gerçekleşmektedir ancak üç ayı da bulabilmektedir. Son dönemde daha hızlı üreme sağlanması, tek koloni izolasyonu ve antimikrobiyal duyarlılık testinin daha kolay yapılması için katı agarın kullanıldığı yeni bir metod da geliştirilmiştir (102).

2.5. Patogenez ve Virülans

Leptospiralar vücuda kesikler, sıyrıklar, müköz membranlar (konjonktiva, oral mukoza) veya mikroskopik damlacıkların aerosol inhalasyonu yolu ile girebilmektedir (1). Springfield’de 1998 yılındaki triatlon yarışması sonrasında gelişen büyük bir leptospiroz salgınının irdelendiği bir vaka-kontrol çalışmasında saptanan kontamine göl suyunun yutulması, tanımlanmış tek davranışsal risk faktörüdür (103). Etkenin sindirim yoluyla alındığı durumda bağırsaklardan ziyade oral mukoza daha önemli bir giriş yoludur.

Leptospiralar bağlayıcı proteinleri (LipL32, Loa22, LigA, LigB, LigC, LenA) aracılığı ile endotelyal ve epitelyal hücrelere, fibroblastlara, monositlere, makrofajlara bağlanmaktadır. Leptospiralar hızlı bir şekilde kan dolaşımına penetre olmakta ve kanda mililitrede 10^5 - 10^7 mikroorganizmaya ulaşmaktadır (96,104). Merkezi sinir sistemi ve gözdeki aköz hümör de dahil olmak üzere doku bariyerlerine penetrasyon gelişmektedir (1). Leptospiralar aksiyel filamentleri sayesinde gelişen helikal hareketler ve hiyaluronidaz enziminin üretimi ile yayılmaktadır. Leptospiraların komplemanlara ve fagositoya dirençli olması enfeksiyonun yayılmasında majör etkisi olan önemli bir faktördür. Hastalığın septik fazında leptospiralar konakta hızlı bir şekilde yayılmaktadır (88,99,104). Bu yayılmayı takiben çoğalma ve dokularda toksik enzimlerin üretimi geniş spektrumlu klinik semptomlar ile seyreden sistemik hastalık tablosuna neden olmaktadır (40,104). Spiroketlerin transendotelyal geçişi ile sistemik bir vaskülit tablosu gelişmektedir (1).

İmmünkompleks çökmesi de dahil olmak üzere konağın bağışıklık yanıtı endotelial hasarda rol alabilmektedir (105). Antikorlar ve fagositik hücreler tarafından diğer tüm bölgelerden temizlendikten sonra anatomik olarak bazı bölgelerde ve immünolojik olarak korunmuş alanlarda leptospiralar varlığını sürdürebilmektedir. Bu alanlardan en önemlisi renal tübüllerdir (100). Ciddi vasküler hasar, pulmoner hemorajiye, renal kortekste iskekiye, tübüler epitelyal hücrelerde nekroza, karaciğer yapısında destrüksiyona, sarılığa ve nekrozla birlikte veya nekroz olmadan karaciğerde hücre hasarına neden olabilmektedir (106). Ciddi olgularda ekstremitelerde nekrozun görüldüğü vaskülit gelişebilmektedir (107).

Leptospiraların hastalık yapma mekanizmaları net olarak anlaşılamamıştır. Bağışıklık mekanizmaları, toksin üretimi, adezinler ve diğer yüzey proteinleri potansiyel virülans faktörleridir. İnsanlarda leptospiroza duyarlılık, doğal bağışıklık sisteminin leptospiral LPS'yi zayıf düzeyde tanınmasıyla ilişkili olabilir (108,109). LPS leptospiralarda majör antijenik determinanttır. Yapısal ve immünolojik olarak Gram negatif bakterilerdeki LPS'ler ile benzerlik göstermektedir. Ancak onlara kıyasla toksisitesinin daha düşük olması ile karakterizedir (90). Yapısal çeşitliliğine bağlı olarak 300'den fazla serovar ayırt edilebilmektedir ve oluşan antikorlar serovar tiplerine spesifiktir (96,99,100). Çok düşük düzeydeki Gram negatif LPS'lere (endotoksin) yanıt veren insan toll-like reseptör (TLR) 4'ün leptospiral LPS'yi bağlayamadığı düşünülmektedir (109,110). Bu durumun leptospiraların lipid A yapısındaki metillenmiş fosfat rezidüsüne bağlı olabileceği düşünülmektedir (92).

Leptospirozda semptomların şiddetini etkileyen faktörlerden biri bağışıklık ile ilişkili mekanizmalar olarak kabul edilmektedir (111). Triatlon salgını ile ilgili

yapılan bir araştırmada insan l6kosit antijeni (HLA) DQ6 leptospiroz i7in bağımsız bir risk fakt6r6 olarak tanımlanmıştır (112). HLA-DQ6 polimorfizminin yapısal lokasyonunun hastalık ile ilişkisi, leptospiraların duyarlı kişilerde nonspesifik olarak T-h6cre aktivasyonuna neden olan bir s6perantijen 6rettiğini d6ř6nd6rmektedir. Dolaşan imm6n kompleksler, antikardiyolipin antik6rlar ve antiplatelet antik6rlar gibi diğer bağışıklık mekanizmaları da 6ne s6r6lm6řt6r ancak patogenezdeki 6nemleri kanıtlanmamıştır (1). Atlarda rek6rren 6veit ve buna bağlı gelişen gece k6rl6đ6 leptospiralar ile direkt enfeksiyon sonucu gelişebilir (113). Bu durum atlardaki patojenik serovarlar ile yapı benzerliği olan konak epitoplarına karşı oluşan antik6rlara bağlı da gelişebilmektedir (114).

Bazı 7alışmalar y6zey lipoproteinlerinin leptospiroz patogenezindeki rol6 6zerine odaklanmıştır (115). Sadece patojenik serovarlarda bulunan ve yapısı y6ksek d6zeyde korunmuş (primer aminoasit sekansı % 98'e varan oranlarda uyumludur) LipL32, maj6r y6zey lipoproteinidir (90,116). Molek6ler ağırlığı 32 kilo Dalton'dur (kDa) ve 251 aminoasitten oluşmaktadır. Dış membrandaki protein ağırlığının % 75'ten fazlasını oluşturmaktadır. LipL32 insanlardaki bağışıklık yanıtında maj6r hedef konumundadır. Adezin gibi rol alarak kollajen I, kollajen V, laminin, kollajen IV ve plazma fibronektin gibi konak h6cre proteinlerine de bağlandığı saptanmıştır (117-119). Bu lipoproteinin t6b6lointerstisyel nefrit patogenezinde de rol aldığı d6ř6n6lmektedir (120).

Genetik olarak tanımlanmış ilk vir6lans fakt6rlerinden birisi de OmpA tipi proteinlere benzeyen ve ekstrasel6ler matriks proteinine zayıf olarak bağlanan

Loa22'dir. Patojenik serovarlarda yapısı yüksek düzeyde korunmuştur. Bu da majör virülans faktörlerinden biri olduğunu doğrulamaktadır (104,121).

Virulan leptospiralar konak dokularında artan osmolariteye; fibronektin, fibrinojen ve diğer ekstraselüler matriks faktörleri ile etkileşimde rol alan multifonksiyonel Lig yüzey proteinleri salınımı aracılığı ile yanıt vermektedir (122). LigA, LigB ve LigC (leptospiral immünglobulin benzeri proteinler) yüzey ilişkili proteinlerdir. Sadece patojenik leptospiralarda bulunurlar. Bu proteinler bakteriyel hücrelerin; fibrinojen, elastin, tropoelastin, kollajen I, kollajen IV ve laminin gibi ekstraselüler matriks proteinlerine bağlanmasında rol almaktadır (96,104,121). Lig proteinleri erken antijenlerdir. Enfeksiyon sırasında bu proteinlerin immünglobulin benzeri yapılarına karşı gelişen IgM tipi antikorlar akut enfeksiyonun saptanması için önem arz etmektedir (123).

Leptospiralardaki yüksek motilite periplazmik aralıkta bulunan iki flajella ile sağlanmaktadır. Bu flajellalar birbirinden tamamen farklı FlaA ve FlaB proteinlerinden oluşmaktadır. Ciltteki sıyrıklardan penetrasyon temel olarak filamentlerin yüksek motilitesine bağlıdır (124,125). Bu proteinler sadece patojenik serovarlarda bulunduğundan virülans faktörü olarak kabul edilmektedir. FlaB ayrıca patojenik leptospiraların moleküler biyolojik yöntemlerle saptanması için uygun bir marker olarak seçilmiştir (124).

Endostatin benzeri LenA proteini, konak hücrenin plazminojenine bağlanmakta ve plazminojeni plazmine dönüştürebilmektedir. Fibrinojen miktarının azalması mikroorganizmanın hızlı bir şekilde yayılmasına zemin hazırlamaktadır

(104). Bu protein faktör H ve kompleman düzenleyici proteini bağlamakta ve serumda bağışıklık sistemine karşı dirençte önemli bir rol üstlenmektedir (126).

Direkt doku hasarı sfingomyelinaz, fosfolipaz, por oluşturuucu proteinler gibi görev yapan hemolitik toksinlere bağlı olabilir (127). Sfingomyelinaz C, H ve LipL32 olarak bilinen Hap 1 (hemoliz ilişkili protein-1) en sık bahsedilen hemolizinlerdir. Leptospiroz patogenezinde hemolizinlerin önemli faktörler olduğu düşünülmektedir (40,87,99,128). Moleküler biyolojik tetkiklerle hemolizinlerin, sfingomyelinazın üretiminde rol alan yediden fazla gen olduğu saptanmıştır (90).

Sitotoksin, *in vivo* olarak enfeksiyonda makrofajların, polimorf nüveli lökositlerin infiltrasyonu ile gelişen tipik histopatolojik etkiden sorumludur. Fosfolipaz, lipaz, katalaz üretimi ve Na⁺/K⁺ ATPaz inhibitörleri leptospiradaki diğer majör virülans faktörleridir (40).

2.6. Klinik

Leptospira enfeksiyonunun ağırlığı subklinik hastalık sonrası gelişen serokonversiyon tablosundan, klinik olarak tanımlanmış iki klinik sendroma kadar değişen çok geniş bir spektruma sahiptir. Bu iki sendromdan ilki olguların % 90'ını oluşturan kendini sınırlayan sistemik bir hastalık tablosu (anikterik leptospiroz) iken, diğeri böbrek ve karaciğer yetmezliği, hemorajik diyatezle seyreden pnömonit tablolarının eşlik edebildiği potansiyel olarak ölümcül ve ağır seyreden bir hastalık tablosudur (Weil Hastalığı) (15,129,130). Bazı hastalarda hastalığın iki fazı bulunmaktadır. Başlangıçtaki bakteremik dönem sonrası ateş geçici olarak düşmekte

ve bunu ağır semptomların görüldüğü immün faz takip etmektedir. Ancak çoğu ağır olguda bu iki faz arasındaki ayırım belirgin değildir ve hastaların çoğu ikinci fazın başlaması ile kliniğe başvurmaktadır (1).

Leptospirozun ortalama inkübasyon periyodu yaklaşık 10 gündür (5-14 gün). Belirgin bir maruziyet öyküsü saptanamayabilir. Bu durum inkübasyon periyodunun kesin olarak tahmin edilmesine engel olmaktadır. Hastalığın akut bakteremik fazı aniden yükselen remittan tipte ateş (38-40 °C) ile başlar. Başağrısı, titreme, miyalji, pürülan akıntının olmadığı konjonktival hiperemi, karın ağrısı, iştahsızlık, bulantı, kusma, ishal, öksürük, farenjit ve nadiren pretibiyal maküler kutanöz erüpsiyon görülebilmektedir. Olguların % 25-35'inde nonprodüktif öksürük, yaklaşık % 50'sinde ise bulantı, kusma ve ishal gelişmektedir (52). Artralji, kemik ağrısı, boğaz ağrısı ve karın ağrısı daha az görülen semptomlardır (131). Çocuklarda leptospirozda, akalkülöz kolesistit ve pankreatit tanımlanmıştır (132). Eksudanın olmadığı konjonktival hiperemi, özellikle baldırlarda ve bel bölgesinde görülen kas ağrıları en karakteristik bulgulardır ancak olguların küçük bir kısmında görülmektedir (1). Oküler semptomlar akut enfeksiyondan sonraki birkaç gün içinde görülebileceği gibi 18 ay sonrasında bile ortaya çıkabilmektedir (90).

Bir olgu serisinde konjonktival hiperemi, hastaların % 55'inde saptanmıştır (133). Bu bulgu diğer enfeksiyon hastalıklarında nadiren görüldüğünden nonspesifik febril hastalıkla gelen olgularda saptanması leptospira ihtimalini yükseltmektedir (52). Kas ağrısı, splenomegali, lenfadenopati, farenjit, hepatomegali, kaslarda rijidite, anormal akciğer dinleme bulguları ve ciltte döküntü hastalığın % 7-40'ında görülmektedir (134,135). Akut faz 5 ila 7 gün sürer. Rutin laboratuvar testleri

nonspesifiktir ancak bakteriyel enfeksiyonu düşündürülebilir. Hastalığın akut fazında leptospiralar kandan ve beyin omurilik sıvısından (BOS) izole edilebilir ancak bu fazda meningeal bulgular belirgin değildir. Semptomlar başladıktan yaklaşık 5-7 gün sonra leptospiralar idrardan izole edilebilir. İdrar tetkikinde hafif proteinüri, pyüri, hematüri, hyalen ve granüler silindirler görülebilir. Akut fazda ölüm nadiren görülmektedir (1,135,136).

Hastalığın immün fazı genellikle 4 ila 30 gün sürmektedir. Leptospiralara karşı gelişen IgM tipi antikorların ortaya çıkışı ile kanda ve BOS'ta bakteriler kaybolmaktadır (137,138). Mikroorganizmalar neredeyse tüm dokularda, organlarda bulunmakta ve hastalığın şiddetine bağlı olarak da idrarda haftalarca saptanabilmektedir. Akut fazda tanımlanan semptomlara ek olarak immün faz; sarılık, böbrek yetmezliği, miyokardit, kardiyak aritmiler, pulmoner semptomlar, aseptik menenjit, hemorajinin eşlik edebildiği konjonktival hiperemi, üveit, fotofobi, gözde ağrı, rabdomyoliz, kas ağrısı, adenopati, hepatosplenomegali belirti ve bulgularından herhangi biri veya tamamı ile karakterize olabilir. Karın ağrısı nadir değildir ve pankreatit göstergesi olabilir (1,139-142).

Semptomatik veya asemptomatik aseptik menenjit, hastalığın immün fazında olguların % 80'ine varan oranda görülen karakteristik bir tablodur. Genellikle bu tablo direkt enfeksiyondan ziyade mikroorganizmaya karşı gelişen konak immün cevabına bağlanmaktadır (135). Ancak yapılan bir çalışmada BOS'ta anormal bulguların olduğu, leptospirozun serolojik olarak doğrulandığı olguların % 90'ında polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile leptospira DNA'sı saptanmıştır (143). Leptospirozun serolojik olarak doğrulandığı 8 olgunun postmortem değerlendirildiği

diğer bir çalışmada ise 3 olguda beyin dokusu veya BOS rneklerinde PZR ile leptospira DNA pozitif saptanmıştır (144). Endemik bölgelerde aseptik menenjit olgularının önemli bir kısmı leptospira enfeksiyonuna bağlı olabilmektedir (145). Semptomatik hastalar, deliryumun eşlik edebileceği şiddetli, zonklayıcı, bitemporal ve frontal başağrısı ile başvurmaktadır. Ender olarak koma, meningoensefalit, hemipleji, transvers myelit ve Guillain-Barre sendromu gibi ciddi nörolojik komplikasyonlar grlebilmektedir (40,146).

Ciddi hastalık tablosunun en belirgin formu hastalığın akut fazından sonra gelişebilen, karaciğer ve böbrek fonksiyonlarında bozulma ile karakterize olan Weill hastalığıdır. Daha ciddi olgularda, semptomların karakteristik olarak akut fazdan fulminan hastalık tablosuna ilerlemeden, direkt olarak 40  C'nin üzerinde ateş, ani başlangıçlı karaciğer yetmezliği, akut böbrek yetmezliği, pulmoner hemoraji, kardiyak aritmi ve dolaşım kollapsı grlebilmektedir (137,147). Hastanede yatan leptospiroz olgularında mortalite % 4-52 arasında değişmektedir (139,148-151).

Hindistan'da yoğun bakımda takip edilmiş leptospiroz tanılı 60 hastanın incelendiği retrospektif bir çalışmada; 46 hastada (% 77) oklu organ yetmezliği saptanırken, mortalite oranı % 52 olarak bulunmuştur (148). Yeni Kaledonya'da yapılan retrospektif vaka kontrol çalışmasında ciddi leptospiroz gelişimi açısından, semptomlar başladıktan sonraki 2 gün içinde antibiyotik tedavisinin başlanmaması ve *Leptospira interrogans* serogrup Icterohaemorrhagiae ile enfeksiyon gelişmesi risk faktörleri olarak belirlenmiştir (152).

