



Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för Kliniska Vetenskaper

Är gnagare reservoar för patogena leptospiraarter i Sverige?

Erik Gammelgård

Uppsala

2009

Examensarbete inom veterinärprogrammet

ISSN 1652-8697

Examensarbete 2010:50

SLU
Sveriges Lantbruksuniversitet

Är gnagare reservoar för patogena leptospiraarter i Sverige?

Erik Gammelgård

*Handledare: Claes Fellström, Institutionen för Kliniska vetenskaper
Biträdande handledare: Annette Backhans, Institutionen för Kliniska vetenskaper*

Examinator: Bernt Jones

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2009
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska Vetenskaper
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp*

Nyckelord: gnagare, Leptospira, leptospiros, gris

Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>

ISSN 1652-8697

Examensarbete 2010:50

Innehåll

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	2
INLEDNING	3
SYFTE.....	3
TAXONOMI	3
LEPTOSPIROS	4
FÖREKOMST AV PATOGENA LEPTOSPIRAARTER HOS GNAGARE.....	4
PATOGENES	5
SJUKDOM PÅ GRIS.....	6
<i>Historia</i>	7
<i>Nuvarande situation</i>	8
SJUKDOM PÅ MÄNNISKA	9
DIAGNOSTIK	10
ODLING.....	10
SEROLOGI	10
<i>Mikroskopiskt agglutinations test, MAT</i>	10
<i>Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA</i>	10
POLYMERAS CHAIN REACTION.....	11
MATERIAL OCH METODER	12
GNAGARMATERIAL	12
DNA EXTRAKTION.....	12
PCR.....	13
<i>Lig PCR</i>	13
<i>Adia PCR</i>	13
SEKVENSERING.....	14
RESULTAT	14
LIG PCR.....	14
ADIA PCR	14
SEKVENSERING.....	15
DISKUSSION	16
SLUTSATS.....	18
LITTERATURFÖRTECKNING	19

SAMMANFATTNING

Syftet med examensarbetet var att ta reda på om svenska gnagare, brunråtta (*Rattus norvegicus*), husmus (*Mus musculus*), skogsmus (*Apodemus spp*) och vattensork (*Arvicola terrestris*), fångade i grisbesättningar och i stadsmiljö, utgör en reservoar för patogena leptospiraarter. Under svenska förhållanden ger leptospiros upphov till reproduktionsstörningar på gris och influensaliknande symptom på människa. Det är sedan tidigare konstaterat att gnagare är kroniska smittbärare av patogena leptospiraarter i sina njurar och kan på så sätt sprida bakterien vidare med sin urin. Den gamla uppdelningen där leptospiraarterna delades in i serovarer används fortfarande, dock har ett nytt system som bygger på genetisk likhet tagits fram och idag består bakteriens genus av 17 arter. Det finns fler olika diagnostiska test utvecklade för att detektera leptospiros och leptospiraarterna. Serologi och odling används idag i Sverige av Smittskyddsinstitutet och Statens veterinärmedicinska anstalt. Under de senaste årtiondena har den molekylära metoden Polymerase Chain Reaction (PCR) utvecklats. I den här undersökningen valdes PCR som metod för att detektera leptospiraarter, för första gången i Sverige. Problemet var att de PCR-system som finns tillgängliga inte kan skilja mellan olika patogena arter åt då generna som kopieras inte skiljer sig mellan arterna. Två konventionella PCR-system, Lig PCR och Adia PCR, utvecklade för att detektera patogena leptospiraarter i bland annat njurvävnad användes. Materialet var 116 njurar från svenska gnagare som under ett doktorandprojekt fångats in på 11 platser, mellan åren 2005 till 2007. Adia PCR kunde detektera 15 prover som potentiellt var patogena leptospiraarter. PCR-produkterna skickades för sekvensering till SVA. Vid sekvensering kunde nio av de 15 DNA-fragmenten konstateras tillhöra patogena leptospiraarter. DNA-sekvenserna var mest lika *Leptospira borgpetersenii*, *L. weili* och *L. interrogans* serovar copenhageni. I övriga DNA-fragment, fanns sekvenser som kodade för en del av den nionde muskromosomen. Lig PCR fungerade inte tillfredställande och inga prover skickades in till SVA för sekvensering. Slutsatsen var att Adia PCR kunde detektera patogena leptospiraarter i njurvävnad på gnagare och att svenska gnagare utgör en reservoar för patogena leptospiraarter.

