

LEPTOSPIROZİSİN KLİNİK MİKROBİYOLOJİK TANISI VE SON GELİŞMELER

CLINICAL MICROBIOLOGICAL DIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS AND THE LAST IMPROVEMENTS

A. Levent KOCABIYIK*

Cengiz ÇETİN*

ÖZET

Leptospirozis, evcil ve vahşi hayvanlar ile insanlarda Leptospira interrogans serovarlarının neden olduğu, dünya çapında yaygınlık gösteren zoonoz bir enfeksiyondur. Hastalık abort, yaşama gücü zayıf buzağı doğumu, süt veriminde düşme ve infertilite nedeniyle önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Leptospirozis, geniş spektrumlu semptomları ve klinik bulguları nedeniyle birçok bakteriyel, viral ve paraziter hastalıklarla benzerlik göstermekte, bu nedenle de klinik mikrobiyolojik tanı enfeksiyonun kesin teşhisinde tek çıkar yol olmaktadır. Bu derlemede, kültür, direkt mikroskopik muayene, moleküler ve serolojik metotlar gibi klinik mikrobiyolojik tanı metotları son gelişmeler ile birlikte sunulmuştur.

Anahtar kelimeler: Leptospirosis, klinik mikrobiyolojik tanı

SUMMARY

Leptospirosis is a world-wide zoonotic infection that affects domestic and wild animals and humans caused by serovars of Leptospira interrogans. Disease causes economic losses due to abortion, stillbirth, birth of premature and weak infected calves, infertility, mastitis, reduced milk production and death causing important financial losses in cattle breeding. Due to these broad spectrum of symptoms and clinical signs, the disease resembles to other bacterial, viral, and parasitic diseases so that clinical microbiological diagnosis is considered to be sole way for exact diagnosis. In this review article, clinical microbiological diagnostic methods including culture, direct microscopic examination, molecular and serological methods are presented with the last improvements.

Key words: Leptospirosis, clinical microbiological diagnosis

GİRİŞ

Leptospirozis evcil ve vahşi hayvanlar ile insanlarda, *Leptospira interrogans* serovarları tarafından meydana getirilen yüksek ateş, konjunktival akıntı, daha ağır olgularda meninjitis, pulmonar konjesyon, böbrek ve karaciğer yetmezliği, hemoraji, hemoglobinuri, özellikle çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde büyük ekonomik kayıplara yol açan sarılık, abort, ölü doğum, premature ve zayıf yapıları

yavru doğumu, infertilite, mastitis, süt veriminde azalma ve ölüm ile ekonomik kayıplara neden olan, tropikal ve subtropikal bölgeler başta olmak üzere dünya çapında yaygınlık gösteren, zoonoz özellikle spiroketal bir hastalıktır (10, 15, 21).

Leptospiralar, *Spirochaetales* takımının *Leptospiraceae* familyasında bulunan, helikal şekilli, bir veya iki ucu kanca şeklinde kıvrılmış, 10-20 µm uzunluğunda, 0.1-0.15 µm halka genişliğine ve 0.5 µm halka uzunluğuna sahip, iki adet perioplazmik flagella ile aktif hareket gösteren, optimum üreme

Kabul Tarihi: 17.11.2003

* UÜ, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji ABD, BURSA

Leptospirozisin klinik mikrobiyolojik tanısı - KOCABIYIK, ÇETİN

ısıları 28-30C olan, katalaz ve oksidaz pozitif, obligat aerob ve gram-negatif bakterilerdir (10, 15). Çeşitli hayvan türleri ve insanlar için patojen olan tüm leptospiralar yakın zamana kadar sadece *L. interrogans* türü içinde sınıflandırılmakta iken, son genetik taksonomik gelişmelerle *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. inadai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. kirschneri* ve *L. fainei* olmak üzere sekiz yeni patojen tür içinde de sınıflandırılmaya başlanmıştır. Şu ana kadar, izolatlar arasında gözlenen antijenik kros-reaksiyona göre 23 serogrup ve yüzey aglutininleri esas alınarak yapılan çalışmalarda 230 serovar identifiye edilmiştir (10).