Hastanede yatan 840 ciddi leptospiroz olgusunun değerlendirildiği bir çalışmada, olgu fatalite hızı % 14 olarak saptanmış ve ölüm riskinin özellikle 40 yaş

ve üstü erişkinlerde arttığı belirlenmiştir (153,154). Hindistan'da 2002 yılındaki 282 leptospiroz olgusunun retrospektif olarak değerlendirildiği bir çalışmada, mortalite için risk faktörleri pulmoner ve santral sinir sistemi tutulumu olarak saptanmıştır (150). Mental durum değişikliği ölümün en güçlü göstergesi olarak tespit edilmiştir (153,155). Diğer zayıf prognoz göstergeleri ise akut böbrek yetmezliği (oligüri, hiperkalemi, serum kreatinin değerinin 3 mg/dl'nin üzerinde olması), solunum yetmezliği (dispne, akciğerlerde ral duyulması, akciğer grafisinde infiltrasyonlar), hipotansiyon ve aritmidir (153).

Sarılığı olan hastalarda, hafif ve nonspesifik patolojik bulgulara göre oldukça orantısız bir şekilde karaciğer fonksiyon bozukluğu görülmektedir. Sarılık mikstir. Kas hücre nekrozu ile indirekt bilirubin artmaktadır. Serum bilirubin seviyesinin artmasında hepatosit fonksiyon bozukluğu, böbrek yetmezliğine sekonder atılımın azalması gibi nedenler başta gelmektedir. Sarılık uzun sürede düzelir. Böbrek yetmezliği olmadan karaciğer yetmezliğine bağlı ölüm neredeyse hiç görülmemektedir. Karaciğer yetmezliği genellikle geri dönüşümlüdür. Otopsilerde Kupffer hücrelerinde hipertrofi, belirgin kolestaz, eritrofagositoz ve mononükleer hücre infiltrasyonu gibi hepatositlerde dejeneratif değişiklikler görülmektedir ancak hepatoselüler nekroz saptanmaz. Bu tablo hücresel fonksiyon bozukluğu nedeniyle gelişmektedir (107,156).

Böbrek tutulumunda başlangıçta karakteristik olarak tek başına non oligürik, hipokalemik böbrek yetmezliği görülmektedir. Sodyum reabsorpsiyonunda bozulma, distal tüplerden sodyum kaybında artış ve potasyum kaybı gerçekleşmektedir. Sodyum reabsorpsiyonundaki bozulmanın, seçici olarak proksimal tübül epitelindeki

sodyum-klor kanalının kaybına bağı olduğu düşünölmektedir (157). Trombositopeni dissemine intravasköler koagölasyon olmaksızın gelişebilmekte ve ilerleyici böbrek fonksiyon bozukluğına eşlik edebilmektedir (158). Böbrek biyopsisinde akut interstisyel nefrit saptanmakta, immün kompleks glomerulonefriti de görölebilmektedir (159). Eğer elektrolit ve sıvı kaybı yerine konulmaz ise hastalarda oligürük böbrek yetmezliğı gelişmektedir. Destekleyici renal replasman tedavisi ile genellikle tam iyileşme görölmektedir. Ölümcöl olgularda böbrekler ödemli ve sarı renklidir, kortikal kan damarları belirginleşmiştir (106,160). Histolojik olarak fokal tübüler nekroz alanlarının eşlik ettiğı, lenfositler, plazma hücreleri, makrofajlar, polimorf nüveli lökositler gibi inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonunun göröldüğü diffüz, karışık tübülointerstisyel nefrit görölmektedir (156).

Karaciğer ve böbrek yetmezliğı olmadan da gelişebilen ciddi pulmoner hemoraji sendromu (CPHS) enfeksiyonda belirgin bir tablo olarak görölebilmektedir (161). Hastalığın akut fazında öksürökle birlikte eş zamanlı olarak aşık hemoptizi ortaya çıkabilir (162). Ancak sıklıkla hastalar entübe edilene kadar hemoraji fark edilememektedir. Yüksek endemisite bölgelerinde gözden kaçabilmektedir (163). Peru'da serolojik ve klinik olarak leptospiroz tanılı 321 hastanın % 3,7'sinde ciddi pulmoner bulgular saptanmış ve bu hastaların % 71'i kaybedilmiştir (164). Klinisyenler hemoptizi olsun ya da olmasın solunum sıkıntısı bulguları olan hastalarda CPHS'den şüphelenmelidir (1).

Tüm mukozalardan kanama görölebilmektedir. Gastrointestinal ve genitoüriner sistemlerden de kanama meydana gelebilir. Trombositopeninin de geliştiğı dissemine intravasköler koagölasyon (DİK) tablosu ile karşılaşılabılır (52).

İlerleyici pulmoner tutulumda radyografik anormallikler en çok alt loblarda görülmektedir. Kar tanesi benzeri küçük nodüler dansitelerden, yamalı alveolar infiltrasyona ilerleme görülmektedir. Nadiren birleşen konsolidasyonlar gelişebilmektedir (165). Patolojik olarak bu infiltrasyonlar alveolar hemoraji, akut respiratuvar distress sendromu (ARDS) ve pulmoner ödem göstergesi olabilir (165,166). CPHS patofizyolojisinde ARDS’de olduğu gibi diffüz akciğer hasarı, gaz alışverişinde bozulma görülmekte ve septik şok göstergesi olan hemodinamik değişiklikler meydana gelmektedir (167). Otopsilerde akciğerlerde yaygın konjesyon görülmekte ve fokal hemoraji alanları saptanmaktadır (156). Histolojik olarak kapiller endotelyum hasarı konjesyona neden olmakta, bu da interstisyel ve intraalveolar hemoraji, diffüz alveolar hasar ve ciddi hava boşluğu disorganizasyonu ile sonuçlanmakta ancak inflamatuvar hücre infiltrasyonu bulunmamaktadır (168).

Nadiren konjestif kalp yetmezliği gelişmektedir. Oysa nonspesifik elektrokardiyografik değişiklikler sık görülmektedir. Sürekli kardiyak monitörizasyon yapılan hastaların % 50’den fazlasında atriyal fibrilasyon, atriyal flutter, atriyal taşikardi, prematür ventriküler kasılmalar ve ventriküler taşikardiye neden olan kardiyak irritabilite gibi kardiyak aritmi tabloları görülebilmektedir (169). Atriyal fibrilasyon daha ciddi hastalık tablosu ile ilişkilidir (170). Hızlı bir şekilde, şokun eşlik ettiği kardiyovasküler kollaps gelişebilmekte ve agresif destek tedavisi yapılmadığı takdirde ölümcül olabilmektedir. Otopsilerde iletim sisteminin inflamatuvar tutulumunun olduğu interstisyel miyokardit görülmektedir. Kas hücre nekrozu ile purkinje hücrelerinde hasar meydana gelmektedir (1). Postmortem değerlendirmelerde akut koroner arterit ve aortit de sık olarak saptanmaktadır (171).

2.7. Laboratuvar

Rutin laboratuvar testleri nonspesifik olabilir. Beyaz küre sayısı genellikle 10000/ μ L'nin altındadır ancak 3000 ila 26000/ μ L arasında olabilir. Hastaların üçte ikisinde sola kayma görülmektedir (52). Trombositopeni görülebilir. Tayland'da 79 leptospiroz olgusunun % 38'inde trombositopeni saptanmıştır (172). Olgu sunumlarında pansitopeni ile prezente olan hastalar bildirilmiştir (173).

Ciddi leptospirozda genellikle hiponatremi, hipokalemi görülmektedir. Elektrolit transport sistemlerine direkt etki sonucu sodyum ve potasyum kaybı gelişmektedir. Leptospiradaki bir dış membran proteini Henle'nin çıkan kolunda sodyum-potasyum-klor transport aktivitesini inhibe etmektedir. İdrar tetkiklerinde proteinüri, pyüri, granüler silendirler, bazen de mikroskopik hematüri saptanabilir (52). Ciddi olgularda böbrek yetmezliği gelişebilir. Hastalığın akut fazında kan üre nitrojeni değeri genellikle 100 mg/dl'nin altında, serum kreatinin değeri ise genellikle 2-8 mg/dl'nin altındadır (157).

Kas hücre nekrozuna bağlı hastaların yaklaşık % 50'sinde kreatin kinaz yüksekliği görülmektedir. Bu durumdaki hastalar yürümekte zorlanmaktadır. Bu tanı açısından faydalı bir ipucu olabilir (174).

Ciddi leptospirozda sarılık gelişebilir. Serum bilirubin seviyeleri 80 mg/dl'ye kadar çıkabilmektedir. Serum transaminazları, aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) değerlerinde ise daha hafif derecede yükselmeler görülmekte ve nadiren 200 U/L'yi geçebilmektedir. Viral hepatitlerdekine aksine leptospirozda tablo bu şekilde görülmektedir (52,129).

Toplam hücre sayısının genellikle $500/\text{mm}^3$ 'ün altında olduğu bir lenfositik pleositoz görülmektedir. BOS protein seviyesi 50 ila 100 mg/ml arasında olup, hafif olarak artmıştır. BOS glukoz konsantrasyonu ise genellikle normaldir. Nadiren glukoz konsantrasyonu düşük saptanabilir (40,146).

2.8. Ayırıcı Tanı

Leptospirozun diğer enfeksiyon hastalıklarından ayrımı zor olabilmektedir. Leptospirozda görüldüğü takdirde konjonktival hiperemi diğer enfeksiyon hastalıklarında nadiren görüldüğünden en önemli ayırıcı özelliklerden biridir.

Ayırıcı tanıda düşünülmesi gereken enfeksiyonlar şu şekilde özetlenebilir (52):

- Malarya ve Deng Humması leptospiroz ile benzer klinik özelliklere ve endemik paternlere sahiptir.
- Çalılık tifüsü, leptospirozun görüldüğü bazı tropikal bölgelerde yaygın bir enfeksiyon hastalığıdır.
- Diğer riketsiyal hastalıklar, *Rickettsia typhi* enfeksiyonları (fare tifüsü), benekli ateş yapan riketsiya enfeksiyonları leptospirozu taklit edebilir.
- Özellikle gastrointestinal şikayetlerin ön planda olduğu tifoid ateşin yaygın olduğu tropikal bölgelerde *Salmonella typhi* enfeksiyonları leptospiroz ile karışabilir.

- Erlihyoz, ateş ve nonspesifik şikayetler ile leptospiroza benzer klinik bulgularla karşımıza çıkabilir. Özellikle solunum sistemi semptomlarının ön planda olduğu influenza gibi akut viral hastalıkların kliniği leptospiroza benzeyebilir.
- Hantavirüs enfeksiyonlarında görülen renal ve pulmoner sendromlar klinik olarak leptospirozdaki renal ve pulmoner komplikasyonlara benzeyebilir.
- Akut viral hepatitler
- Sepsis

Leptospiroz birçok hastalık ile karışabileceğinden bütün enfeksiyon hastalıklarında olduğu gibi hastanın hikayesi, sistemik semptomların sorgulanması ayırıcı tanıda önem arz etmektedir.

2.9. Tanı

Leptospirozda laboratuvar tanısı zorunludur çünkü gerek insanlarda gerekse hayvanlarda klinik tablo spesifik değildir. Ayrıca endemik bölgelerde benzer enfeksiyon hastalıklarının varlığı tanıda karışıklığa neden olabilmektedir (175).

Leptospirozun laboratuvar tanısında hem direkt (antijen saptanması, kültür ve DNA) hem de indirekt (spesifik antikorların saptanması) yöntemler kullanılabilir (90). Hastalığın ilk dönemi olan ve 3 ila 10 gün süren bakteremik veya akut fazda leptospiralar semptomlar başladıktan sonraki 15 gün boyunca, günler ilerledikçe

miktarları azalmakla birlikte, kanda bulunmaktadırlar (176,177). Hastalığın ilk haftasında spesifik antikorlar henüz oluşmamışken, kan ve serebrospinal sıvı tetkik edilebilir. Bu ilk haftada PZR kullanımı önerilmektedir (178,179). Kanda leptospiraları saptayabilmek için örneklerin antibiyotik tedavisi başladıktan sonraki en geç 2 gün içinde alınması gerekmektedir (180).

Hastalığın ikinci dönemi olan immün faz genellikle semptomlar başladıktan sonraki ikinci haftada görülmekte ve 4 ila 30 gün sürmektedir (180). Bu dönemde artan antikor titreleri ile kandan leptospiralar elimine edilmektedir (40). Bu antikorlar MAT ve ELISA yöntemleri ile saptanabilir. Bu dönemde tipik olarak idrarda da leptospiralar bulunmaktadır (88,181,182). Leptospiralar semptomlar başladıktan 10 gün sonra idrarda ve BOS'ta saptanabilir. İdrarda leptospiraları saptamak için idrarın alkalileştirilmesi önemlidir (40).

Leptospira antijenleri veya DNA'sı, bazı leptospiroz olgularında akut fazda zayıf veya kısa süreli leptospiremi olması, örneğin geç alınması veya antibiyotik kullanımı ile leptospiraların elimine olmasına bağlı olarak kanda saptanamayabilir. Hastalığın akut fazında serokonversiyon gelişmeden önce örnek alınması antikor saptanmasında yalancı negatif sonuçlar verebilir (180).

Yapılacak test yöntemine göre koagüle olmuş (serum ve pıhtı içeren) veya koagüle olmamış (plazma, kırmızı ve beyaz kan hücreleri, plateletler) kan örnekleri kullanılabilir. Birçok otör gen amplifikasyon yöntemleri için etilendiamin tetra asetik asitli (EDTA) plazmanın en iyi örnek olduğunu belirtmişlerdir. Aksine serum ve heparinize plazma ise daha az sensitiftir (183-187). Serolojik testler için serum veya

plazma kullanımı ile benzer sonuçlar alınmaktadır ancak serum tercih edilmelidir (188).

Nükleik asitlerin pürifikasyonuna dayanan kanda ve idrarda leptospira DNA'sının hızlı bir şekilde izolasyonunu sağlayan birçok kit bulunmaktadır (187). Manyetik boncukların kullanımı örneklerdeki nükleik asitlerin ve örneklerin konsantre edilmesini sağlayabilir (189,190).

2.9.1. Direkt Tanı Metodları

2.9.1.1. Direkt mikroskopi

Leptospiralar 6-20 µm uzunluğunda ve 0,15 µm çapında oldukları için kanda ve idrarda bakterileri direkt olarak görebilmek için karanlık alan mikroskopisi kullanılmaktadır. Preparatın gümüş nitrat ile boyanması ile karanlık alan mikroskopunda karanlık fonda gümüş pırıltılı leptospiralar görülmektedir. Leptospirozun akut fazında mililitrede 10^2 - 10^6 leptospira bulunabilir. Kan örneklerinde bakterileri direkt olarak görebilmek için eşik değer mililitrede 10^4 mikroorganizmadır (177,191). Teorik olarak leptospiralar kanda direkt mikroskopi ile semptomlar başladıktan sonraki ilk hafta içinde görülebilir. Bu yöntem ucuzdur ancak karanlık alan mikroskopuna ihtiyaç duyulur. Ayrıca hücre debrisleri ve diğer artefaktlar nedeniyle yalancı pozitiflik riski de önemli bir noktadır. Bu nedenle bu yöntemde sensitivite (% 40,2) ve spesifite (% 61,5) düşüktür (192). Leptospiraların direkt olarak saptanması için immünofloresan, immünoperoksidaz ve gümüş boyama gibi birçok boyama yöntemleri bulunmaktadır. Ancak bu yöntemler ticari olarak ulaşılabilirliklerinin düşük olması ve göreceli olarak düşük sensitiviteyi nedeniyle

yaygın olarak kullanılmamaktadır (1). İmmünohistokimyasal boyama yöntemleri hastalığın erken döneminde etkin olmayabilir (193). Bu boyama yöntemleri geleneksel olarak kullanılan gümüş boyama yöntemine göre daha sensitif ve spesifiktir (16,194,195).

2.9.1.2. Moleküler Yöntemler

Son yıllarda leptospiroz tanısında PZR'ye daha çok başvurulmaktadır. Sensitivitesinin yüksek olması ve erken teşhis sağlaması nedeniyle bazı endemik bölgelerde serolojik metodların yerine kullanılmaya başlanmıştır (180). Real time PZR klasik PZR'den daha hızlıdır ve kontaminasyondan daha az etkilenmektedir. Patojenik leptospiraların saptanması için birçok klasik ve real-time PZR yöntemi geliştirilmiştir. Ancak çok azı klinik kullanım için onaylanmıştır (196-199). Real time PZR ile klinik örneklerden (kan, BOS, idrar ve biyopsi) genin saptanması 3-5 saatte mümkün olabilmektedir. Böylelikle etkenin erken dönemde tanımlanması ile tedaviye hızlı bir şekilde başlanabilecektir (200). Kanda ve idrarda leptospiraların saptanması için eşik değer mililitrede 10-100 bakteridir (183,186,187,201). Standart DNA varlığında bakteriyel yük belirlenebilse de günümüzde kandaki bakteriyel yük ile hastalığın prognozu arasında bir korelasyon bulunmamıştır (40,177,202). PZR pozitifliği örnekte patojenik leptospiranın varlığını gösterir. Erime eğrisi veya sekans analizi ile amplifikasyon ürününün analizi sonucu tür, serovar veya genotip tespiti yapılabilir (203-205).