SUMMARY

The aim of the project was to investigate if Swedish rodents, brown rat (*Rattus norvegicus*), house mouse (*Mus musculus*), wood mouse (*Apodemus* spp) and water vole (*Arvicola terrestris*) captured in pig herds and in urban areas, constitute a reservoir for pathogenic *Leptospira* spp. Under Swedish conditions leptospirosis gives rise to reproductive disorders in pigs and symptoms of flu in humans. It has long been established that rodents are chronic carriers of pathogenic leptospires in their kidneys, and can spread the bacteria with urine. The old nomenclature of serovars is still in use, but a new system of genetic classification has developed and today the genus *Leptospira* contains 17 species. There are several diagnostic tests developed for leptospirosis. Serology and culture are used today in Sweden by Swedish Institute for Infectious Disease Control and Swedish National Veterinary Institute. Over the last decade the molecular method Polymerase Chain Reaction (PCR) has been developed. PCR was chosen as the method to detect leptospires, for the first time in Sweden. The problem was that the PCR-system available could not separate between pathogenic species. Two conventional PCR-systems, Lig PCR and Adia PCR, developed to detect pathogenic *Leptospira* spp. in kidney tissue were used. The material were 116 kidneys from Swedish rodents that were captured in 11 places, between the years 2005 to 2007, during an ongoing PhD projekt. Adia PCR detected 15 samples that most likely were pathogenic leptospires. PCR-products were sent for sequencing to Swedish National Veterinary Institute. Sequencing of PCR-products confirmed that nine of the 15 DNA sequences belonged to potentially pathogenic *Leptospira* spp. The DNA sequences were most similar to *L. borgpetersenii*, *L. weili* and *L. interrogans* serovar copenhageni. Among remaining PCR-products a part of the ninth house mouse chromosome was identified. Lig PCR did not work satisfactorily, and no samples were sent in to Swedish National Veterinary Institute for DNA sequencing. It was concluded that Adia PCR could detect pathogenic leptospires in kidney tissue of rodents and the Swedish rodents constitute a reservoir for pathogenic *Leptospira* spp.

INLEDNING

Det här examensarbetet är en del i ett större projekt där gnagare undersöks för mikroorganismer som kan orsaka sjukdom hos andra mammalier. Leptospiraarter kan orsaka sjukdomen leptospiros på gris och människa. På människa har sjukdomen i vissa delar av världen varit känd i över 1000 år. Leptospiros beskrevs för första gången på människa i en vetenskaplig artikel under 1800-talets andra hälft (Weil, 1886). Den gramnegativa bakterien *Leptospira* spp. hittades i början av 1900-talet. Sedermera blev gnagare såsom råttor och husmöss kända som reservoarer för patogena leptospiraarter. Leptospiros eller Weil's disease anses vara världens mest spridda zoonos, med flest fall av klinisk sjukdom observerade i tropiska länder (Turner, 1969; Planck & Dean, 2000; Levett, 2001).

Syfte

Syftet med examensarbetet var att ta reda på om svenska gnagare utgör en reservoar för patogena leptospiraarter, med risk för smittspridning till gris och människa. För första gången i Sverige användes en molekylär metod, polymerase chain reaction (PCR), för att detektera patogena leptospiraarter i njurvävnad.

TAXONOMI

Leptospiraarterna tillhör huvudutvecklingslinjen (fylum) Spirocheates, familjen heter *Leptospiraceae* och innehåller tre genus; *Leptospira*, *Turneria* och *Leptonema* (Planck & Dean, 2000). De olika leptospiraarterna har klassiskt delats in efter hur de reagerar serologiskt. Beroende på hur antigenerna agglutineras i patientens serum delas bakterien in i serovarer (Levett, 2001). Traditionsmässigt har serovareorna delats in i serogrupper, och i dessa grupper finns serovarer med likartade antigener och liknande agglutinationsmönster.