Leptospirozis geniş spektrumlu semptomları ve klinik bulguları nedeniyle diğer birçok bakteriyel, viral ve paraziter hastalıklarla benzerlik göstermektedir. Ayrıca, enfeksiyonu meydana getiren leptospira serovarına bağlı olarak da hayvan türlerinde ve insanlarda klinik tablo değişebilmektedir. Tüm bu nedenlerle leptospiroziste ayırıcı tanı oldukça büyük önem taşımakta ve klinik mikrobiyolojik tanı metotları enfeksiyonun kesin teşhisinde tek çıkar yol olmaktadır. Ayırıcı tanıda göz

önünde bulundurulması gereken hastalıklar Tablo 1'de özetlenmiştir.

Leptospirozisin klinik mikrobiyolojik tanısı

Leptospiroziste klinik bulgular ve otopsi bulguları teşhise yardımcı olmakla birlikte kesin teşhis direkt mikroskopik muayene, kültür, moleküler metotlar ve serolojik metotlar gibi klinik mikrobiyolojik tanı metotları ile mümkün olmaktadır (10, 12, 21). Leptospirozisin klinik mikrobiyolojik tanısında kullanılan metotlar Tablo 2'de özetlenmiştir.

Direkt mikroskopik muayene

Peritoneal ve pleural sıvılar, leptospireminin olduğu akut enfeksiyonların ilk birkaç gününde kan, leptospiruri döneminde idrar, CSF (beyin omurilik sıvısı) ve diyaliz sıvıları *karanlık saha mikroskopisi* ile incelenir (10, 12, 15). *Karanlık saha mikroskopisi* ile bu sıvılarda leptospiraları görebilmek için 1ml'de yaklaşık 10^4 leptospira bulunması gerekli iken (15), kantitatif buffy coat analizi (QBC) ile kanda yaklaşık 10^3 leptospira/ml tespiti yapılabilmektedir (14).

Tablo 1: Leptospirozisin ayırıcı tanısında göz önünde bulundurulması gereken hastalıklar (12, 15, 21).

Ağır Adenovirus enfeksiyonları	Influenza
Akut abdomen	Kimyasal madde zehirlenmeleri
Aseptik meninjitis	Legionnar hastalıklar
Atipik pneumonia	Malaria
Bakteriyel ve viral meninjitisler	Pharyngitis
Borreliosis	Poliomyelitis
Brucellosis	Pulmonar tuberculosis
Dangue haemorrhagic fever (DHF)	Pyelonephritis
Enterik hastalıklar	Rickettsiosis (Q fever, typhus)
Ehrlichiosis	Sepsis
Gastroenteritis	Syphilis
Gıda zehirlenmeleri	Toxoplasmosis
Haemorrhagic fever'a yol açan viral enfeksiyonlar	Tularemia
Hanta-virus enfeksiyonu	Typhoid
HIV	Viral hepatitis
Infectious mononucleosis (Glandular fever)	Yellow fever

Tablo 2: Leptospirozisin klinik mikrobiyolojik tanısında kullanılan metotlar.

Direkt mikroskopik muayene

1. Karanlık saha mikroskopisi
2. Kantitatif buffy coat analizi (QBC)
3. Işıık mikroskopisi
 - 3.1. Giemsa, Leishman (kan)
 - 3.2. Dobell, Wartin-Starry, Faine, Dieterle (doku)
 - 3.3. Gümüşleme metotları (doku, vücut sıvıları)
4. İmmunboyamalar
 - 4.1. İmmunofluoresan
 - 4.2. İmmunohistokimyasal boyamalar
 - 4.2.1. İmmunoperoksidaz
 - 4.2.2. İmmunofosfataz
 - 4.2.3. İmmunogold

Kültür

Moleküler metotlarla tanı

1. DNA hibridizasyonu
 - 1.1. Dot-blotting
 - 1.2. In situ hibridization
2. PCR
 - 2.1. PCR, serum
 - 2.2. PCR, idrar
 - 2.3. PCR, CSF
 - 2.4. PCR, aqueous humor

Serolojik tiplendirme

1. Kros-aglutinasyon absorpsiyon testi (CAAT)
2. Antijenik faktör analizi (Factor analysis)
3. Monoklonal antikorlarla aglutinasyon

Moleküler tiplendirme

1. Restriction endonuclease analysis (REA)
2. Restriction fragment length polymorphism (RFLP)
3. Ribotyping
4. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)
5. Mapped restriction site polymorphism (MRSP)
6. Arbitrarily primed PCR (AP-PCR)