Patojenik leptospiralardaki majör yüzey antijeni olan LipL32 lipoproteinini kodlayan genin saptanması yeni ve ümit verici bir yöntemdir. Bu antijen sadece patojenik leptospiralarda bulunmaktadır ve yapısı oldukça korunmuştur

(101,206,207). Diğer yeni moleküler tanı yöntemlerinden biri de patojenik leptospiralardaki Fla B'yi kodlayan genin saptanmasıdır (89,207). Cerqueria ve arkadaşları özellikle 'rrs geninde' 16S rRNA amplifikasyonu ile patojenik, intermediate patojenik ve saprofitik leptospira suşlarını ayırdedebilmişlerdir (101). Vital ve arkadaşları ile Aviate ve arkadaşları ise çalışmalarında patojenik ve saprofitik suşları ayırdedememişlerdir (208,209). Moreno ve arkadaşları ise LipL32 geninin saptanmasını önermişlerdir. Patojenik leptospiraların ayırdedilmesinde gelecekte kullanılacak diğer genler rpoB, gyrB, lfb1 ve S-10-spc- α 'dır (207). Ayrıca birçok genin kullanıldığı iki tip multilokus sekans analiz yöntemi de tanımlanmıştır (210).

Son yıllarda leptospiralarda da kullanılan izotermal amplifikasyon testleri geliştirilmiştir (211-213). İzotermal amplifikasyon, PZR'ye iyi bir alternatiftir. Bu yöntemde ısıyı 60-65 °C'de sabit tutmak için termal cycler kullanılmadan sadece bir ısı ünitesi yeterli olmaktadır. Bu da bu yöntemin gelişmekte olan ülkeler için ideal olmasını sağlamaktadır. İzotermal koşullarda bir saat içinde polimeraz DNA ve altı primer ile etkin ve spesifik amplifikasyon gerçekleşebilmektedir. Amplifiye olmuş DNA, floresan ışığı ile veya bulanıklığa çıplak göz ile bakılarak elektroforez jeli kullanılmadan saptanabilmektedir (214). Son dönemde patojenik leptospiraların hızlı bir şekilde saptanması için LipL41 ve rrs genlerini hedefleyen loop-mediated izotermal amplifikasyon (LAMP) testi geliştirilmiştir (211-213).

2.9.1.3. Kültür

Leptospiralar hastalığın ilk 10 gününde kan, BOS ve peritoneal diyalizat sıvısından izole edilebilir. Örnekler hastanın ateşi olduğunda ve antibiyotik

tedavisinden önce alınmalıdır. Bir veya iki damla kan yatak başında direkt olarak besiyerine inoküle edilmelidir. Leptospiraların ticari kan kültürü besiyerlerinde günlerce yaşadığı bildirilmiştir (215). İdrar kültürü hastalığın ilk haftasından sonra alınabilir. İdrar örneği aseptik olarak steril kaba alınmalı ve kısa bir sürede işleme alınmalıdır. En iyi sonuçlar ilk bir saatte işleme alındığında elde edilebilmektedir zira leptospiralar asidik ortamda uzun süre yaşayamazlar. Bu nedenle örnek almadan önce bikarbonat gibi numunelerle idrar alkalileştirilmelidir (216).

Kültürler, yarı katı besiyerleri Fletcher ve Noguchi, sıvı besiyerleri EMJH, Korthof, Stuart, Vervoost, katı besiyerleri Cox ve polisorbata-albümin besiyerlerine ekilmelidir. Primer kültürler, seçici ajan olarak 5-florourasilin eklendiği yarı katı besiyerine ekilmektedir. Başlangıçtaki büyüme çok yavaş olabileceğinden kültürler 30 °C'de haftalarca inkübe edilir (1).

2.9.2. İndirekt Tanı Metodları

Leptospiroz tanısında en sık kullanılan testler indirekt tanı metodları olan serolojik testlerdir (217). Bu testler MAT, ELISA ve indirekt hemagglütinasyon (İHA) testleridir (218,219). Ayrıca endemik bölgelerde erken tanı amacıyla hızlı IgM ELISA testleri de geliştirilmiştir (220,221).

2.9.2.1. Mikroskopik Agglütinasyon Testi (MAT)

MAT veya diğer adıyla Martin ve Pettit Testi yaklaşık 100 yıl önce Pastör Enstitüsü tarafından geliştirilmiştir (222). Bu testte farklı serogrupların canlı antijenleri serum örnekleri ile reaksiyona girmekte, sonrasında karanlık alan mikroskopunda agglütinasyon değerlendirilmektedir. MAT serovar değil serogrup

spesifiktir (180,216,223). Bu test için canlı mikroorganizmalar gerekmede, uygulanması ve değerlendirilmesi için uzman personele ihtiyaç duyulduğundan kısıtlı sayıdaki referans laboratuvarlarda çalışılabilmektedir (1). Tanıda başlangıç titresine göre konvelesan serumda 4 kat artış ile serokonversiyon gelişmesi en spesifik yöntemdir. 1/800 ve üzerindeki titreler akut ya da yakın zamanda geçirilmiş enfeksiyonu gösterir (1,90). Antikor titresine göre enfekte eden serovar saptanamaz. Eğer panelde olmayan serovar ile enfeksiyon gelişirse yalancı negatif sonuçlar çıkabilir (223,224).

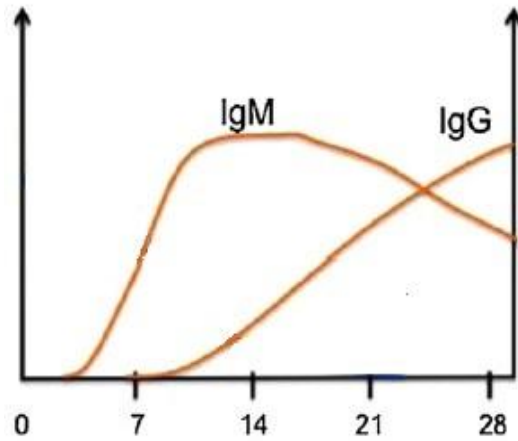
MAT kısıtlı bir epidemiyolojik göstergedir ve sonuçları kesin değildir. Zira kültürde izole edilen suşlarla MAT'da tanımlanan serogruplar arasında her zaman korelasyon saptanamaz (224,225). Semptomlar başladığında alınan örneklerdeki titre 1/200 ve üzerinde ise yeni veya yakın zamandaki enfeksiyon, aşıya bağlı antikor varlığı düşünülebilir. Bu durumda sonucu netleştirmek için ELISA IgM istenmelidir (180,226). Hastaların yaklaşık % 10'unda geç serokonversiyon gelişebilmektedir. Çapraz reaksiyon gösteren antikorlar sifiliz, dönek ateşi, Lyme hastalığı, lejyonella ve otoimmün hastalıklarda görülebilir (227).

MAT'ın değerlendirilmesinde özellikle akut faz örneklerinde serogruplar arasında çapraz reaksiyon gelişebilmektedir (40). Bu durumun IgM antikorlarının yıllarca pozitif kalabilmesine bağlı olduğu düşünülmektedir (228). MAT akut serum örneklerinde göreceli olarak düşük sensitiviteye sahiptir (229).

2.9.2.2. Enzim Linked İmmunosorbent Assay (ELISA)

Bu testte IgM ve IgG antikorları saptanmaktadır. Genellikle nonpatojenik olan *L. biflexa*'nın fikse edilmiş tüm hücre antijenleri kullanılmaktadır

(88,89,180,230). Bu immünoenzimatik yöntem ile leptospiralara karşı gelişen cins spesifik IgM ve IgG tipi antikorlar saptanmaktadır (125,231). MAT leptospiroz tanısında standart test olmakla birlikte klinik laboratuvarlarda rutin tanı testi olarak kullanımını kısıtlıdır. Birçok çalışmada hastalığın akut fazında erken dönemde ELISA'nın MAT'dan daha sensitif olduğu gösterilmiştir (1,175,232,233). PZR ile IgM'yi karşılaştıran çalışmalarda, PZR'nin tek başına tüm hastalık süresi göz önüne alındığında, daha az sensitif olduğu ancak çok erken dönemde ise en sensitif test olduğu gösterilmiştir (234,235). Bu yüzden hastalığın akut fazında leptospiroz tanısında sensitiviteyi artırmada PZR ve ELISA IgM birlikte kullanılabilir (175). Hastalık semptomları başladıktan sonra 4-5'inci günde IgM antikorları saptanabilmektedir ve 5 aydan uzun süre pozitif kalabilmektedir (236). IgG antikor titreleri ise hastalık semptomları başladıktan sonraki 8-9'uncu günlerde yükselmeye başlamaktadır. Serovar tipine ve hastanın immünite durumuna göre değişen sürelerde seropozitiflik devam edebilmektedir (180,237) (Şekil 1).



Şekil 1. Hastalık Günü-Antikor Titresi Grafiği

Intermediate türlerden formalin uygulanmış, kaynatılmış *Leptospira fainei*'nin IgM antikorlarını saptamak için kullanıldığı in-house ELISA yöntemi MAT ile karşılaştırılmış ve çok yakın sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle MAT'a ulaşamadığı durumlarda leptospiroz tanısında hızlı tarama testi olarak kullanılabileceği düşünülmüştür (238).

2.10. Tedavi

Çoğu leptospiroz olgusu antibiyotik tedavisi almadan kendi kendini sınırlamaktadır. Ancak olguların bir kısmı önemli morbidite ve mortaliteye neden olan ciddi komplikasyonlarla seyrebilmektedir. Genellikle hastalık klinik olarak fark edilebilecek şiddette ise ve tanı konulmuşsa antibiyotik tedavisi verilmektedir. Ciddi olgularda renal replasman tedavisi, ventilatör desteği, kan ürünleri ile destekleyici tedavi gerekebilmektedir (239).

Leptospirozdan şüphelenildiğinde mümkün olan en kısa zamanda antibiyotik tedavisine başlanmalıdır. Geç dönemde başvuran hastalarda antibiyotik tedavisinin faydasını göstermek zor olabilir. Ancak Weil Hastalığı gibi ciddi olgularda mutlaka antibiyotik tedavisi verilmelidir. Weil Hastalığı ciddi renal yetmezlik, DİK, akciğer tutulumu ile seyrebileceğinden destek tedavileri ve renal yetmezlik var ise diyaliz şartlarında intravenöz (iv) antibiyotik tedavisi düzenlenmelidir (1,240-243). Genellikle ciddi hastalıkta iv penisilin, hafif hastalıkta ise oral doksisisiklin tedavisi tercih edilmektedir. Günde bir kez seftriakson tedavisinin penisilin kadar etkili olduğu gösterilmiştir (244). Penisilin ile tedavi edilen hastalarda Jarisch-Herxheimer reaksiyonu bildirilmiştir (245). Bu durum spiroketlerin dolaşımdan temizlenmesine

bağlı gelişen akut inflamatuvar bir cevaptır. Klinik olarak ateş, titreme ve hipotansiyon ile karakterizedir. Bu nedenle penisilin alan hastalar bu tarz reaksiyonlar açısından yakından takip edilmelidir (246,247).

Tablo 2. Leptospiroz Tedavisi ve Kemoproflaksisi (1)

Endikasyon	İlaç	Doz
Kemoproflaksi	doksisiklin	Haftada bir kez 200 mg oral
Hafif leptospiroz tedavisi	doksisiklin	2 x 100 mg oral
	ampisilin	4 x 500-750 mg oral
	amoksisilin	4 x 500 mg oral
Orta-ciddi leptospiroz tedavisi	penisilin G	4 x 1,5 milyon ünite iv
	seftriakson	1 x 1 g iv
	ampisilin	4 x 0,5-1 g iv
Diyaliz dozları	penisilin G	4 x 0,75 milyon ünite iv
	seftriakson	1 x 1 g iv
	ampisilin	2 x 0,5-1 g iv

Antibiyotiklerin hafif hastalıkta yararlı etkisi olup olmadığı halen tartışmalıdır (248-251). Cochrane’de yayınlanan bir derlemede antibiyotik tedavisinin mortaliteyi etkilemediği, tedavi ile klinik tablonun 2 ila 4 gün daha hızlı düzeldiği belirtilmiştir (252). Yeni Kaledonya’da yapılan retrospektif bir vaka-kontrol çalışmasında ciddi leptospiroz açısından risk faktörlerinden biri semptomlar başladıktan sonraki 2 gün içinde antibiyotik tedavisinin başlanmamasıdır. Bu durum antibiyotiklerin bazı olgularda ciddi hastalık tablosuna ilerlemeyi engelleyebileceğini düşündürmektedir (152).

Penisilinler, sefalosporinler, tetrasiklinler, kloramfenikol, florokinolonlar, makrolidler, telitromisin, karbapenemler ve aztreonam in vitro olarak leptospiraya karşı etkili bulunmuştur (253-257). Etkenin üretilmesi zor olduğundan, rutinde antibiyotik duyarlılık testi yapılmamaktadır. Hali hazırda direnç sorunu olduğu da düşünülmemektedir. Yeni geliştirilen bir katı besiyeri (LVW agar), rutin test yapılmasını ve klinik cevap alınmadığı durumlarda hızlı bir şekilde ilaç direncine bakılmasını sağlayabilir (258).

Ciddi leptospiroz sistemik bir vaskülit tablosu olduğundan, özellikle pulmoner tutulum varlığında iv kortikosteroid tedavisi düşünülmelidir. Ancak rutin kullanımı için yeterli veri bulunmamaktadır. Bazı yayınlarda ciddi hastalıkta antibiyotik tedavisine ek olarak steroid kullanımının faydalı olabileceği bildirilmiştir (259-262).

Hastanede yatan hastalarda destekleyici tedavi gerekmektedir. İdrar çıkışının fazla olduğu renal disfonksiyonlu ve hipokalemisi olan böbrek hastalığının erken döneminde ciddi dehidratasyonu ve akut tübüler nekrozu önlemek için agresif volüm ve potasyum replasmanı yapılmalıdır. Oligürik böbrek yetmezliğine giren hastaların hızlı bir şekilde diyalize alınması mortaliteyi azaltmaktadır. Hemodiyaliz tipik olarak kısa bir dönem için gerekmektedir (1). Leptospiroza bağlı böbrek disfonksiyonu tam olarak geri dönüşümlüdür (263). CPHS için entübe edilen hastaların akciğer kapasitesi azalmış olup, ARDS gibi tedavi edilmelidirler. Yüksek ventilasyon basıncına bağlı gelişen alveolar hasar gelişimini engellemek için düşük tidal volüm (6 ml/kg altında) gibi koruyucu ventilasyon stratejilerinin ARDS'de surveyi dramatik olarak artırdığı gösterilmiştir (264).

2.11. Korunma

Leptospiradan korunma, yüksek riskli maruziyetlerden kaçınma, koruyucu önlemlerin uygulanması, aşılama ve kemoproflaksinin çevresel koşullar ve kişisel aktivitelere bağlı olarak kombine edilmesi ile sağlanabilir (1). Yüzmede olduğu gibi tatlı su ile temas, hayvanlarla ve onların vücut sıvıları ile temas yüksek riskli maruziyetlerdir (15). Leptospiraları çevreden temizlemek imkansızdır. Ancak potansiyel enfekte hayvanlar ile direkt teması ve idrar ile kontamine olmuş toprak, su ile indirekt teması azaltmak elimizdeki en etkili korunma stratejileridir. Kontaminasyonun azaltılabilmesi için kemirici kontrol önlemlerine sıkı bir şekilde uyulması önemlidir. Uygun koruyucu önlemler yapılan aktiviteye göre değişmekle birlikte çizme, koruyucu gözlük, önlük ve eldiven kullanılabilir (1). Tropikal bölgelerde çıplak ayak ile yürümek yaygın bir risk faktörüdür (265).

Evcil ve çiftlik hayvanlarının aşılama ile farklı düzeylerde koruyuculuk sağlanabilmektedir (266-269). Hayvanların ölü aşılar ile immünizasyonu yaygın bir şekilde kullanılmakla birlikte, bağışıklık kısa süreli olmakta ve genellikle yılda bir kez olmak üzere periyodik aşılama gerekmektedir (270). Ayrıca bu aşılar hastalığa karşı koruyucu iken, enfeksiyon ve renal kolonizasyonu ise önleyememekte, bu nedenle hayvanlarda hastalığın yayılması ve devamlılığına etkileri minimal olmaktadır. Son dönemde sığırlar için geliştirilen yeni aşılar ile serovar Hardjo'ya karşı tip 1 hücreli immünite uyarılmakta ve böylece renal kolonizasyon ve üriner atılım önlenmektedir (271-273).