Fram till 1982 utgjorde varje serovar en egen art exempelvis *Leptospira pomona*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* och *Leptospira bratislava* (Alder och Faine, 2006). Det fanns då cirka tvåhundra arter. För att göra nomenklaturen lättare att förstå gjordes systemet om till att omfatta bara två arter. Patogena serovarer hamnade i arten *Leptospira interrogans* och saprofytiska serovarer hamnade i arten *Leptospira biflexa*. Serovarepitetet sattes då sist, till exempel *L. interrogans* serovar bratislava (Levett, 2001; Adler & Faine, 2006).

Under slutet av 1980-talet började forskargrupper intressera sig för en molekylär klassifikation av leptospiraarter (Levett, 2001; Bharti et al., 2003). Den molekylära bestämningen gjordes med hjälp av DNA-DNA hybridisering. Om hög grad av hybridisering sker mellan två DNA strängar betyder det att nukleotiderna är komplementära till varandra och tillhör samma art (Slack et al., 2006).

De aktuella rönen som bygger på släktskap genom likhet på gennivå har resulterat i uppdaterad nomenklatur med namngivning av nya arter (Brenner et al., 1999). Den nya uppdelningen leder till viss förvirring i nomenklaturen då den gamla med

endast två arter, *L. interrogans* och *L. biflexa* fortfarande används. För att undvika sammanblandning används termen *sensu stricto*, som betyder ”på det smala sättet” och syftar på den nya nomenklaturen med fler än två arter (Levett, 2001). Till nya patogena arter brukar *L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri*, *L. weilii* och *L. alexanderi* räknas. Till saprofytiska arterna som hittas i vatten hör *L. wolbachii*, *L. biflexa* och *L. meyeri*. *L. fainei*, *L. inadai* och *L. broomi* brukar räknas som patogena eller saprofyter och sätts i en tredje grupp med intermediära arter (Adler & Faine, 2006; Slack et al., 2006). Idag finns 17 olika arter definierade, av vilka fyra saknar namn (Tabell 1) (Brenner et al., 1999; Slack et al., 2006).

Tabell 1. Genus *Leptospira* sensu stricto (efter Adler & Faine, 2006; Slack et al., 2006)

Patogena	Intermediär	Saprofyter
<i>L. alexanderi</i>	<i>L. fainei</i>	<i>L. biflexa</i>
<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. inadai</i>	<i>L. meyeri</i>
<i>L. interrogans</i>	<i>L. broomi</i>	<i>L. wolbachii</i>
<i>L. kirschneri</i>		Ej namngiven art 3
<i>L. noguchii</i>		Ej namngiven art 4
<i>L. santarosa</i>		Ej namngiven art 5
<i>L. weilii</i>		
		Ej namngiven art 1

Att en leptospiraart kategoriseras som patogen behöver inte betyda att alla serovarer inom den arten är patogen. En serovar kan tillhöra mer än en art (Levett, 2001; Adler & Faine, 2006). Ett exempel på det är där de två antigen liknande subtyperna av serovar hardjo, hardjobovis och hardjoprajitno är placerade i *L. borgpetersenii*, respektive *L. interrogans* (Tabell 2) (Adler & Faine, 2006).

Tabell 2. Exempel på serovarer som tillhör mer än en art av *Leptospira* (Efter Brenner et al., 1999)

Art	Serogrupp	Serovar
<i>L. interrogans</i>	Sejroe	hardjo
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	hardjo

Den genomiska nomenklaturen av leptospiraarter är i sin linda. Det är ett aktuellt ämne som är i ständig förändring.