Kan ile hazırlanan preparatlar *Giemsa* ve *Leishman* gibi Romanowsky boyları ile; karaciğer, dalak ve böbrek gibi iç organlar ile vücut sıvılarından hazırlanan preparatlar Fontana gibi *gümüşleme metotlarından* biri ile; formalinle fikze edilmiş doku örnekleri *Dobell*, *Wartin-Starry*, *Faine* ve *Dieterle* metotlarından biri ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenir. Leptospirozis döneminde idrar ile hazırlanan preparatlar, PCR ve bakteriyolojik kül-

Mikroskopik aglutinasyon testi (MAT)

Makroskopik slayt aglutinasyon testi (MSAT)

ELISA

- ELISA, IgM ve IgG, serum
ELISA, IgA, serum
ELISA, IgG, süt
ELISA, IgM, CSF
ELISA, IgM, saliva

LEPTO dipstick assay

Latex aglutinasyon testi (Lepto dri dot)

Immunocomb

İndirekt hemaglutinasyon testi (IHA)

One-point mikrokapsül aglutinasyon testi

İmmunofluoresan antikor testi (IFAT)

Patoc slayt aglutinasyon testi

Sensitized erythrocyte lysis (SEL)

Thin-layer immunoassay

Radioimmunoassay (RIA)

Counterimmuno-electrophoresis (CIE)

İmmunomagnetic antigen capture

Komplement fikzasyon (CF)

tür ile eşdeğer sensitiviteye sahip olduğu bildirilen *immunofluoresan* ve *immunoperoksidaz* boyama teknikleri ile boyanarak da incelenebilmektedir (10, 15, 32). Klinik materyallerde, *immunofosfataz* ve *immunogold* gibi diğer *immunohistokimyasal* metotlarla da leptospiralar tespit edilebilmektedir (10).

Kültür

Enfeksiyonun ilk 8-10 gününde kan, karaciğer, dalak, böbrek gibi vasküler organlar ve CSF,

daha sonraki dönemlerde ise idrar, böbrek dokuları, aqueous humor, genital kanal doku ve akıntıları ve atık fütusa ait iç organlar kültür amacıyla değerlendirilir (10, 12, 15, 27). İdrarın hem dilüe edilmeden hem de idrarda bulunabilecek üremeyi engelleyen substansların eliminasyonu amacıyla 10 katlı sulandırılarak ekimlerinin yapılması önerilmektedir (12). Gerekli görüldüğü takdirde sıvı materyaller bakteriyolojik filtrelerden (0.22-0.45 µm) geçirildikten sonra ekimleri yapılabilmektedir (12, 15).

Tween 80 ve sığır serum albumini içeren EMJH (Ellinghausen, McCullough, Jhonson, Harris) medium, leptospiraların kültüründe en çok kullanılan besiyeridir. Leptospiraların pirimidin analogu 5-fluorouracil'e dirençlik göstermeleri nedeniyle bu madde, kan ve idrar gibi klinik materyallerden leptospiraların izolasyonu amacıyla kullanılacak besiyerlerine selektifliğin sağlanması amacıyla katılmaktadır. Besiyerleri 28-30°C'de inkübe edilmeli, üreme sağlanıncaya kadar periyodik hafta-

lık kontrolleri yapılarak 13 hafta boyunca bekletilmelidir (10, 12, 15). Leptospiraların kültüründe kullanılan çeşitli sıvı, yarı-katı ve katı besiyerleri, zenginleştirilmiş-selektif besiyerleri ve diferansiyel besiyerleri spesifik kullanım amaçları ile birlikte Tablo 3'de özetlenmiştir.

Moleküler metotlarla tanı

Günümüzde *dot-blotting* ve *in situ hibridizasyon* gibi DNA problemleri ile hibridizasyon teknikleri yerine PCR daha çok tercih edilmekte, serum (19), idrar (19, 32), aqueous humor (6) ve CSF (19, 23) gibi klinik materyallerde yüksek sensitivite ile kısa zamanda leptospiralar tespit edilebilmektedir. PCR, 5-10 leptospira/ml sensitivite ile sığır idrar örneklerinde teşhis yapabilmektedir (7, 21). Sığır idrar örneklerinde mevcut inhibitörlerin olumsuz etkisini ortadan kaldırarak daha yüksek sensitivite sağlayan *magnetic immunocapture* PCR (31), patojenik leptospiraların non-patojenik leptospiralardan hızlı bir şekilde ayrımını mümkün kılan *fluorescent* -

Tablo 3: Leptospiraların kültüründe kullanılan besiyerleri ve spesifik kullanım amaçları (10, 12, 15).