İnsanlarda aşılama yaygın değildir. Fransa'da yüksek riskli mesleklerde çalışanlar için serovar Icterohaemorrhagiae içeren bir aşı kullanılmakta, Küba'da ise

insanlar için geliştirilmiş bir aşı bulunmaktadır (274). Asya'da büyük salgınlardan korunmak için tarım işçilerinde aşılama daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (1).

Endemik bölgelerde leptospiraya maruziyet kaçınılmaz ise kemoproflaksi önerilmektedir. Panama'da ormanda eğitime giden ve bunun öncesinde temas öyküsü olmayan 900 askerde haftada 200 mg doksisisiklinin etkili olduğu gösterilmiştir. Plasebo alan grupta 20 olguda klinik gözlenirken, doksisisiklin alan grupta sadece 1 olguda klinik gözlenmiştir (275). Endemik bölgelerde aşırı yağışlar sonrasında doksisisiklin proflaksisi değerlendirilmiştir. Güneydoğu Asya'da leptospiroz salgınlarının görüldüğü Andaman adalarında yapılan bir çalışmada; 700'den fazla kişiden randomize olarak bir kısmına doksisisiklin, diğerlerine ise plasebo verilmiş ve doksisisiklin alan grupta klinik enfeksiyon % 3,1 plasebo grubunda ise bu durum % 6,8 olarak saptanmış, doksisisiklin kullanımının salgınların yayılmasını azaltmada çözüm olabileceği belirtilmiştir. Bu vaka ve kontrol gruplarında serolojik olarak enfeksiyon oranı ise eşit bulunmuştur (276). Fotosensitivite, gastrointestinal yan etkilerin fazlalığı, diyetle kalsiyum alınması ile ilgili kısıtlamalar, gebelerde ve çocuklarda kontrendike olması nedeniyle doksisisiklin kullanımı sorunlu olabilmektedir. Azitromisin'in in vitro olarak leptospiralara etkili olması ve serum yarılanma ömrünün uzun olması doksisisikline bir alternatif olabileceğini düşündürmekle birlikte pratikte kullanılabilmesi için klinik çalışmalara ihtiyaç vardır (277).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Çalışma için Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu'ndan 28.01.2013 tarihinde 2013/01 sayı numarası ile yazılı onay alınmıştır ve çalışma Helsinki Deklarasyonu'na ve İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu'na uygun şekilde yürütülmüştür (278,279).

3.2. Çalışma Grubunun Seçimi

Çalışmamıza alınacak kişi sayısını saptamak için; evren hacmi ve araştırdığımız hastalık (olay) sıklığının bilindiğinde uygulanan formül olan $n = \frac{N \cdot t^2 \cdot p \cdot q}{y^2}$ (N: evren hacmi n: örneklem hacmi p: görülme sıklığı/olasılığı q: 1-p=görülmememe sıklığı t: yanılma payı (1.96) y: öngörülen yanılma +/- sapma) formülü kullanıldı (280). Kırıkkale il nüfusu Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2013 yılı verilerine göre 275000 olarak alındı. Leptospira prevalansının ülkemizde yapılmış lokal çalışmaların sonuçlarında riskli gruplarda % 2 ila % 12 arasında değiştiği göz önüne alındığında ve prevalans % 12 kabul edildiğinde riskli grup için örneklem sayısı en az 163 olarak belirlendi.

Leptospiroz açısından riskli meslekleri (çiftçilik, hayvancılık, veteriner, kanalizasyon işçisi), uğraşları (avcılık, bahçe ile uğraşma, gölde-derede yüzme) olan ve diğer risk faktörlerini (ev çevresinde fare görme, mutfakta-kilerde fare dışkısı

görme, ölü veya canlı fare ile temas, av hayvanı ile temas, bahçede-evde köpek besleme) taşıyan kişiler riskli gruba alındı.

Çalışmaya gönüllü olarak katılmayı kabul etmiş ve hasta bilgilendirme formunu okuduktan sonra onam formuna onay (imza) vermiş olan 18-64 yaş aralığındaki bireyler dahil edildi. Herbir katılımcıya anket formu dolduruldu. Anket formunda sosyodemografik veriler ve leptospiroz açısından risk faktörleri sorgulandı.

Çalışmada 2013 yılında Kırıkkale ilinde kırsal bölgede ve kent merkezinde yaşayan leptospiroz açısından riskli 200 (Grup 1) ve kontrol grubu olarak risk grubunda olmayan 200 kişiden (Grup 2), sahada evlerine gidilerek kan örnekleri alındı.

3.3. Laboratuvar Analizleri

Alınan kan örnekleri santrifüj edilerek serum örnekleri çalışma yapılincaya kadar -80 °C'de saklandı. Tüm örneklerin elde edilmesinden sonra Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda *Leptospira* IgM ve IgG antikorları ELISA kiti (Serion Elisa Classic / Institut Serion GmbH Würzburg, Almanya) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı.

3.3.1. Test Prosedürü

- Serum örnekleri ve kitler oda sıcaklığına geldikten sonra IgG için 1000 µl dilüsyon buffer, IgM için ise 800 µl dilüsyon buffer + 200 µl

romatoid faktör absorbent içine 10 µl serum örneği eklenerek serumlar dilüe edildi.

- Dilüe edilmiş serumlar, negatif-pozitif kontrol ve standart (2 adet) serumlarının herbirinden 100 µl kuyucuklara pipetlenerek 37 °C’de 60 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası kuyucuklar her defasında 300 µl yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı. Sonrasında ilk kuyucuk olan substrat blank hariç tüm kuyucuklara 100 µl konjugat solüsyonu eklenerek 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi.
- Konjugat solüsyonu ile inkübasyon sonrası kuyucuklar her defasında 300 µl yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı. Sonrasında tüm kuyucuklara 100 µl substrat solüsyonu eklenerek 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi.
- Substrat solüsyonu ile inkübasyon sonrasında yıkama yapmadan, enzimatik reaksiyonu sonlandırmak için stop solüsyonu eklendikten sonra 60 dakika içinde referans dalga boyu 620-690 nm arasında olacak şekilde 405 nm’de ELISA reader ile optik dansiteler belirlendi.
- Elde edilen optik dansiteler SERION activity programı ile değerlendirildi.

3.4. İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen tüm veriler bilgisayarda Windows işletim sisteminde “Statistical Package for the Social Science” (SPSS) 20 kullanılarak analiz edildi.

Tanımlayıcı istatistiksel analizler (frekans, yüzde dağılımı, standart deviasyon, mean, median, minimum, maksimum) yapıldıktan sonra seroloji sonucuna göre değişkenler ki-kare (χ^2) testi ve gerektiğinde Fisher kesin ki-kare testi ile değerlendirildi. Gruplar arasında yaş ve cinsiyetin dağılımı normallik testleri ile değerlendirildi. Gruplar arasında yaş ve cinsiyetin dağılımının birbirinden farklı olup olmadığı Mann-Whitney U testi ve χ^2 testi ile karşılaştırıldı. $P < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınanlardan % 48'i kadın (n=208), % 52'si (n=192) erkek ve yaş ortalaması $43,70 \pm 12,59$, yaş aralığı ise 18-64 idi (Tablo 3).

Gruplar arasında yaş (p=0,287) ve cinsiyet (p=0,134) dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Tablo 6).

Tablo 3. Grupların Cinsiyet ve Yaş Dağılımı

	Grup 1	Grup 2
Erkek		
sayı (%)	106 (53)	91 (45,5)
yaş ortalaması	$43,37 \pm 12,40$	$46,02 \pm 11,95$
Kadın		
sayı (%)	94 (47)	109 (54,5)
yaş ortalaması	$45,52 \pm 12,43$	$40,75 \pm 12,91$
Toplam		
sayı	200	200
yaş ortalaması	$44,38 \pm 12,43$	$43,02 \pm 12,75$

Öğrenim durumlarına bakıldığında % 33,5'i (n=134) üniversite, % 19,3'ü (n=77) lise, % 9,3'ü (n=37) ortaokul, % 33,5'i (n=134) ilkokul mezunu iken, % 4,5'inin (n=18) ise okuryazarlığı yoktu (Tablo 4).

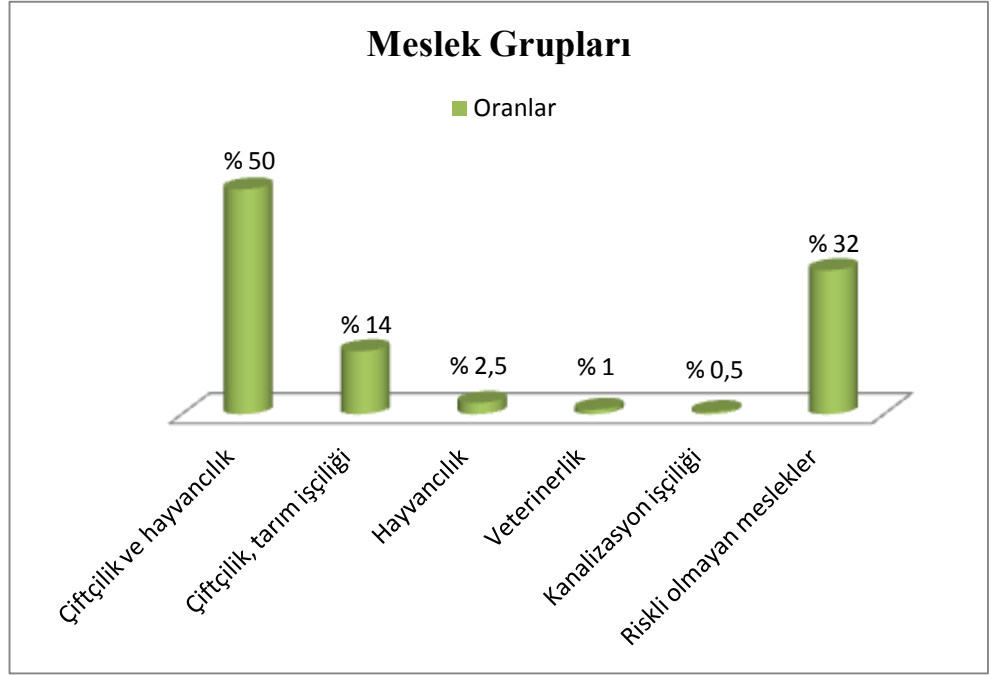
Tablo 4. Olguların Öğrenim Durumları

	Okuryazar değil n (%)	İlkokul n (%)	Ortaokul n (%)	Lise n (%)	Üniversite n (%)
Grup 1	17 (8,5)	87 (43,5)	23 (11,5)	31 (15,5)	42 (21)
Grup 2	1 (0,5)	47 (23,5)	14 (7)	46 (23)	92 (46)
Toplam	18 (4,5)	134 (33,5)	37 (9,2)	77 (19,2)	134 (33,5)

Çalışmaya alınanlardan % 39'u (n=156) kırsal bölgede, % 61'i (n=244) kent merkezinde yaşamakta idi. Grup 1'de yer alanların % 76'sı (n=152) kırsal bölgede, % 24'ü (n=48) kent merkezinde yaşarken Grup 2'de yer alanların % 98'i (n=196) kent merkezinde, % 2'si (n=4) ise kırsal bölgede yaşamakta idi.

Olguların % 66'sının (n=264) mesleği leptospiroz açısından risk taşıırken, Grup 1'deki olguların en fazla olan meslekleri çiftçilik ve hayvancılık olarak belirlendi (Şekil 2).

Şekil 2. Grup 1 'deki Meslekler



Serum örneklerinin % 2,25'inde (n=9) *Leptospira* IgG pozitif bulunurken, *Leptospira* IgM pozitifliği saptanmadı. Grup 1'de 8 kişide (% 4), Grup 2'de ise 1 kişide (% 0,5) *Leptospira* IgG pozitif olarak tespit edildi (Tablo 5). İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,037).

Tablo 5. Gruplara Göre *Leptospira* Seropozitifliği Oranları

	Leptospira Seropozitifliği	
	sayı (n)	yüzde (%)
Grup 1	8	4
Grup 2	1	0,5
Toplam	9	2,25

Serolojik olarak pozitif (*Leptospira* IgG) bulunan 9 olgunun 5'i erkek, 4'ü ise kadın idi. Cinsiyet ile seroloji pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0,743$). Yaş ortalaması leptospira seroloji pozitif olgularda $47,11 \pm 10,71$, seroloji negatif olgularda ise $43,62 \pm 12,63$ saptandı. Yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,503$). Seroloji pozitif olguların tamamı ilkokul mezunu idi.

Leptospira IgG pozitif bulunan 9 olgunun 7'si kırsal bölgede, 2'si ise kent merkezinde yaşamakta idi. Kırsal bölgede yaşamak istatistiksel olarak anlamlı bir risk faktörü olarak tespit edildi ($p=0,031$). Kırsal bölgedeki bu 7 olgu çiftçilik ve hayvancılık ile uğraşır iken, kent merkezindeki 2 olgunun mesleği leptospiroz açısından riskli grupta değil idi.

Bahçede köpek beslemek ($p=0,001$) ve ev çevresinde fare görmek ($p=0,001$) leptospira seroloji pozitifliği için istatistiksel olarak anlamlı risk faktörleri olarak tespit edildi.

Leptospira serolojik inceleme sonuçlarına göre sosyodemografik veriler, leptospiroz açısından risk faktörleri ve risk faktörlerine göre grupların istatistiksel analizleri Tablo 6'da gösterilmektedir.

Tablo 6. Leptospira Seroloji Sonuçlarına Göre Değişkenlerin Değerlendirilmesi

	Leptospira IgG		p
	pozitif (n)	negatif (n)	
Cinsiyet			
Kadın	4	204	0,743
Erkek	5	187	
Yaş	47,11 ± 10,71	43,62 ± 12,63	0,503
Yerleşim			
Kır	7	149	0,031
Kent	2	242	
İçme suyu			
Şebeke-Hazır	4	222	0,511
Kaynak	5	169	
Gölde, nehirde, dereye yüzme			
Evet	3	78	0,395
Hayır	6	313	
Bahçe ile uğraş			
Evet	7	171	0,084
Hayır	2	220	
Avcılık			
Evet	1	34	0,565
Hayır	8	357	
Av hayvanı ile temas (kesme, yıkama)			
Evet	1	47	1,000
Hayır	8	344	
Evde köpek besleme			
Evet	-	3	1,000
Hayır	9	388	
Bahçede köpek besleme			
Evet	6	54	0,001
Hayır	3	337	
Ev çevresinde fare görme			
Evet	7	84	0,001
Hayır	2	307	
Evde fare veya fare dışkısı görme			
Evet	-	10	1,000
Hayır	9	381	
Fare ile temas (ölü veya canlı)			
Evet	1	6	0,148
Hayır	8	385	
Risk faktörlerine göre			
Riskli grup	8	192	0,037
Kontrol grubu	1	199	

5. TARTIŞMA

Leptospiroz, tüm dünyada yaygın olarak görülmekte, enfekte hayvanlardan (fare, sıçan, köpek, sığır, at, domuz, vahşi hayvanlar) doğrudan veya su ve toprak aracılığıyla dolaylı olarak insanlara geçmekte ve ciddi olgularda insanlarda yaşamı tehdit edebilmektedir. Klinik bulgular subklinik bir tablodan çoklu organ yetmezliğine kadar uzanabilen geniş bir yelpazede görülebildiğinden, ilk anda akla gelmesi zor olabilmektedir. Tanıdaki gecikmeler leptospiroza bağlı ölüm vakalarının görülmesiyle sonuçlanabilmektedir (86). Ayrıca sığırlar, koyunlar, keçilerde leptospiroza bağlı spontan düşüklere görülebilmekte ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır (52).

Leptospiroz günümüzdeki küresel iklim değişiklikleri ile önemi giderek artan bir halk sağlığı sorunudur (281). Bu nedenle leptospiroz gibi zoonotik enfeksiyonların hem hayvanlarda hem de insanlarda prevalansının saptanması büyük önem taşımaktadır.

Özellikle fare gibi kemiriciler, bir kez enfekte olduktan sonra yaşamları boyunca mikroorganizmayı renal tübül hücrelerinde taşımak sureti ile aralıklı veya sürekli idrarları aracılığıyla yayarak çevrenin özellikle de suyun kontaminasyonuna neden olurlar ve insan enfeksiyonu için önemli kaynak oluştururlar (1,53). Bölgemizde 2013 yılında yapılan bir çalışmada, Kırıkkale iline komşu Kırşehir ilinde yakalanan 43 farenin (*Microtus hartingi*) 20'sinin (% 46,5) böbrek örneklerinde PZR ile *Leptospira spp.* saptanmıştır (282). *Leptospira* PZR pozitif çıkan bu örneklerin,

insanlarda leptospiroz ile uyumlu olguların görüldüğü bir bölgeden alınmış olması, taşıyıcılığın insan enfeksiyonları açısından önemini göstermektedir.