LEPTOSPIROS

Förekomst av patogena leptospiraarter hos gnagare

Det är sedan tidigare känt att gnagare sprider patogena leptospiraarter genom sin urin (Levett, 2001). Ett flertal undersökningar har gjorts i Skandinavien för att leta efter leptospiraarter på gnagare. Läkaren Olin undersökte svenska gnagare på

1930-talet för att se om de bar på bakterien, vilket de befanns göra (Olin, 1934). På 1940-talet gjorde Statens bakteriologiska laboratorium en studie där de konstaterade att 52 % av undersökta gnagare, 160 stycken från södra och mellersta Sverige, utsöndrade spirocheter med urinen. Ett samband sågs mellan förekomst av råttor som bar på leptospiraarter och sjukdom hos människa (Malmgren, 1941). I en undersökning från Finland under 1960-talet (Rislakki & Vasenius, 1970) var 50 % av finska smågnagarna bärare av leptospiraarter.

En dansk studie på 1970-talet undersökte vilka serovarer som förekom hos danska brunråttor (*Rattus norvegicus*), vattensorkar (*Arvicola terrestris*), skogsmöss (*Apodemus spp*) och husmöss (*Mus musculus*). De kom fram till att *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae var vanlig på brunråttor och att *L. interrogans* sejroe och serogrupp ballum var vanlig på husmöss. Skogsmössen bar på *L. interrogans* serovar pomona medan inga leptospiraarter kunde hittas hos undersökta vattensorkar (Fennestad & Borg-Petersen, 1972).

Flera studier har utförts för att leta efter vilka serovarer husmöss kan härbärgera. Undersökningarna har utförts i Brasilien, Barbados och Nya Zeeland. Studierna visade att serogrupperna ballum och autumnalis förekommer hos husmöss (Brockie, 1977; Matthias & Levett, 2002; Rossetti, 2004). Serogruppen autumnalis finns hos flera patogena leptospiraarter medan serogruppen ballum ingår i den patogena arten *L. borgpeterseenii* (Brenner et al., 1999). Utanför Norden har brunråttor visat sig bära på *L. interrogans* (Brockie, 1977; Sunbul et al., 2001) *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae (Perra et al., 2002) och *L. interrogans* serovar bratislava (Webster, 1995). Aktuella publikationer över vilka serovarer som finns i gnagarpopulationen i Sverige har inte kunnat hittas.

Patogener

Infektion med leptospiraarter på gris och människa kan ske genom direktkontakt med urin eller indirekt genom urinkontaminerat vatten (Fig 1).

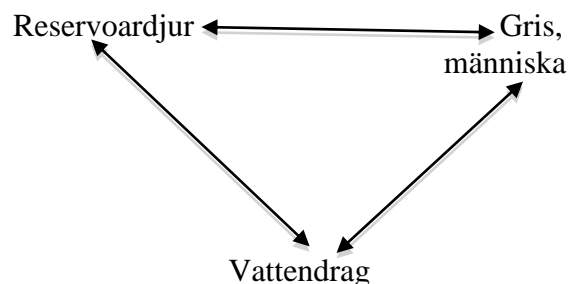


Fig 1. Smittvägar leptospiros

Bakterien kan ta sig in i kroppen genom sår eller intakt hud och slemhinnor såsom konjunktivan och munnen. Väl inne i kroppen ger bakterien upphov till sepsis. I de små blodkärlen skadas endotelet, vilket kan leda till ischemi i njurar och lever (Levett, 2001). Vaskuliten blir diffus i hela kroppen och vid obduktion kan generella blödningar ses (Planck & Dean, 2000). Hur de patogena leptospiraarterna orsakar vaskuliten i kroppen är inte fullt utrett (Levett 2001). Sjukdomsförloppet vid leptospiros kan dels förklaras av bakteriens patogenicitet och dels av individens immunförsvar (Bharti et al., 2003), bland annat bildas

cirkulerande immunkomplex som kan ge sekundära skador på organ (Galli et al., 1985). En typ av autoantikropp, anticardiolipin, har setts bildats på människor med svår sjukdom orsakad av leptospiros. Antikroppen ger bland annat upphov till endotelskador (Rugman, 1991). Patogena leptospiraarter ger aborter genom att infektera fostren i den dräktiga livmodern på suggan. Aborterna ses tio dagar till fyra veckor efter att fostret blivit infekterat (Taylor, 2006).