Besiyeri çeşitleri		Kullanım amaçları
Serumlu sıvı besiyerleri (%8-10 tavşan serumu)	Stuart medium	Leptospiraların izolasyonu (1-3 ay ink.)
	Vervoort medium	
	Schüffner medium	
	Korthof medium	
	Noguchi medium	
Serumsuz sıvı besiyerleri	EMJH medium	Leptospiraların izolasyonu (1-3 ay ink.)
	Proteinsiz veya protein oranı düşük besiyerleri	Aglutinasyon testleri için antijen hazırlanması
Yarı-katı besiyerleri	Fletcher medium	Stok kültürlerin muhafazası (oda ısısında ink., 3 ayda bir pasaj)
	Oleik asit-albumin (OA) medium	
Katı besiyerleri	Sıvı besiyeri + % 0.8-1.3 agar	Leptospiraların izolasyonu (7-14 gün ink.)
Zenginleştirilmiş- selektif besiyeri	Tween80/Tween40/LAH medium	Leptospiraların izolasyonu
Diferansiyel besiyeri	EMJH medium + 8-azaguanine	Patojen ve saprofit leptospiraların ayrımı

probe 5' exonuclease PCR (33) ve serovar düzeyinde teşhis olanağı sağlayan çeşitli serovar-spesifik PCR testleri (5, 18), bu alandaki yeni ve son gelişmelerdir.

Moleküler tiplendirme

Kros-aglutinasyon absorpsiyon testi (CAAT), *antijenik faktör analizi (Factor analysis)* ve *monoklonal antikorlarla aglutinasyon* metodları gibi serolojik tiplendirme metodları ile ayırt edilemeyen sığır leptospirozisinin başlıca etkeni serovar *hardjo*'nun, epidemiyoloji ve meydana getirdikleri klinik tablo açısından önemli farkları bulunan *hardjoprajitno* ve *hardjobovis* genotipleri *restriction endonuclease analysis (REA)*, *ribotyping*, *arbitrarily primed PCR*, *mapped restriction site polymorphism (MRSP)*, *restriction fragment length polymorphism (RFLP)* ve *pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)* ile kolaylıkla tanımlanabilmektedir (15).

Mikroskopik aglutinasyon testi (MAT)

MAT serumda IgM ve IgG antikorları saptayan, leptospirozisin serolojik teşhisinde en yaygın olarak kullanılan, uluslararası standart ve referans bir testtir. Enfeksiyondan 7-9 gün sonra MAT ile pozitiflik saptanabilmektedir. Test, leptospira serovarlarına ait canlı antijenler ile bir seri sulandırılmış serumun reaksiyonu esasına dayanır. İnkübasyondan sonra antijen-serum karışımı aglutinasyon oluşumu veya leptospiraların lizisi açısından karanlık saha mikroskopisi ile incelenir ve titre belirlenir (10, 12, 15, 21). MAT ile leptospirozisin teşhisi, bazı bölgelerde belli aralıklarla alınmış çift serum örneklerinde 4 katlı titre artışı ile yapılırken, bazı bölgelerde ise tek serum örneğinin en düşük sulandırmada (1/50 veya 1/100) %50 aglutinasyon vermesi yeterli kabul edilmektedir (15, 21). Çift serum örnekleri ile test uygulanacaksa, leptospirozis semptomlarının açıkça gözlemlendiği dönemde 3-5 gün, enfeksiyonun başlangıç zamanı bilinmiyorsa ve

semptomlar gözlenmiyorsa 10-14 gün, serokonversiyonun uzun zaman aldığı bireylerde daha uzun aralıklarla serum örnekleri alınmalı ve test edilmelidir (15).

IgM antikorların, IgG antikorlarına nazaran aglutinasyon oluşturma kabiliyetleri daha yüksek olduğundan, enfeksiyonun akut döneminde MAT ile yapılan serolojik incelemelerde, ileri dönemde yapılan incelemelere nazaran daha yüksek oranda aglutinasyon titreleri elde edilmektedir (12, 27). Ancak, bu dönemde enfeksiyondan sorumlu olmayan serovarlarla kros-reaksiyon oluşma riski de yüksektir. Enfeksiyonun ileri dönemlerinde yapılan incelemelerde ise antikor yanıtının serovar spesifikliğinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (12). Levett'e göre ise MAT yaygın inancın aksine serogrup-spesifiktir ve akut-faz serumlarında serogruplar arasında kros-reaksiyon oluşma riski yüksektir (15).