Klinisyenlerin ayırıcı tanıda leptospirozu düşünmelerinde, daha dikkat çekici olması açısından insanlarda bölgesel seroprevalans araştırmaları değerlidir. Kırıkkale ilinden, çalışmamız tarihine kadar leptospiroz olgusu bildirilmemekle birlikte insanlarda seroprevalans çalışmasına dair veri elde edilememiştir. Kırıkkale yöresinde insanlarda leptospira seroprevalansının saptanması için yaptığımız bu çalışmada, leptospiroz açısından risk faktörlerini taşıyan Grup 1'deki 200 kişiden 8'inde (% 4), kontrol grubundaki (Grup 2) 200 kişiden ise 1'inde (% 0,5) leptospira seropozitifliği tespit ettik. Bu sonuç iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkı gösterdi ($p=0,037$).

Ülkemizde çeşitli bölgelerde insanlarda leptospira seroprevalans çalışmaları yapılmıştır. Grup 1'deki % 4 leptospira seropozitiflik oranı, ülkemizde Samsun ve Çukurova bölgelerinde riskli gruplarda tespit edilen % 4,3 oranına yakındır. Aktan, 1958 yılında yaptığı çalışmada, 10 tanesi leptospiroz şüpheli diğerleri sfiliz testi için Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü'ne gönderilen toplamda 400 serum örneğinden 43'ünde (% 10,75) leptospira seropozitifliği saptamıştır (283). Aktan'ın 1959 yılında çeltik tarlalarında çalışan tarım işçilerinde yaptığı çalışmada ise, Adana ve çevresinde 300 serum örneğinin 33'ünde (% 11), Hatay ve çevresinde 250 serum örneğinin 42'sinde (% 16,80), Maraş ve çevresinde ise 150 serum örneğinin 16'sında (% 10,66) leptospira seropozitifliği tespit edilmiştir (34).

Brewen ve arkadaşların 1960 yılında güney illerimizin çeltik yetiştirilen bölgelerinde yaptıkları bir çalışmada, 240 insan serumununun 22'sinde (% 9,16)

leptospira seropozitifliği bulunmuştur (35). Diğer bir çalışmada ülkemizin çeşitli bölgelerinden farklı zamanlarda toplanan 1405 serum örneğinin 42'sinde (% 3) leptospira seropozitifliği bulunmuştur. Bu çalışmada en düşük oran % 1,3 ile Akdeniz bölgesinde, en yüksek oran ise % 5,3 ile Karadeniz bölgesinde tespit edilmiştir. Bu serum örneklerinin 471'i Orta Anadolu bölgesinden olup, bunlardaki leptospira seropozitiflik oranı % 3,4 olarak bildirilmiştir (284).

Vardar, 1976 yılında yayınlanan çalışmasında ülke genelinden Ankara Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'ne gelen 54 serum örneğinin 6'sını (% 11,1) leptospira açısından seropozitif saptamıştır (285). Gl, 1980'lerin başlarında Diyarbakır bölgesinde yaptığı çalışmada, sağlıklı 400 kişiden 25'inde (% 6,2) leptospira seropozitifliği tespit etmiştir (31).

Yarkın ve arkadaşlarının 1996 yılında yaptıkları çalışmada, sulu tarım ve hayvancılığın yapıldığı Çukurova Yüreğir bölgesinde, klinik öyküsü olmayan leptospiroz açısından riskli grupta yer alan 112 tarım işçisinden alınan serum örneklerinin 5'inde (% 4,3) leptospira seropozitifliği bulunmuştur (286).

şencan ve arkadaşlarının 1997 yılında Samsun bölgesinde yaptıkları çalışmada, leptospiroz açısından riskli gruptaki 279 kişiden 12'sinde (% 4,3), kontrol grubundaki 200 kişinin ise 1'inde (% 0,5) leptospira seropozitifliği saptanmış ve iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$) (36).

Leptospiroz özellikle tropikal ve subtropikal bölgelerde olmak üzere tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir (287,288). Almanya'da 2007 yılında ilek hasadı yapan mevsimlik tarım işçilerinde görülen leptospiroz olguları ılıman iklim bölgelerindeki epidemilerdendir (289). Poepl ve arkadaşlarının Avusturya'da 2009

yılında yaptıkları çalışmada ise sağlıklı 382 kişiden 88'inde (% 23) leptospira seropozitifliği tespit edilmiş ve tropikal bölgelerdekine benzer bu yüksek oranın, çalışma popülasyonunun neredeyse tamamının erkek ve 18-57 yaş aralığında olmasına bağlı olabileceği belirtilmiştir (290).

Gonçalvez ve arkadaşlarının 2007 yılında Brezilya Parana'da yaptıkları çalışmada, kırsal bölgede yaşayan 207 kişiden 25'inde (% 12,1) leptospira seropozitifliği tespit edilmiştir (291). Murhekar ve arkadaşlarının Hindistan'da 1996 yılında tropikal iklimin görüldüğü Andaman ve Nicobar adalarında yaptıkları çalışmada, sağlıklı 1014 kişiden serum örnekleri toplanmış ve 550 örnekte (% 54,2) leptospira seropozitifliği saptanmıştır (292). Saleem ve arkadaşlarının 2010-2011 yıllarında Pakistan'da yaptıkları çalışmada, leptospiroz açısından riskli grupta yer 100 kişiden aldıkları serum örneklerinden 44'ünde leptospira seropozitifliği bulunmuştur (293). Gomard ve arkadaşlarının Afrika'nın doğusundaki Comoros adalarında 2011 yılında yaptıkları çalışmada, laboratuvarlardan alınan 318 ve sağlıklı 76 kişiden alınan toplamda 394 serum örneğinde, farklı adalarda leptospira seropozitifliği % 3,4-10,3 arasında bulunmuştur (294).

Leptospirozda fareler ve köpekler dünya genelinde enfeksiyonun yayılmasında önemli rezervuarlardır ve salgınlar genellikle bunların, çevredeki ve iklimdeki değişiklikler sonucu sayısal artışları ile ilişkilidir. Özellikle kontrolsüz fare popülasyonu hem kırsalda hem de hijyen ve alt yapının kötü olduğu kentlerde bir halk sağlığı sorunu teşkil etmektedir (295).

Felzemburgh ve arkadaşlarının 2003-2004 yıllarında Brezilya'da Salvador'da hijyen koşullarının iyi olmadığı gecekondu mahallelerinde yaşayan 1585 kişinin

51'inde, leptospira seropozitifliği saptanmıştır (296). Bu çalışmada ev çevresinde fare görmek leptospiroz için anlamlı bir risk faktörü olarak bulunmaz iken, yine aynı bölgedeki gecekondulu mahallelerinde Reis ve arkadaşlarının 2008 yılında yayınlanan çalışmalarında 3171 kişiden 488'inde (% 15,4) leptospira seropozitifliği tespit edilmiş ve ev çevresinde fare görmek anlamlı bir risk faktörü olarak belirlenmiştir (58).

Çalışmamıza katılanlardan ev çevresinde fare gören 91 kişiden 7'sinde leptospira seropozitifliği tespit edilmesi ile, ev çevresinde fare görmenin istatistiksel olarak anlamlı bir risk faktörü olduğu anlaşılmaktadır ($p=0,001$). Bahçede köpek besleyen 60 kişiden 6'sında bulunan leptospira seropozitifliği, bahçede köpek beslemenin istatistiksel olarak anlamlı bir risk faktörü olduğunu göstermektedir ($p=0,001$).

Tatlı sularda (gl, nehir, dere) yüzmek leptospiroz açısından bir risk faktörüdür (1). Zira leptospiralar tatlı suda iki hafta, hafif ışlak toprakta haftalarca canlı kalabilmektedir (36). Amerika'da 834 atletin katıldığı triatlon yarışmasında gl suyu ile temas sonrası katılımcıların % 12'sini etkileyen salgın gelişmiştir (79). Malezya'da yüzücülerde meydana gelen salgında 158 atletin % 44'nde leptospiroz saptanmıştır. Malezya'daki Segama nehrinde yüzmeye atfedilen risk % 38 olarak saptanmıştır (80). Diğer bir çalışmada, İspanya'da leptospiroz tanısı almış 86 hastanın verileri incelenmiş ve 67 (% 94) hastanın leptospiroz açısından risk faktörlerini taşıdığı belirlenmiştir. Hastalardan 52'sinde hayvanlar ile (% 57,4' domuz, % 38,1'i köpek, % 31,7'si inek, % 22,2'si koyun ile), 20'sinde ise (% 31,7) durgun su (gl-gölet) ile temas öyküsü belirlenmiştir (297). Ülkemizde de triatlon,

rafting gibi doğa aktivitelerinin yaygınlaşmaya başlaması, Kırıkkale yöresinde ise Kızılırmak nehri ve baraj-göletler ile gelen su kenarındaki sosyal aktiviteler, balık avcılığı, yüzme gibi aktiviteler leptospira ile karşılaşma riskini artırmaktadır. Çalışmamıza katılanlardan gölde, nehirde veya dereye yüzme öyküsü olan 81 kişiden 3'ünde leptospira seropozitifliği tespit edildi. Ancak gölde, nehirde veya dereye yüzmenin istatistiksel olarak anlamlı bir risk faktörü olmadığı görüldü ($p=0,395$).

Bahçe ile uğraş, avcılık, evde veya ev çevresinde fare görülmesi, kırsal bölgede yaşama leptospiroz açısından risk faktörlerindedir (1,52). Bir çalışmada 350 leptospiroz olgusunun % 66,4'ünün bahçe ile uğraştığı, % 38,4'ünde evde, % 31,4'ünde ev çevresinde fare gördüğü, % 7,6'sının avcılıkla uğraştığı ve % 69,6'sının ise kırsal bölgede yaşadığı tespit edilmiştir (298). Diğer çalışmalarda; Fazlı, kentte yaşayanlarda % 1,5 kırsalda yaşayanlarda % 8,8, Gül ise kentte yaşayanlarda % 5,4 ve kırsalda yaşayanlarda % 7,2 leptospira seropozitifliği tespit etmişlerdir (31,284). Çalışmamızda leptospira seroprevalansında, kırsal bölgede yaşamak leptospiroz için istatistiksel olarak anlamlı bir risk faktörü iken ($p=0,031$); bahçe ile uğraş, avcılık, evde fare veya fare dışkısı görme, fare ile temas leptospiroz açısından anlamlı risk faktörleri olarak bulunmadı.

Son yıllarda etkisi daha çok hissedilmeye başlayan küresel iklim değişikliğinin ülkemizi de etkilemesi ile, sel-su baskını gibi leptospiroz açısından risk oluşturan faktörlere bağlı olarak leptospiroz olgularında artış olabileceğinden ayırıcı tanıda risk faktörlerinin değerlendirilmesi önem arz etmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız Kırıkkale yöresinde insanlarda leptospira seroprevalansının araştırıldığı ilk çalışmadır. Çalışmamız sonunda, leptospiroz açısından risk faktörlerini taşımanın seropozitifliği istatistiksel olarak anlamlı şekilde etkilediği anlaşıldı. İstatistiksel açıdan anlamlı fark oluşturan risk faktörleri; ev çevresinde fare görmek, bahçede köpek beslemek, kırsal alanda yaşamak olarak tespit edildi.

Leptospiraları çevreden temizlemek imkânsızdır. Ancak potansiyel enfekte hayvanlar ile doğrudan veya idrarla kontamine olmuş toprak, su ile dolaylı olarak teması azaltmak elimizdeki en etkili korunma stratejileridir.

Ev çevresinin temiz tutulması, açıkta çöp bırakılmaması, yerel yönetimlerin kontrolsüz fare ve köpek nüfusu açısından gerekli önlemleri alması, kanalizasyon sistemlerinin düzgün çalışması, köpeklere ve sığırlara leptospira aşısı yapılması leptospira yayılımını azaltmada etkili olabilecek önlemlerdir. Risk faktörlerini taşıyanların ve sağlık çalışanlarının eğitimi leptospirozun önlenmesi ve erken teşhisinde yararlı diğer yaklaşımlardır. Gerektiğinde riskli temas öncesi kemoproflaksi uygulanmalıdır.

Çalışma sonuçlarının, leptospiroz için farkındalığı sağlayarak, acil servislere ve polikliniklere özellikle ateş şikayeti ile başvuran hastalarda leptospirozun mutlaka ayırıcı tanıda değerlendirilmesini sağlayacağı, tanı konulan hastalarda erken tedavi ile ölümcül olabilecek komplikasyonların önlenmesine katkı sağlayacağı ve ileride yapılacak seroepidemiolojik çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Paul N. Levett, David A. Haake. *Leptospira* Species (Leptospirosis). Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Edited by Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, Dolin R, 7th ed. edn. Philadelphia, Pa. Elsevier/Churchill Livingstone; 2010: 3059-3066.
2. World Health Organization. Leptospirosis worldwide, 1999. *Wkly Epidemiol Rec.* 1999; 74: 237-242.
3. Neşe Saltoğlu. Leptospira infeksiyonları: Türkiye ve Dünyada durum. *Klinik 2003 XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi*;108-110.
4. Shekatkar SB, Harish BN, Menezes GA, Parija SC. Clinical and serological evaluation of leptospirosis in Puducherry, *J Infect Dev Ctries* 2010; 4 (3): 139-143.
5. DebMandal M, Mandal S, Pal NK. Serologic evidence of human leptospirosis in and around Kolkata, India: a clinico-epidemiological study. *Asian Pac J Trop Med* 2011; 4 (12): 1001-6.
6. Silpasakorn S¹, Waywa D, Hoontrakul S, Suttinont C, Losuwanaluk K, Suputtamongkol Y. Performance of *Leptospira* immunoglobulin M ELISA and rapid immunoglobulin G immunochromatographic assays for the diagnosis of leptospirosis. *J Med Assoc Thai.* 2011 Feb; 94 Suppl 1: S 203-6.
7. Adesiyun AA, 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* 2011; 29 (5): 350–7.
8. Vedat Turhan. Leptospiroz. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Türkiye’de Sık Karşılaşılan Hastalıklar 1, Sempozyum Dizisi No: 55 Ocak 2007; 227-240.
9. Góngora A, Parra J, Aponte L, Gómez L. Seroprevalence of *Leptospira* spp in population groups of Villavicencio, Colombia. *Rev Salud Publica (Bogota)* 2008; 10 (2): 269-78.
10. Adesiyun A, Campbell M, Rahaman S, Bissessar S, Stewart-Johnson A, Dookeran S, Gittens-St Hilaire M. Frequency of detection of immunoglobulins of *Toxoplasma gondii*, *Leptospira* spp., and *Brucella abortus* in livestock/farm and abattoir workers in Trinidad. *J Agromedicine* 2011; 16 (3): 200-9.
11. Adesiyun A, Rahaman S, Bissessar S, Dookeran S, Stewart-Johnson A, Hilaire MG. Seroprevalence of toxoplasmosis, leptospirosis and brucellosis in sugarcane field-workers in Trinidad and Tobago. *West Indian Med J.* 2010; 59 (1): 14-9.
12. Padmanabha H, Hidalgo M, Valbuena G, Castaneda E, Galeano A, Puerta H, Cantillo C, Mantilla G. Geographic variation in risk factors for SFG rickettsial

- and leptospiral exposure in Colombia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009 Oct; 9 (5): 483-90.
13. Gsell, O. The history of Leptospirosis: 100 Years, *Zbl. Bakt. Hyg*, 257, (1984) 473-478.
 14. İmren, HY. Evcil hayvanlarda leptospira enfeksiyonu. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*. 1979; 49 (4): 1-8.
 15. Faine S, Adler B, Bolin C. *Leptospira and leptospirosis*. 2nd ed. Melbourne: MedSci; 1999.
 16. Stimson AM. Note on an organism found in yellow-fever tissue. *Publ Health Rep*. 1907; 22: 541.
 17. Baseman, J.B., Hennrberry, R.C.,Cox, C.D. Isolation and growth oof leptospira on artificial media, *J. Bacteriol.*, 1966; (91): 1374-1375.
 18. Ulaş H. Türkiye’de Sığır ve Koyunlarda Leptospirosis’in Yayılışı ve Tipleri Üzerinde Serolojik Araştırmalar Ticaret Matbaacılık Taş. İzmir 1962.
 19. Everard JD. Leptospirosis. In: Cox FEG, ed. *The Wellcome Trust Illustrated History of Tropical Diseases*. London: The Wellcome Trust; 1996: 111-119, 416-418.
 20. Michna, S. W. Leptospirosis, *Vet. Rec.*, 1970; (86): 484-496.
 21. Vildan Özdemir. Köpek serumlarının leptospirosis yönünden mikroskopik aglütinasyon testi ve ELİSA ile incelenmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim dali Doktora Tezi, 1998.
 22. Unat E K, Gürtürk S. Türkiye’de Leptospira canicola İnfeksiyonu. *Mikrobiyol Derg* 1954; 7 (5-6): 179-182.
 23. Unat E K, Gürtürk S. Leptospiroloji. Bilgi Basım ve Yayınevi, İstanbul 1955.
 24. Hartman, E.G. Epidemiological aspects of canine leptospirosis in the Netherlands, *Zbl. Bakt. Hyg.*, 258 A, 350-359.
 25. Aktan, M. Türkiye’de 3 cenup Vilayetinde Leptospira Enfeksiyonları, *Türk. Hij. Tec. Biol. Der.*, Cilt XX, Sayı I, 1959, 97-103.
 26. Aktan, M. Leptospirozisler ve Yurdumuzda İnsan Leptospirozislerinin Üzerinde Yapılan Çalışmalar, *Türk. Hij. Tec. Biol. Der.*, Gürsoy Basımevi, Ankara 1968.
 27. Payzın, S. Leptospiralar, Sağlık Hizmetinde Mikrobiyoloji II., A.Ü.Tıp Fak. Yayınları, Ankara 1968.
 28. Serter, F. Klinik Mikrobiyoloji, E.Ü. Matbaası, İzmir, 1978; 409-423.
 29. Hakioğlu F. Türkiye’de İnsan ve Hayvanlarda Leptospirosis üzerinde Araştırmalar. *Mikrobiyol Derg* 1964; 17 (1-2): 63-74.
 30. Fazlı ŞA. Leptospiroloji’de son gelişmeler ve şimdiye kadar Türkiye’de tespit edilen Leptospira serotipleri. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 1970; 4 (4): 315-231.
 31. Kadri Gül. Bölgemizde Leptospira İnsidansı ve Tipleri. Dicle Üniversitesi Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD, Doktora Tezi, 1985.

32. Bernkopf, H. Reprt on bovine leptospirosis in Palestine. Government of Palestine bord for scientific industrial research, Jeruselam, 1948.
33. Hakioglu F. Hayvanlarda Leptospiral Enfeksiyonlar ve Memleketimizde Yapılan Araştırmalar. Mikrobiyol Derg 1968; 21 (1-2): 35-61.
34. Aktan M. Türkiye’de üç cenup vilayetinde leptospira enfeksiyonları üzerindeki serolojik araştırma. Türk Hij Tec Biyol Derg 1960; 20 (1): 97-114.
35. Brewer WE, Alexander AD, Hakioglu F, Evans LB. Rice-field Leptospirosis in Turkey: a serologic survey. Am J of Trop Med Hyg 1960; 9 (3): 229-239.
36. İrfan Şencan. Orta Karadeniz Bölgesi’nde Leptospirozis. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fak. Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mik. AD, 1997.
37. Bulach DM, Kalambaheti T, de la Peña-Moctezuma A, Adler B. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2000; 2: 375-380.
38. Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. 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* 1999; 49 Pt 2: 839.
39. Smythe L, Adler B, Hartskeerl RA, Galloway RL, Turenne CY, Levett PN. Classification of *Leptospira* genomospecies 1, 3, 4 and 5 as *Leptospira alstonii* sp. nov., *Leptospira vanthielii* sp. nov., *Leptospira terpstrae* sp. nov. and *Leptospira yanagawae* sp. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013; 63: 1859.
40. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14: 296-326.
41. Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ, Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Saint Girons I, Somerville RL, Wen YM, Shi MH, Chen Z, Xu JG, Zhao GP. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by wholegenome sequencing. *Nature*. 2003; 422: 888-893.
42. Nascimento AL, Ko AI, Martins EA, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, Verjovski-Almeida S, Hartskeerl RA, Marques MV, Oliveira MC, Menck CF, Leite LC, Carrer H, Coutinho LL, Degrave WM, Dellagostin OA, El-Dorry H, Ferro ES, Ferro MI, Furlan LR, Gamberini M, Giglioti EA, Góes-Neto A, Goldman GH, Goldman MH, Harakava R, Jerônimo SM, Junqueira-de-Azevedo IL, Kimura ET, Kuramae EE, Lemos EG, Lemos MV, Marino CL, Nunes LR, de Oliveira RC, Pereira GG, Reis MS, Schriefer A, Siqueira WJ, Sommer P, Tsai SM, Simpson AJ, Ferro JA, Camargo LE, Kitajima JP, Setubal JC, Van Sluys MA. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *Journal of Bacteriology*. 2004; 186: 2164-2172.

43. Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen PA, Davis J, Johnson M, Kuczek E, Alt DP, Peterson-Burch B, Coppel RL, Rood JI, Davies JK, Adler B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc Nat Acad Sci U S A*. 2006; 103: 14560-14565.
44. Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C, Zuerner RL, Zidane N, Wilson PJ, Creno S, Kuczek ES, Bommezzadri S, Davis JC, McGrath A, Johnson MJ, Boursaux-Eude C, Seemann T, Rouy Z, Coppel RL, Rood JI, Lajus A, Davies JK, Médigue C, Adler B. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS ONE*. 2008; 3: e1607.
45. G Abdollahpour. A review on Leptospirosis (2013). Leptospira Research Laboratory, University of Tehran. Erişim: (<http://leptolab.ut.ac.ir/Review-En.htm>). Erişim tarihi: 13.08.2014.
46. Boonsilp S, Thaipadungpanit J, Amornchai P, Wuthiekanun V, Bailey MS, Holden MT, Zhang C, Jiang X, Koizumi N, Taylor K, Galloway R, Hoffmaster AR, Craig S, Smythe LD, Hartskeerl RA, Day NP, Chantratita N, Feil EJ, Aanensen DM, Spratt BG, Peacock SJ. A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7: e1954.
47. Slack AT, Dohnt MF, Symonds ML, Smythe LD. Development of a Multiple-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA) for *Leptospira interrogans* and its application to *Leptospira interrogans* serovar Australis isolates from Far North Queensland, Australia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2005; 4: 10.
48. M. Picardeau. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et maladies infectieuses* 43 (2013) 1–9.
49. Trevejo RT, Rigau-Pérez JG, Ashford DA, McClure EM, Jarquín-González C, Amador JJ, de los Reyes JO, Gonzalez A, Zaki SR, Shieh WJ, McLean RG, Nasci RS, Weyant RS, Bolin CA, Bragg SL, Perkins BA, Spiegel RA. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J Infect Dis*. 1998; 178: 1457-1463.
50. Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 494.
51. Bernadette AR, Eric B, Kara D. Global burden of Human Leptospirosis and cross-sectoral interventions for its prevention and control. Erişim: (<http://www.pmaconference.mahidol.ac.th/dmdocuments/2013-PMAC-Poster-P9-Bernadette%20Abela-Ridder.pdf>). Erişim tarihi: 13.08.2014
52. Nick Day. Epidemiology, microbiology, clinical manifestations, and diagnosis of leptospirosis (2014). Erişim: (<http://www.uptodate.com/contents/epidemiology-microbiology-clinical-manifestations-and-diagnosis-of-leptospirosis>). Erişim tarihi: 13.08.2014.

53. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 736.
54. Andre-Fontaine G, Ganiere JP. New topics on Leptospirosis. *Comp Immun Microbiol. Infect. Dis.* 1990; 13 (3): 163-168.
55. Hanson LE: Leptospirosis in domestic animals. The public health perspective. *J Am Vet Med Assoc.* 1982; 181 (12): 1505-1509.
56. Stern EJ, Galloway R, Shadomy SV, Wannemuehler K, Atrubin D, Blackmore C, Wofford T, Wilkins PP, Ari MD, Harris L, Clark TA. Outbreak of leptospirosis among Adventure Race participants in Florida, 2005. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 843.
57. Jesus MS, Silva LA, Lima KM, Fernandes OC. Cases distribution of leptospirosis in City of Manaus, State of Amazonas, Brazil, 2000-2010. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45: 713.
58. Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RD. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2: e228.
59. Kawaguchi L, Sengkeopraseuth B, Tsuyuoka R, Koizumi N, Akashi H, Vongphrachanh P, Watanabe H, Aoyama A. Seroprevalence of leptospirosis and risk factor analysis in flood-prone rural areas in Lao PDR. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78: 957.
60. Miyazato KE, Fonseca AL, Caputto LZ. Incidence of Leptospirosis infection in the East Zone of Sao Paulo City, Brazil. *Int Arch Med* 2013; 6: 23.
61. Dechet AM, Parsons M, Rambaran M, Mohamed-Rambaran P, Florendo-Cumbermack A, Persaud S, Baboolal S, Ari MD, Shadomy SV, Zaki SR, Paddock CD, Clark TA, Harris L, Lyon D, Mintz ED. Leptospirosis outbreak following severe flooding: a rapid assessment and mass prophylaxis campaign; Guyana, January-February 2005. *PLoS One* 2012; 7: e39672.
62. Smith JK, Young MM, Wilson KL, Craig SB. Leptospirosis following a major flood in Central Queensland, Australia. *Epidemiol Infect* 2012; 1.
63. Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W. A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. *PLoS Negl Trop Dis* 2007; 1: e56.
64. Nardone A, Capek I, Baranton G, Campèse C, Postic D, Vaillant V, Liénard M, Desenclos JC. Risk factors for leptospirosis in metropolitan France: results of a national case-control study, 1999-2000. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 751.
65. Sugunan AP, Natarajaseenivasan K, Vijayachari P, Sehgal SC. Percutaneous exposure resulting in laboratory-acquired leptospirosis -- a case report. *J Med Microbiol* 2004; 53: 1259.
66. Wasieński B, Dutkiewicz J. Leptospirosis--current risk factors connected with human activity and the environment. *Ann Agric Environ Med* 2013; 20: 239.

67. Sugunan AP, Vijayachari P, Sharma S, Roy S, Manickam P, Natarajaseenivasan K, Gupte MD, Sehgal SC. Risk factors associated with leptospirosis during an outbreak in Middle Andaman, India. *Indian J Med Res* 2009; 130: 67.
68. Lupi O, Netto MA, Avelar K. Cluster of leptospirosis cases among military personnel in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Infect Dis* 2013; 17: e129.
69. Jansen A, Schöneberg I, Frank C, Alpers K, Schneider T, Stark K. Leptospirosis in Germany, 1962–2003. *Emerging Infectious Diseases* 2005; 11(7): 1048–54.
70. Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *International Journal of Infectious Diseases* 2008; 12(4): 351–357.
71. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2012. Reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2013.
72. Christova I, Tasseva E, Manev H. Human leptospirosis in Bulgaria, 1989–2001: epidemiological, clinical, and serological features. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2003; 35: 869–872.
73. Radl C, Müller M, Revilla-Fernandez S, Karner-Zuser S, de Martin A, Schauer U. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants in Langau, Austria. Vienna, Austria: Austrian Agency for Health and Food Safety; 2010.
74. Brockmann S, Piechotowski I, Bock-Hensley O, Winter C, Oehme R, Zimmermann S. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants in Germany, 2006. *BMC Infectious Diseases* 2010; 10: 91.
75. Forbes AE, Zochowski WJ, Dubrey SW, Sivaprakasam V. Leptospirosis and Weil's diseases in the UK. *Quarterly Journal of Medicine* 2012; 105(12): 1151–1162.
76. Perra A, Servas V, Terrier G, Postic D, Baranton G, André-Fontaine G. Clustered cases of leptospirosis in Rochefort, France, June 2001. *Eurosurveillance* 2002; 7(10): 131–136.
77. Socolovschi C, Angelakis E, Renvoisé A, Fournier PE, Marié JL, Davoust B. Strikes, flooding, rats, and leptospirosis in Marseille, France. *International Journal of Infectious Diseases* 2011; 15: e710–5.
78. Levieuge A, Aboubaker MH, Terrier O, Drancourt M, Davoust B. Real-time PCR detection of *Leptospira* sp. rodents from Toulon harbour (France). *Revue de Médecine Vétérinaire* 2010; 161(6): 264–266.
79. Morgan J, Bornstein SL, Karpati AM, Bruce M, Bolin CA, Austin CC, Woods CW, Lingappa J, Langkop C, Davis B, Graham DR, Proctor M, Ashford DA, Bajani M, Bragg SL, Shutt K, Perkins BA, Tappero JW. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1593.

80. Stone SC, McNutt E. Update: Outbreak of acute febrile illness among athletes participating in Eco-Challenge-Sabah 2000--Borneo, Malaysia, 2000. *Ann Emerg Med* 2001; 38: 83.
81. Radl C, Müller M, Revilla-Fernandez S. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants in Langau, Austria, 2010. *Wien Klin Wochenschr* 2011; 123: 751.
82. Brockmann S, Piechotowski I, Bock-Hensley O, Winter C, Oehme R, Zimmermann S, Hartelt K, Luge E, Nöckler K, Schneider T, Stark K, Jansen A. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants in Germany, 2006. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 91.
83. Shaked Y, Shpilberg O, Samra D, Samra Y. Leptospirosis in pregnancy and its effect on the fetus: case report and review. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 241.
84. Carles G, Montoya E, Joly F, Peneau C. [Leptospirosis and pregnancy. Eleven cases in French Guyana]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 1995; 24: 418.
85. Puliyaath G, Singh S. Leptospirosis in pregnancy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 2491.
86. Maroun E, Kushawaha A, El-Charabaty E, Mobarakai N, El-Sayegh S. Fulminant leptospirosis (Weil's disease) in an urban setting as an overlooked cause of multiorgan failure: a case report. *Journal of Medicine Case Reports* 2011; 5(1): 7.
87. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 757–771.
88. Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes Infect* 2000; 2: 1265–1276.
89. Adler B, Faine S. The genus *Leptospira*. *Prokaryotes* 2006; 7: 294–317.
90. Petra Kucerova, Zuzana Cermakova. Leptospirosis: a neglected zoonosis of global distribution. *Reviews in Medical Microbiology* 2013, Vol 24 No:3.
91. Cullen, P.A., Haake, D.A., Adler, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiology Reviews* 2004; 28: 291–318.
92. 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. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 25420–25429.
93. Cullen, P.A., Xu, X., Matsunaga, J., Sanchez, Y., Ko, A.I., Haake, D.A., Adler, B. Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infection and Immunity* 2005; 73: 4853–4863.
94. Shang, E.S., Exner, M.M., Summers, T.A., Martinich, C., Champion, C.I., Hancock, R.E., Haake, D.A. The rare outer membrane protein, OmpL1, of

- pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. *Infection and Immunity* 1995; 63: 3174–3181.
95. Rodríguez Reyes, E., Cullen, P., Bulach, D., Adler, B., Haake, D., De la Peña-Moctezuma, A. Expresión en *Escherichia coli* del gen *gspD* del sistema de secreción tipo II de *Leptospira borgpetersenii* serovariedad Hardjo. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2005; 57: 45–46.
 96. Evangelista KV, Coburn J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol* 2010; 5: 1413–1425.
 97. Bhardwaj R. Leptospirosis – a reemerging disease? *Indian J Med Res* 2004; 120: 136–138.
 98. Levett PN. Leptospirosis: a forgotten zoonosis? *Clin Applied Immunol Rev* 2004; 4: 435–448.
 99. Ben Adler, Alejandro de la Peña Moctezuma. *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary Microbiology* 140; 2010: 287–296.
 100. Sambasiva RR, Naveen G, Bhalla P, Agerwal SK. Leptospirosis in India and the rest of the world. *Braz J Infect Dis* 2003; 7: 178–193.
 101. Cerqueira GM, Picardeau M. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol* 2009; 9: 760–768.
 102. Wuthiekanun V, Amornchai P, Paris DH, Langla S, Thaipadunpanit J, Chierakul W, Smythe LD, White NJ, Day NP, Limmathurotsakul D, Peacock SJ. Rapid isolation and susceptibility testing of *Leptospira* spp. using a new solid medium, LVW agar. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 297.
 103. Morgan J, Bornstein SL, Karpati AM. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clin Infect Dis*. 2002; 34: 1593-1599.
 104. Cinco M. New insights into the pathogenicity of *Leptospira*: evasion of host defences. *New Microbiol* 2010; 33: 283–292.
 105. Dutta TK, Christopher M. Leptospirosis – an overview. *J Assoc Physicians India* 2005; 53: 545–551.
 106. Areán VM. The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). *Am J Pathol*. 1962; 40: 393-423.
 107. Wong ML, Kaplan S, Dunkle LM, Stechenberg BW, Feigin RD. Leptospirosis: a childhood disease. *J Pediatr* 1977; 90: 532.
 108. Souza L, Koury MC. Isolation and biological activities of endotoxin from *Leptospira interrogans*. *Can J Microbiol*. 1992; 38: 284-289.
 109. Werts C, Tapping RI, Mathison JC. Leptospiral endotoxin activates cells via a TLR2-dependent mechanism. *Nature Immunology*. 2001; 2: 346-352.
 110. Nahori MA, Fournie-Amazouz E, Que-Gewirth NS. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. *J Immunol*. 2005; 175: 6022-6031.