MAT, diğer hiçbir serolojik metotta gözlenemeyen yüksek diagnostik spesifiteye sahiptir (12). Bu nedenle MAT, bir çok araştırmacı tarafından leptospirozisin serolojisinde "altın standart" olarak kabul edilmektedir.

Makroskopik slayt aglutinasyon testi (MSAT)

Test, formalin ile veya ısı etkisi ile inaktive edilmiş bir damla leptospira süspansiyonu ile, aynı miktarda insan veya hayvan serumunun bir slayt üzerinde karıştırılması suretiyle uygulanır ve aglutinasyon oluşması yönünden incelenir. MSAT'nin sensitivitesinin MAT'inkine nazaran daha düşük olduğu ve daha düşük serum titrelerinin elde edildiği fakat, leptospirozisin erken teşhisinde ve epidemiyolojik taramalarda kullanışlı bir test olabileceği bildirilmiştir (10, 12). Beşeri alanda kullanıma yönelik MSAT ticari kiti ile (Simples Teste; BioManguinhos, FIOCRUZ), IgM-

Leptospirozisin klinik mikrobiyolojik tanısı - KOCABIYIK, ÇETİN

ELISA'nınkine eş değer sensitivite ve spesifite ile leptospiral antikorlar tespit edilebilmektedir (4).

ELISA

ELISA'nın en önemli avantajı IgM- ve IgG-spesifik ELISA ile akut leptospirozisin kronik leptospirozisten ayırt edilebilmesidir (12, 15, 27). ELISA ile IgM antikorların enfeksiyona müteakip 2-6 gün içinde, IgG ve IgA antikorların ise 5-8 gün içinde tespiti yapılabilmektedir (15). ELISA ile MAT'ta olduğu gibi aşı titrelerinin enfeksiyon titrelerinden ayırımı mümkün olmamaktadır. ELISA'nın sensitivitesinin MAT'inkine nazaran daha yüksek fakat spesifitesinin düşük olduğu bildirilmiştir (12). IgM-ELISA ile tükürük, salya (25) ve beyin omurilik sıvısında da (26) leptospiral antikorların tespiti yapılabilmektedir.

Günümüzde veteriner ve beşeri alanda kullanıma yönelik çeşitli ticari ELISA test sistemleri geliştirilmiştir. Bunlar, sığır serum ve süt örneklerinde yüksek sensitivite ve spesifite ile IgG antikorları saptayabilen L hardjo ELISA ceditest (Institute for Animal Science and Health, Lelystad, the Netherlands) (1, 13, 34); konjugat olarak alkalinosfataz enzimi ile işaretlenmiş goat-antihuman IgM antikorları ile serum örneklerinin 50C'de 10 dakika inkübasyonu ve test striplerinin karışıma daldırılması suretiyle uygulanan, 2 saat gibi kısa bir sürede sonuç veren, pozitif reaksiyonların kurutulmuş stripler üzerinde oluşan mavi bantlar ile okunduğu IgM dot-ELISA dipstick (IgM-dipstick, Integrated Diagnostics, Baltimore, Md.) (16); akut enfeksiyon olgularında düşük sensitivite göstermeleri nedeniyle kullanımlarının sınırlı olabileceği bildirilen INDX Leptospira-Dip-S-Tick (PanBio InDx, Inc., Baltimore, Md.), Biolisa IgM ELISA (Bios GmbH, Labordiagnostik), Leptospira-IgM ELISA (PanBio Pty Ltd., Brisbane, Australia) ve SERION-ELISA classic Leptospira (Institut

Virion•Serion GmbH, Würzburg, Germany) test sistemleridir (8).

Mikropleyt çukurları içindeki nitroselüloz filtre diskleri üzerine yerleştirilmiş (dotted) polivalan leptospira antijenleri ile uygulanan ve daha az miktarda reagent kullanım olanağı sağlayan, serumda IgM, IgG ve IgA antikorları saptayan dot-ELISA bu alandaki son gelişmelerdendir (25).

LEPTO dipstick assay

Yeni ve hızlı bir metottur. Yüksek reaktiviteye sahip leptospiral antijenlerin emdirildiği nitroselüloz şeritler ile uygulanmaktadır. Anti-leptospiral IgM antikorlar yönünden pozitif serum örneği ile test uygulandığında, boyalı anti-IgM konjugat antijen-antikor kompleksine bağlanmakta ve şerit üzerinde gözle görülebilen bantlar oluşmaktadır (30). LEPTO dipstick çok merkezli uluslar arası bir çalışmada, 5 kıtadaki 12 ayrı ülkede leptospirozisli hastalardan temin edilen serum örnekleri ile denemiş, sensitivitesinin %86 (Puerto Rico) ile %35 (Seychelles), spesifitesinin ise %99 (Hindistan) ile %88 (Yeni Zelanda) arasında değişen değerlerde bulunduğu (30); hızlı sonuç vermesi, spesifik ekipmanlara ihtiyaç duyulmaması, reagentlerin stabilitesinin yüksek olması ve oda ısısında saklanabilmeleri nedeniyle oldukça kullanışlı bir test olduğu rapor edilmiştir (11, 12, 30). LEPTO dipstick test kiti, Organon-Teknika, Ltd., Amsterdam, the Netherlands ürünü olarak temin edilebilmektedir.

Latex aglutinasyon testi (Lepto dri dot)

Hayvan ve insan serum örneklerinde leptospiral antikorları tespit edebilen yeni ve hızlı bir metottur. Üzerinde yüksek reaktiviteye sahip leptospira antijenleri ile aktive edilmiş renkli latex partiküllerini içeren aglutinasyon kartları ile uygulanmaktadır. Kart üzerinde dairesel olarak dağıtılan serum örneğinin granüler aglutinasyon göstermesi

- (2002). *Evaluation of eight rapid screening tests for acute leptospirosis in Hawaii*. J Clin Microbiol, 40, 1464-1469.
- 9- EFFLER PV, DOMEN HY, BRAGG SL, AYE T, SASAKI DM (2000). *Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis in Hawaii*. J Clin Microbiol, 38, 1081-1084.
- 10- FAINE S, ADLER B, BOLIN C, PEROLAT P (1999). *Leptospira and Leptospirosis*, 2nd edition, MediSci, Melbourne, Australia.
- 11- GUSSENHOVEN GC, VAN DER HOORN MA, GORIS MG, TERPSTRA WJ, HARTSKEERL RA, MOL BW, VAN INGEN CW, SMITS HL (1997). *LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of Leptospira-specific immunoglobulin M antibodies in human sera*. J Clin Microbiol, 35, 92-97.
- 12- HARTSKEERL RA, SMITS HL, KORVER H, GORIS MGA, TERPSTRA WJ (2002). *Handbook of International Course on Laboratory Methods for the Diagnosis of Leptospirosis*, Royal Tropical Institute, Amsterdam, The Netherlands.
- 13- KOCABIYIK AL, CETIN C (2003). *Detection of Leptospira interrogans serovar hardjo antibodies by the microscopic agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in cattle sera*. Indian Vet J, 80, 969-971.
- 14- KRAMER KJ, PANG LW, MINETTE HP, PERRONE JB (1994). *Evaluation of the quantitative buffy coat analysis (QBC) system for the detection of Leptospira in human blood*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 25, 788-789.
- 15- LEVETT PN (2001). *Leptospirosis*. Clin Microbiol Rev, 14, 296-326.
- 16- LEVETT PN, BRANCH SL, WHITTINGTON CU, EDWARDS CN, PAXTON H (2001). *Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis*. Clin Diagn Lab Immunol, 8, 349-351.
- 17- LEVETT PN, WHITTINGTON CU (1998). *Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis*. J Clin Microbiol, 36, 11-14.
- 18- MATTHIAS MA (2000). *Molecular characterization of pathogenic Leptospira from animals on the island of Barbados*, Ph.D. thesis, University of West Indies, Barbados.
- 19- MERIEN F, BARANTON G, PEROLAT P (1995). *Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis*. J Infect Dis, 172, 281-285.
- 20- MYERS DM (1987). *Serodiagnosis of human leptospirosis by counterimmunoelectrophoresis*. J Clin Microbiol, 25, 897-899.
- 21- PLANK R, DEAN D (2000). *Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of Leptospira spp. in humans*. Microbes Infect, 2, 1265-1276.
- 22- RAMADASS P, SAMUEL B, NACHIMUTHU K (1999). *A rapid latex agglutination test for detection of leptospiral antibodies*. Vet Microbiol, 70, 137-140.
- 23- ROMERO EC, BILLERBECK AEC, LANDO VS, CAMARGO ED, SOUZA CC, YASUDA PH (1998). *Detection of Leptospira DNA in patients with aseptic meningitis by PCR*. J Clin Microbiol, 36, 1453-1455.
- 24- SEHGAL SC, VIIAVACHARI P, SUBRAMANIAM V (1997). *Evaluation of leptospira micro capsule agglutination test (MCAT) for serodiagnosis of leptospirosis*. Indian J Med Res, 106, 504-507.
- 25- SILVA MV, NAKAMURA PM, CAMARGO ED, BATISTA L, VAZ AJ, ROMERO