111. Abdulkader RC, Daher EF, Camargo ED, Spinosa C, da Silva MV. Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2002; 44: 79-83.
112. Lingappa J, Kuffner T, Tappero J. HLA-DQ6 and ingestion of contaminated water: possible gene-environment interaction in an outbreak of leptospirosis. *Genes Immun*. 2004; 5: 197-202.
113. Faber NA, Crawford M, LeFebvre RB, Buyukmihci NC, Madigan JE, Willits NH. Detection of *Leptospira* spp. in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 2731-2733.
114. Lucchesi PM, Parma AE, Arroyo GH. Serovar distribution of a DNA sequence involved in the antigenic relationship between *Leptospira* and equine cornea. *BMC Microbiol*. 2002; 2: 3.
115. Haake DA. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology*. 2000; 146: 1491-1504.
116. Haake DA, Chao G, Zuerner RL. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun*. 2000; 68: 2276-2285.
117. Lottersberger J, Guerrero SA, Tonarelli GG, Frank R, Tarabla H, Vanasco NB. Epitope mapping of pathogenic *Leptospira* LipL32. *Lett Appl Microbiol* 2009; 49: 641-645.
118. Vivian JP, Beddoe T, McAlister AD, Wilce MC, Zaker-Tabrizi L, Troy S. Crystal structure of LipL32, the most abundant surface protein of pathogenic *Leptospira* spp. *J Mol Biol* 2009; 387: 1229-1238.
119. Guerreiro H, Croda J, Flannery B, Mazel M, Matsunaga J, Galvão Reis M, Levett PN, Ko AI, Haake DA. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun*. 2001; 69: 4958-4968.
120. Yang CW, Wu MS, Pan MJ. The *Leptospira* outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13: 2037-2045.
121. Adler B, Lo M, Seemann T, Murray GL. Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. *Vet Microbiol* 2011; 153: 73-81.
122. Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Møller AK, Matsunaga J, Haake DA. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun*. 2007; 75: 2441-2450.
123. Croda J, Ramos JG, Matsunaga J. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 1528-1534.
124. Wang Z, Jin L, We, grzyn A. Leptospirosis vaccines. *Microb Cell Fact* 2007; 6: 39.

125. Natarajaseenivasan K, Vijayachari P, Sharma S, Sugunan AP, Selvin J, Sehgal SC. Serodiagnosis of severe leptospirosis: evaluation of ELISA based on the recombinant OmpL1 or LipL41 antigens of *Leptospira interrogans* serovar autumnalis. *Ann Trop Med Parasitol* 2008; 102: 699–708.
126. Stevenson B, Choy HA, Pinne M, Rotondi ML, Miller MC, Demoll E, Kraiczy P, Cooley AE, Creamer TP, Suchard MA, Brissette CA, Verma A, Haake DA. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PLoS ONE*. 2007; 2: e1188.
127. Lee SH, Kim S, Park SC, Kim MJ. Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. *Infect Immun*. 2002; 70: 315-322.
128. Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Yu H. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 2003; 422: 888–893.
129. Edwards GA, Domm BM. Human leptospirosis. *Medicine*. 1960; 39: 117-156.
130. Feigin RD, Anderson DC. Human leptospirosis. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci*. 1975; 5: 413-467.
131. Katz AR, Ansdell VE, Effler PV. Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974-1998. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1834.
132. Vilaichone RK, Mahachai V, Wilde H. Acute acalculous cholecystitis in leptospirosis. *J Clin Gastroenterol* 1999; 29: 280.
133. Vanasco NB, Schmeling MF, Lottersberger J, Costa F, Ko AI, Tarabla HD. Clinical characteristics and risk factors of human leptospirosis in Argentina (1999-2005). *Acta Trop* 2008; 107: 255.
134. Sanford JP. Leptospirosis--time for a booster. *N Engl J Med* 1984; 310: 524.
135. Berman SJ, Tsai CC, Holmes K, Fresh JW, Watten RH. Sporadic anicteric leptospirosis in South Vietnam. *Ann Intern Med*, 1973; 79: 167.
136. Willke Topçu A. *Leptospira* Türleri. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2008; 2369-2378.
137. Feigin RD, Anderson DC. Human leptospirosis. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci*. 1975; 5: 413-467.
138. Turner LH. Leptospirosis I. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1967; 61: 842-855.
139. Dupont H, Dupont-Perdrizet D, Perie JL, Zehner-Hansen S, Jarrige B, Daijardin JB. Leptospirosis: prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 720.
140. Rathnam SR, Rathnam S, Selvaraj S. Uveitis associated with an epidemic outbreak of leptospirosis. *Am J Ophthalmol* 1997; 124: 71.
141. Cetin BD, Harmanakaya O, Hasman H, Gunduz A, Oktar M, Seber E. Acute renal failure: a common manifestation of leptospirosis. *Ren Fail* 2004; 26: 655.

142. Hurst FP, Neff RT, Katz AR. Acute kidney injury requiring hemodialysis in patients with anicteric leptospirosis. *Clin Nephrol* 2009; 72: 186.
143. Romero EC, Blanco RM, Yasuda PH. Aseptic meningitis caused by *Leptospira* spp diagnosed by polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105: 988.
144. Brown PD, Carrington DG, Levett PN, Gravekamp C, Van de Kemp H, Terpstra WJ, Edwards CN, Jones SR, Prussia PR, Garriques S. Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples. *Research in Microbiology* 2003; 154 (8): 581-586.
145. Silva HR, Tanajura GM, Tavares-Neto J, Gomes Md Mde L, Linhares Ad Ada C, Vasconcelos PF, Ko AI. Aseptic meningitis syndrome due to enterovirus and *Leptospira* sp in children of Salvador, Bahia. *Rev Soc Brasil Med Trop.* 2002; 35: 159-165.
146. Helmer RE 3rd, Millsaps RD. Letter: Hypoglycorrachia in leptospirosis. *Ann Intern Med* 1973; 79: 912.
147. Ranke FM, Zanetti G, Hochhegger B, Marchiori E. Infectious diseases causing diffuse alveolar hemorrhage in immunocompetent patients: a state-of-the-art review. *Lung* 2013; 191: 9.
148. Chawla V, Trivedi TH, Yeolekar ME. Epidemic of leptospirosis: an ICU experience. *J Assoc Physicians India* 2004; 52: 619.
149. LaRocque RC, Breiman RF, Ari MD, Morey RE, Janan FA, Hayes JM, Hossain MA, Brooks WA, Levett PN. Leptospirosis during dengue outbreak, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 766.
150. Pappachan MJ, Mathew S, Aravindan KP, Khader A, Bharghavan PV, Kareem MM, Tuteja U, Shukla J, Batra HV. Risk factors for mortality in patients with leptospirosis during an epidemic in northern Kerala. *Natl Med J India* 2004; 17: 240.
151. Amilasan AS, Ujiie M, Suzuki M. Outbreak of leptospirosis after flood, the Philippines, 2009. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 91.
152. Tubiana S, Mikulski M, Becam J, Lacassin F, Lefèvre P, Gourinat AC, Goarant C, D'Ortenzio E. Risk factors and predictors of severe leptospirosis in New Caledonia. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7: e1991.
153. Ko AI, Galvao Reis M, Ribeiro Dourado CM. Salvador Leptospirosis Study Group. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet.* 1999; 354: 820-825.
154. Lopes AA, Costa E, Costa YA. Comparative study of the in-hospital case-fatality rate of leptospirosis between pediatric and adult patients of different age groups. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2004; 46: 19-24.
155. Esen S, Sunbul M, Leblebicioglu H, Eroglu C, Turan D. Impact of clinical and laboratory findings on prognosis in leptospirosis. *Swiss Med Wkly.* 2004; 134: 347-352.

156. Zaki SR, Spiegel RA. Leptospirosis. In: Nelson AM, Horsburgh CR, eds. *Pathology of Emerging Infections*, vol 2. Washington, DC: American Society for Microbiology Press; 1998: 73-92.
157. Abdulkader RC, Seguro AC, Malheiro PS, Burdmann EA, Marcondes M. Peculiar electrolytic and hormonal abnormalities in acute renal failure due to leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 54: 1-6.
158. Edwards CN, Nicholson GD, Hassell T. Thrombocytopenia in leptospirosis: The absence of evidence for disseminated intravascular coagulation. *Am J Trop Med Hyg.* 1986; 35: 352-354.
159. Lai KN, Aarons I, Woodroffe AJ. Renal lesions in leptospirosis. *Aust N Z J Med.* 1982; 12: 276-279.
160. Daher Ede F, Zanetta DM, Abdulkader RC. Pattern of renal function recovery after leptospirosis acute renal failure. *Nephron Clin Pract* 2004; 98: c8.
161. Zaki SR, Shieh W-J. Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicaragua, 1995. *Lancet.* 1996; 347: 535.
162. Yersin C, Bovet P, Mérien F, Clément J, Laille M, Van Ranst M, Perolat P. Pulmonary haemorrhage as a predominant cause of death in leptospirosis in Seychelles. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000; 94: 71-76.
163. Assimakopoulos SF, Fligou F, Marangos M. Anicteric leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome: a case series study. *Am J Med Sci* 2012; 344: 326.
164. Segura ER, Ganoza CA, Campos K. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 343.
165. Im JG, Yeon KM, Han MC, Kim CW, Webb WR, Lee JS, Han YC, Chang WH, Chi JG. Leptospirosis of the lung: radiographic findings in 58 patients. *AJR Am J Roentgenol* 1989; 152: 955.
166. Carvalho CR, Bethlem EP. Pulmonary complications of leptospirosis. *Clin Chest Med* 2002; 23: 469.
167. Marotto PC, Nascimento CM, Eluf-Neto J. Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality. *Clin Infect Dis.* 1999; 29: 1561-1563.
168. Nicodemo AC, Duarte MIS, Alves VAF. Lung lesions in human leptospirosis: Microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural features related to thrombocytopenia. *Am J Trop Med Hyg.* 1997; 56: 181-187.
169. Parsons M. Electrocardiographic changes in leptospirosis. *Br Med J.* 1965; 2: 201-203.
170. Sacramento E, Lopes AA, Costa E, Passos OL, Costa YA, Matos ED. Electrocardiographic alterations in patients hospitalized with leptospirosis in the Brazilian city of Salvador. *Arquiv Brasil Cardiol.* 2002; 78: 267-270.

171. Brito T, Morais CF, Yasuda PH,. Cardiovascular involvement in human and experimental leptospirosis: Pathologic findings and immunohistochemical detection of leptospiral antigen. *Ann Trop Med Parasitol*. 1987; 81: 207-214.
172. Chierakul W, Tientadakul P, Suputtamongkol Y, Wuthiekanun V, Phimda K, Limpai boon R, Opartkiattikul N, White NJ, Peacock SJ, Day NP. Activation of the coagulation cascade in patients with leptospirosis. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 254.
173. Stefos A, Georgiadou SP, Gioti C. Leptospirosis and pancytopenia: two case reports and review of the literature. *J Infect* 2005; 51: e277.
174. Johnson WD Jr, Silva IC, Rocha H. Serum creatine phosphokinase in leptospirosis. *JAMA* 1975; 233: 981.
175. Suman Veerappa Budihal, Khalid Perwez. Leptospirosis Diagnosis: Competancy of Various Laboratory Tests. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2014 Jan, Vol-8(1): 199-202
176. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 757–71.
177. Agampodi SB, Matthias MA, Moreno AC, Vinetz JM. Utility of quantitative polymerase chain reaction in leptospirosis diagnosis: association of level of leptospiremia and clinical manifestations in Sri Lanka. *Clin Infect Dis* 2012; 54: 1249–55.
178. Nizamuddin M, Tuteja U, Shukla J, Nair L, Sudarsana J. Early diagnosis of human leptospirosis by antigen detection in blood. *Indian J Med Microbiol* 2006; 24: 342–345.
179. Sugathan S, Varghese TP. Multiplex PCR on leptospiral isolates from Kolenchery, Kerala, India. *Indian J Med Microbiol* 2005; 23: 114–116.
180. M. Picardeau. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et maladies infectieuses* 43; 2013: 1–9.
181. Dey S, Mohan CM, Ramadass P, Nachimuthu K. Diagnosis of leptospirosis by recombinant antigen based single serum dilution ELISA. *Indian J Med Res* 2008; 128: 172–177.
182. Burriel AR. Leptospirosis: an important zoonotic diseases. In: Méndez-Vilas A. editor. Current research, technology, and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology, Vol. 2 Badajoz: Formatex; 2010. pp. 687–693.
183. Smythe LD, Smith IL, Smith GA, Dohnt MF, Symonds ML, Barnett LJ. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect Dis* 2002; 8: 13.
184. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospire by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol* 2005; 54: 45–9.

185. Kositanont U, Rugsasuk S, Leelaporn A, Phulsuksombati D, Tantitanawat S, Naigowit P. Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57: 117–22.
186. Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the *LipL32* gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 64: 247–55.
187. Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of realtime PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2154–60.
188. Goris MGA, Leeflang MMG, Boer KR, Goeijenbier M, van Gorp ECM, Wagenaar JFP. Establishment of valid laboratory case definition for human leptospirosis. *J Bacteriol Parasitol* 2012; 3: 132.
189. Taylor MJ, Ellis WA, Montgomery JM, Yan KT, McDowell SW. Magnetic immuno-capture PCR assay (MIPA): detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *Vet Microbiol* 1997; 56: 135–145.
190. Schreier S, Doungchawee G, Triampo D, Wangroongsarb P, Hartskeerl RA, Triampo W. Development of a magnetic bead fluorescence microscopy immunoassay to detect and quantify *Leptospira* in environmental water samples. *Acta Trop* 2012; 122: 119–125.
191. Köthe R. Neden ve Nasıl Cilt 3-Mikroskop. Tudem yayınları; 2005: 30.
192. Vijayachari P, Sugunan AP, Umaphathi T, Sehgal SC. Evaluation of darkground microscopy as a rapid diagnostic procedure in leptospirosis. *Indian J Med Res* 2001; 114: 54–58.
193. Uip DE, Amato Neto V and Duarte MS. Diagnostic precoce da leptospirose por demonstracao de antigenos atraves de exame imuno-histoquimico em muco da panturrilha. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1992; 34: 375–381.
194. Alves VA, Vianna MR, Yasuda PH, De Brito T. Detection of leptospiral antigen in the human liver and kidney using an immunoperoxidase staining procedure. *J Pathol*. 1987; 151: 125-131.
195. Guarner J, Shieh W-J, Morgan J. Leptospirosis mimicking acute cholecystitis among athletes participating in a triathlon. *Hum Pathol*. 2001; 32: 750-752.
196. Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. *PLoS One* 2009; 4: e7093.
197. Villumsen S, Pedersen R, Borre MB, Ahrens P, Jensen JS, Krogfelt KA. Novel TaqMan® PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: Pit-falls of in silico validation. *J Microbiol Methods* 2012; 91: 184–190.
198. Thaipadungpanit J, Chierakul W, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Amornchai P, Boonslip S. Diagnostic accuracy of real-time PCR assays

- targeting *16S rRNA* and *lipL32* genes for human leptospirosis in Thailand: a case-control study. *PLoS One* 2011; 6: e16236.
199. Slack A, Symonds M, Dohnt M, Harris C, Brookes D, Smythe L. Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic *Leptospira* spp. Against culture and *Leptospira*-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57: 361–366.
 200. Cermakova Z, Kucerova P, Valenta Z, Pliskova L, Bolehovska R, Prasil P. Leptospirosis: possibilities of early laboratory and clinical diagnosis. *Cent Eur J Med* 2013; 8: 84–89.
 201. Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD. Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol* 2006; 6: 95.
 202. Truccolo J, Serais O, Merien F, Perolat P. Following the course of human leptospirosis: evidence of a critical threshold for the vital prognosis using a quantitative PCR assay. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 204: 17–321.
 203. Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 249: 139–47.
 204. Perez J, Goarant C. Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. *BMC Microbiol* 2010; 10: 325.
 205. Cerqueira GM, McBride AJ, Hartskeerl RA, Ahmed N, Dellagostin OA, Eslabão MR. Bioinformatics describes novel Loci for high-resolution discrimination of *leptospira* isolates. *PLoS One* 2010; 5: e15335.
 206. Perić L, Simasek D, Barbic J, Perić N, Prus V, Sisljagic V. Human leptospirosis in Eastern Croatia, 1969–2003: epidemiological, clinical, and serological features. *Scand J Infect Dis* 2005; 37: 738–741.
 207. Moreno N, Agudelo-Flores P. Aplicación de las Pruebas de PCR Convencional Simple y Múltiple para la Identificación de Aislamientos de *Leptospira* spp. en Colombia. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2010; 27: 548–556.
 208. Vital-Brazil JM, Balassiano IT, Oliveira FS, Costa AD, Hillen L, Pereira MM. Multiplex PCR-based detection of *Leptospira* in environmental water samples obtained from a slum settlement. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105: 353–355.
 209. Aviat F, Blanchard B, Michel V, Blanchet B, Branger C, Hars J, Mansotte F, Brasme L, De Champs C, Bolut P, Mondot P, Faliu J, Rochereau S, Kodjo A, Andre-Fontaine G. *Leptospira* exposure in the human environment in France: a survey in feral rodents and in fresh water. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2009; 32: 463–476.
 210. Ahmed A, Thaipadungpanit J, Boonsilp S, Wuthiekanun V, Nalam K, Spratt BG. Comparison of two multilocus sequence based genotyping schemes for *Leptospira* species. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5: e1374.
 211. Sonthayanon P, Chierakul W, Wuthiekanun V, Thaipadungpanit J, Kalambaheti T, Boonsilp S. Accuracy of loop-mediated isothermal