- EC, BRANDAO AP (1997). *Immunodiagnosis of human leptospirosis by dot-ELISA for the detection of IgM, IgG, and IgA antibodies*. Am J Trop Med Hyg, 19, 485-492.
- 26- SILVA MV, CAMARGO ED, BATISTA L, VAZ AJ, FERREIRA AW, BARBOSA P.R.S (1996). *Application of anti-leptospira ELISA-IgM for the etiologic elucidation of meningitis*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 38, 153-156.
- 27- SMITH CR, KETTERER PJ, MCGOWAN MR, CORNEY BG (1994). *A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of Leptospira interrogans serovar hardjo infection in cattle*. Aust Vet J, 71, 290-294.
- 28- SMITS HL, CHEE HD, EAPEN CK, KURIAKOSE M, SUGATHAN S, GASEM MH, YERSIN C, SAKASI D, LAI-A-FAT RF, HARTSKEERL RA, LIE-SDEK B, ABDOEL TH, GORIS MG, GUSSENHOVEN GC (2001). *Latex based, rapid and easy assay for human leptospirosis in a single test format*. Trop Med Int Health, 6, 114-118.
- 29- SMITS HL, VAN DER HOORN MA, GORIS MG, GUSSENHOVEN GC, YERSIN C, SASAKI DM, TERPSTRA WJ, HARTSKEERL WJ (2000). *Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis*. J Clin Microbiol, 38, 1272-1275.
- 30- SMITS HL, ANANYINA YV, CHERESHKY A, DANCEL L, LAI-A-FAT RF, CHEE HD, LEVETT PN, MASUZAWA T, YANAGIHARA Y, MUTHUSETHPATHI MA, SANDERS EJ, SASAKI DM, DOMEN H, YERSIN C, AYE T, BRAGG SL, GUSSENHOVEN GC, GORIS MG, TERPSTRA WJ, HARTSKEERL RA (1999). *International multicenter evaluation of the clinical utility of a dipstick assay for detection of Leptospira-specific immunoglobulin M antibodies in human serum specimens*. J Clin Microbiol, 37, 2904-2909.
- 31- TAYLOR MJ, ELLIS WA, MONTGOMERY JM, YAN KT, MCDOWELL SW, MACKIE DP (1997). *Magnetic immunocapture PCR assay (MIPA): detection of Leptospira borgpetersenii serovar hardjo*. Vet Microbiol, 56, 135-145.
- 32- WAGENAAR J, ZUERNER RL, ALT D, BOLIN CA (2000). *Comparison of polymerase chain reaction assays with bacteriologic culture, immunofluorescence, and nucleic acid hybridization for detection of Leptospira borgpetersenii serovar hardjo in urine of cattle*. Am J Vet Res, 61, 316-320.
- 33- WOO THS, PATEL BKC, SMYTHE LD, NORRIS MA, SYMONDS ML, DOHNT MF (1998). *Identification of pathogenic Leptospira by TaqMan probe in a lightcycler*. Anal Biochem, 256, 132-134.
- 34- WOODWARD MJ, SWALLOW C, KITCHING A, DALLEY C, SAYERS AR (1997). *Leptospira hardjo serodiagnosis: a comparison of MAT, ELISA and immunocomb*. Vet Rec, 141, 603-604.
- 35- YAN KT, ELLIS WA, MONTGOMERY JM, TAYLOR MJ, MACKIE DP, MCDOWELL SW (1998). *Development of an immunomagnetic antigen capture system for detecting leptospire in bovine urine*. Res Vet Sci, 64, 119-124.