- amplification for diagnosis of human leptospirosis in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84: 614–620.
212. Koizumi N, Nakajima C, Harunari T, Tanikawa T, Tokiwa T, Uchimura E. A new loop-mediated isothermal amplification method for rapid, simple, and sensitive detection of *Leptospira* spp. in urine. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2072–2074.
 213. Lin X, Chen Y, Lu Y, Yan J, Yan J. Application of a loop-mediated isothermal amplification method for the detection of pathogenic *Leptospira*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 63: 237–242.
 214. Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother* 2009; 15: 62–69.
 215. Palmer MF, Zochowski WJ. Survival of leptospires in commercial blood culture systems revisited. *J Clin Pathol.* 2000; 53: 713-714.
 216. Levett PN. *Leptospira*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press; 2007: 963-970.
 217. Schreier S, Dounghawee G, Chadsuthi S, Triampo D, Triampo W. Leptospirosis: current situation and trends of specific laboratory tests. *Expert Rev Clin Immunol* 2013; 9: 263.
 218. Levett PN, Whittington CU. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 11.
 219. Vedhagiri K, Velineni S, Timoney JF, Shanmughapriya S, Vijayachari P, Narayanan R, Natarajaseenivasan K. Detection of LipL32-specific IgM by ELISA in sera of patients with a clinical diagnosis of leptospirosis. *Pathog Glob Health* 2013; 107: 130.
 220. Desakorn V, Wuthiekanun V, Thanachartwet V. Accuracy of a commercial IgM ELISA for the diagnosis of human leptospirosis in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 86: 524.
 221. Tanganuchitcharnchai A, Smythe L, Dohnt M, Hartskeerl R, Vongsouvath M, Davong V, Lattana O, Newton PN, Blacksell SD. Evaluation of the Standard Diagnostics *Leptospira* IgM ELISA for diagnosis of acute leptospirosis in Lao PDR. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012; 106: 563.
 222. Martin L, Pettit A. Sero-diagnostic de la spirochaetose icterohaemorrhagique. *Bull Mem Soc Med Hop Paris* 1918; 42: 672–675.
 223. Levett PN. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clin Infect Dis.* 2003; 36: 447-452.
 224. Smythe LD, Wuthiekanun V, Chierakul W, Suputtamongkol Y, Tiengrim S, Dohnt MF, Symonds ML, Slack AT, Apiwattanaporn A, Chueasuwanchai S, Day NP, Peacock SJ. The microscopic agglutination test (MAT) is an unreliable predictor of infecting *Leptospira* serovar in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 81: 695.

225. Kusum M, Boonsarthorn N, Biaklang M, Sina U, Sawanpanyalert P, Naigowit P. Comparison of leptospiral serovars identification by serology and cultivation in north-eastern region, Thailand. *J Med Assoc Thai* 2005; 88: 1098–1102.
226. Centers for Disease Control and Prevention. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. *Morbidity and Mortality Weekly Report MMWR*. 1997; 46(RR-10): 49.
227. Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel RA, Plikaytis BD, Perkins BA, Phelan M, Levett PN, Weyant RS. Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 803-809.
228. Cumberland PC, Everard COR, Wheeler JG. Persistence of anti-leptospiral IgM, IgG and agglutinating antibodies in patients presenting with acute febrile illness in Barbados 1979- 1989. *Eur J Epidemiol*. 2001; 17: 601-608.
229. Cumberland PC, Everard COR, Levett PN. Assessment of the efficacy of the IgM enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg*. 1999; 61: 731-734.
230. Matsuo K, Isogai E, Araki Y. Control of immunologically crossreactive leptospiral infection by administration of lipopolysaccharides from a nonpathogenic strain of *Leptospira biflexa*. *Microbiol Immunol* 2000; 44: 887–890.
231. Honarmand HR, Abdollahpour G, Eshraghi SS. Comparison of two ELISA methods for the laboratory diagnosis of acute leptospirosis. *Iran J Med Sci* 2010; 35: 116–121.
232. Levett PN, Branch SL, Whittington CU, Edwards CN, Paxton H. Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001; 8: 349–351.
233. Cumberland P, Everard CO, Levett PN. Assessment of the efficacy of the IgM enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 1999; 61: 731–734.
234. Ooteman MC, Vago AR, Koury MC. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *Journal of Microbiological Methods*. 2005; 65 (2) 247-257.
235. Fonseca de A C, Teixeira de Freitas VL. Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis. *Trop Med Inst Health*. 2006; 11(11): 1699-707.
236. Silva MV, Camargo ED, Batista L, Vaz AJ, Brandão AP, Nakamura PM. 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* 1995; 98: 268–272.
237. Khoa TDT, Tran TTN, Hoang LP, Phan TG, Le QH, Tran QB, Nguyen VN, Rudy AH, Peter JV. Seroepidemiology and serological follow-up of anti-

- leptospiral IgG in children in Southern Vietnam. *Acta Tropica*. 2008; 106: 128–131.
238. Pascale B, Muriel V, Mathieu P. Evaluation of an in-house ELISA using the intermediate species *Leptospira* for diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol*. 2013; 62: 822-827.
 239. Wiwanitkit V. Comparison between blood exchange and classical therapy for acute renal failure in Weil's disease: appraisal on Thai reports. *Nephrology (Carlton)* 2006; 11: 481.
 240. McClain JB, Ballou WR, Harrison SM, Steinweg DL. Doxycycline therapy for leptospirosis. *Ann Intern Med*. 1984; 100: 696-698.
 241. Edwards CN, Nicholson GD, Hassell TA. Penicillin therapy in icteric leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg*. 1988; 39: 388-390.
 242. Watt G, Padre LP, Tuazon ML. Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. *Lancet*. 1988; i: 433-435.
 243. Costa E, Lopes AA, Sacramento E. Penicillin at the late stage of leptospirosis: A randomized controlled trial. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2003; 45: 141-145.
 244. Panaphut T, Domrongkitchaiporn S, Vibhagool A, Thinkamrop B, Susaengrat W. Ceftriaxone compared with sodium penicillin G for treatment of severe leptospirosis. *Clin Infect Dis*. 2003; 36: 1507-1513.
 245. Friedland JS, Warrell DA. The Jarisch-Herxheimer reaction in leptospirosis: Possible pathogenesis and review. *Rev Infect Dis*. 1991; 13: 207-210.
 246. Guerrier G, D'Ortenzio E. The Jarisch-Herxheimer reaction in leptospirosis: a systematic review. *PLoS One* 2013; 8: e59266.
 247. Tunbridge AJ, Dockrell DH, Channer KS, McKendrick MW. A breathless triathlete. *Lancet* 2002; 359: 130.
 248. McClain JB, Ballou WR, Harrison SM, Steinweg DL. Doxycycline therapy for leptospirosis. *Ann Intern Med* 1984; 100: 696.
 249. Watt G, Padre LP, Tuazon ML, Calubaquib C, Santiago E, Ranoa CP, Laughlin LW. Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. *Lancet* 1988; 1: 433.
 250. Edwards CN, Nicholson GD, Hassell TA. Penicillin therapy in icteric leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 39: 388.
 251. Costa E, Lopes AA, Sacramento E, Costa YA, Matos ED, Lopes MB, Bina JC. Penicillin at the late stage of leptospirosis: a randomized controlled trial. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2003; 45: 141.
 252. Brett-Major DM, Coldren R. Antibiotics for leptospirosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 2: CD008264.
 253. Murray CK, Hospenthal DR. Determination of susceptibilities of 26 *Leptospira* sp. serovars to 24 antimicrobial agents by a broth microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4002.

254. Moon JE, Ellis MW, Griffith ME, Hawley JS, Rivard RG, McCall S, Hospenthal DR, Murray CK. Efficacy of macrolides and telithromycin against leptospirosis in a hamster model. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1989.
255. Alt DP, Zuerner RL, Bolin CA. Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 219: 636.
256. Griffith ME, Moon JE, Johnson EN. Efficacy of fluoroquinolones against *Leptospira interrogans* in a hamster model. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2615.
257. Ressler RA, Griffith ME, Beckius ML, Pimentel G, Miller RS, Mende K, Fraser SL, Galloway RL, Hospenthal DR, Murray CK. Antimicrobial susceptibilities of geographically diverse clinical human isolates of *Leptospira*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2750.
258. Wuthiekanun V, Amornchai P, Paris DH. Rapid isolation and susceptibility testing of *Leptospira* spp. using a new solid medium, LVW agar. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 297.
259. Kularatne SA, Budagoda BD, de Alwis VK, Wickramasinghe WM, Bandara JM, Pathirage LP, Gamlath GR, Wijethunga TJ, Jayalath WA, Jayasinghe C, Pinto V, Somaratne P, Kumarasiri PV. High efficacy of bolus methylprednisolone in severe leptospirosis: a descriptive study in Sri Lanka. *Postgrad Med J* 2011; 87: 13.
260. Thunga G, John J, Sam KG, Khera K, Khan S, Pandey S, Maharaj S. Role of high-dose corticosteroid for the treatment of leptospirosis-induced pulmonary hemorrhage. *J Clin Pharmacol* 2012; 52: 114.
261. Minor K, Mohan A. Severe leptospirosis: treatment with intravenous corticosteroids and supportive care. *Am J Emerg Med* 2013; 31: 449.e1.
262. Azevedo AF, Miranda-Filho Dde B, Henriques-Filho GT. Randomized controlled trial of pulse methyl prednisolone × placebo in treatment of pulmonary involvement associated with severe leptospirosis. *BMC Infect Dis* 2011; 11: 186.
263. Andrade L, de Francesco Daher E, Seguro AC. Leptospiral nephropathy. *Semin Nephrol.* 2008; 28: 383-394.
264. Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM. Effect of a protective- ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 1998; 338: 347-354.
265. Douglin CP, Jordan C, Rock R, Hurley A, Levett PN. Risk factors for severe leptospirosis in the parish of St. Andrew, Barbados. *Emerg Infect Dis.* 1997; 3: 78-80.
266. André-Fontaine G, Branger C, Gray AW, Klaasen HL. Comparison of the efficacy of three commercial bacterins in preventing canine leptospirosis. *Vet Rec* 2003; 153: 165.

267. Hancock GA, Wilks CR, Kotiw M, Allen JD. The long term efficacy of a hardjo-pomona vaccine in preventing leptospiruria in cattle exposed to natural challenge with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Aust Vet J* 1984; 61: 54.
268. Rinehart CL, Zimmerman AD, Buterbaugh RE. Efficacy of vaccination of cattle with the *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjoprajitno component of a pentavalent *Leptospira* bacterin against experimental challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjo-bovis. *Am J Vet Res* 2012; 73: 735.
269. Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 1.
270. Bey RF, Johnson RC. Current status of leptospiral vaccines. *Prog Vet Microbiol Immunol.* 1986; 2: 175-197.
271. Naiman BM, Alt D, Bolin CA. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gammadelta T lymphocytes. *Infect Immun.* 2001; 69: 7550-7558.
272. Brown RA, Blumerman S, Gay C. Comparison of three different leptospiral vaccines for induction of a type 1 immune response to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *Vaccine.* 2003; 21: 4448-4458.
273. Bolin CA, Alt DP. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *Am J Vet Res.* 2001; 62: 995-1000.
274. Martínez R, Pérez A, Quiñones Mdel C. Eficacia y seguridad de una vacuna contra la leptospirosis humana en Cuba. *Rev Panam Salud Publica.* 2004; 15: 249-255.
275. Takafuji ET, Kirkpatrick JW, Miller RN. An efficacy trial of doxycycline chemoprophylaxis against leptospirosis. *N Engl J Med* 1984; 310: 497.
276. Sehgal SC, Sugunan AP, Murhekar MV. Randomized controlled trial of doxycycline prophylaxis against leptospirosis in an endemic area. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 13: 249.
277. Hospenhal DR, Murray CK. In vitro susceptibilities of seven *Leptospira* species to traditional and newer antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 2646-2648.
278. WMA, *Declaration Of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects*, in *59th WMA General Assembly*, W.M. Association, Editor. October 2008: Seoul.
279. T.C. Sağlık Bakanlığı İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü, *İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu*. 1995, T.C. Sağlık Bakanlığı: Ankara.
280. Akdur R. İstatistik Formüller. Sağlık Bilimlerinde Araştırma ve Tez Yapma Rehberi Ek-2. Ankara; 1996: 19.
281. Turhan V. Leptospiroz. Enfeksiyon Hastalıkları. Kurt H, Gündeş S, Geyik M. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul; 2013: 464-466.

282. Azkur AK, Kaygusuz S, Aslan ME, Gazyağcı S, Gözütok S, Toyran K. A survey study on hantavirus, cowpox virus, and *Leptospira* infections in *Microtus hartingi* in Kırşehir Province, Central Anatolia, Turkey. Turk J Vet Anim Sci 2013; 37: 434-442.
283. Aktan M. Memleketimiz leptospira enfeksiyonları üzerine araştırma. Turk Hij Den Biyol Derg 1958; 18: 253-260.
284. Fazlı ŞA. Türkiye'de insan, evcil hayvan ve yabani kemiricilerde leptospira serolojisi. Turk Hij Den Biyol Derg 1970; 30 (2): 155-184.
285. Vardar T. 1963-1974 yılları arasında yurdumuzda evcil hayvanlarda görülen leptospirosis olayları. Etlik Vet Bakteriyol Enst Derg 1976; 4 (5-10):147-162.
286. Yarkın F, Sadr RE, Sadr YE, Apan T, Yiğit S, Köksal F. Çukurova Bölgesinde Leptospiroz. Klimik Derg 1996; 9 (3): 138-141.
287. Yusuf Ziya Demiroğlu, Tuba Turunc, Mutlu Kasar, Can Boğa, Funda Timurkaynak. Weil Hastalığı: Çukurova'dan Dört Olgu Bildirimi. Klimik Dergisi 2011; 24(1): 52-56.
288. G. Puliyath, S. Singh. Leptospirosis in pregnancy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2012) 31: 2491–2496.
289. Desai S, van Treeck U, Lierz M, Espelage W, Zota L, Sarbu A, Czerwinski M, et al. Resurgence of field fever in a temper-ate country: an epidemic of leptospirosis among seasonalstrawberry harvesters in Germany in 2007. Clin Infect Dis 2009;48 (6): 691-697.
290. Poepl W, Orola MJ, Herkner H, Müller M, Tobudic S, Faas A, Mooseder G, Allerberger F, Burgmann H. High prevalence of antibodies against leptospira in male austrian adults: a cross sectional survey, April to June 2009. Euro Surveill. 2013; 18 (25): pii=20509.
291. Gonçaves DD, Benitez A, Mori FMRL, Alves LA, Freire RL, Navarro IT, Santana MAZ, Santos LRA, Carreira T, Vieira ML, Freitas JC. Zoonoses in humans from small rural properties in Jataizinho, Parana, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology 2013; 44 (1): 125-131.
292. Murhekar MV, Sugunan AP, Vijayachari P, Sharma S, Sehgal SC. Risk factors in the transmission of leptospiral infection. Indian J Med Res 1998; 107: 218-223.
293. Saleem MH, Khan MS, Durrani AZ, Hassan A, Ijaz M, Ali MM. Leptospirosis: An Emerging Zoonosis in Pakistan. Pakistan J. Zool. 2013; 45 (4): 909-912.
294. Gomard Y, Silai R, Hoarau G, Bon K, Gonneau F, Yssouf A, Michault A, Dellagi K, Tortosa P. Serologic Evidence of Leptospirosis in Humans, Union of the Comoros, 2011. Emerging Infectious Diseases 2014; 20: 4.
295. Allwooda P, Zanzib CM, Changa M, Brown PD. Knowledge, perceptions, and environmental risk factors among Jamaican households with a history of leptospirosis. Journal of Infection and Public Health 2014; article in press.
296. Felzemburgh RDM, Ribeiro GS, Costa F, Reis RB, Hagan JE, Melendez AXTO, Fraga D, Santana FS, Mohr S, Santos BL, Silva AQ, Santos AC,

Ravines RR, Tassinari WS, Carvalho MS, Reis MG, Ko AI. Prospective Study of Leptospirosis Transmission in an urban slum community: Role of Poor Environment in Repeated Exposures to the *Leptospira* Agent. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2014; 8 (5): e2927.

297. Vidigal FFR, Tomé AV, Munoz NN, Borruel MMG, Sanz AM. Leptospirosis in South-western Spain. *Rev Clin Esp.* 2014; 214 (5): 247-252.
298. Pages F, Polycarpe D, Dehecq JS, Picardeau M, Caillère N, Bandjee MJF, Michault A, Filleul L. Human Leptospirosis on Reunion Island: Past and Current Burden. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2014; 11: 968-982.