Vid infektion bildas specifika antikroppar efter en vecka och när dessa når blodbanorna försvinner bakterien från blodet. Vid det här laget kan gulsot uppstå, framförallt på grund av påverkan på levercellerna och inte på grund av ökad nedbrytning av erythrocyter (Plank & Dean, 2000; Taylor, 2006). Patogena leptospiraarter kan hos kroniska bärare exempelvis gnagare uppehålla sig i proximala njurtubuli. Det kan bakterien göra för att antikropparna som finns i njurtubuli inte kan binda in till bakterien, troligen på grund av brist på komplement. Utsöndringen med urinen sker kontinuerlig eller intermittent (Adler & Faine, 2006). Leptospiraarterna producerar en mängd olika substanser som påverkar deras virulens (Levett, 2001).

Som en gramnegativ bakterie innehåller cellväggen lipopolysackarid (LPS). Detta endotoxin frisätts när bakterien dör och kan orsaka allvarliga skador hos den infekterade individen. Det har konstaterats att leptospiraarternas endotoxin är mindre potent än andra gramnegativa bakterier exempelvis *Escherichia coli* (Isogai et al., 1986; Werts et al., 2001). LPS är mycket immunogent och betyder mycket för den infekterade individens immunitetsutveckling mot leptospiraarterna (Chapman et al., 1988). Antikroppar kan binda till bakteriens LPS och underlätta fagocyttering av makrofager (Farrelly et al., 1987). I makrofagerna kan leptospiraarterna inducera apoptos, vilket underlättar för bakterien att sprida sig i kroppen (Merien et al., 1996).

Det finns flera undersökta membranproteiner beskrivna så kallade outer membrane proteins (OMP) (Levett, 2001). LipL32 är ett OMP och kallas också *hap1*, vilket endast produceras *in vivo* vid infektion. Hur skador från detta lipoprotein uppkommer är okänt (Haake et al., 2000). År 2002 upptäcktes att leptospiragenen *ligA* kodar för ett protein som endast uttrycks *in vivo*. Proteinet sitter i cellmembranet och används för att adherera till celler (Palaniappan et al., 2002). Två år senare hittades *ligB* genen, som skilde sig något i nukleotiduppsättning från *ligA* genen. *LigB* genen uttrycker ett protein som produceras *in vivo* och påverkar adhesionen till den smittade individens celler (Palaniappan et al., 2003). Ett annat protein, fibronektin, befanns också medverka till celladhesion vid infektion (Merien et al., 2000).

Leptospiraarter har proteiner som kallas för hemolysiner (cytolysiner). Hemolysin SphH kan skada cellmembranet på både erythrocyter och epitelceller och kallas därför också cytolysin. Cellväggen blir förstörd och vattenbalansen inne i cellen kan inte upprätthållas (Lee et al., 2002).

Sjukdom på gris

Grisar kan infekteras genom horisontell och vertikal smitta. Leptospiros hos gris kan orsakas av flera olika serovarer av bakterien. I serogrupperna Australis,

Autumnalis, Pomona, Canicola, Tarassovi, Icterohaemorrhagiae och Sejroe finns serovarer som drabbar gris (Tabell 3) (Taylor, 2006).

Tabell 3. Serogrupper och serovarer aktuella på gris (Efter Taylor, 2006)

Serogrupp	Serovar
Australis	bratislava
Pomona	pomona
Canicola	canicola
Tarassovi	tarassovi
Icterohaemorrhagiae	icterohaemorrhagiae
Sejroe	sejroe, hardjo

Infektion med leptospiror hos gris kan yttra sig på olika sätt. Det kan vara ett akut insjuknande med hög feber, inappetens och ikterus liksom reproduktionsstörningar med aborter. Grisar kan även vara infekterade utan att visa symtom (Taylor, 2006). *Leptospira interrogans* serovar bratislava är bland de vanligaste fynden på gris utomlands (Chappel et al., 1992). Vid en serologisk screening på gris i Sverige har antikroppar mot serovar bratislava, icteroheamorrhagiae och sejroe hittas (Boqvist, pers. medd, 2009). *Leptospira interrogans* serovar bratislava bidrar till reproduktionsproblem. Den orsakar reproduktionsstörningar med abort, dödfödselar och omlöp (Bolin et al., 1991; Mousing et al., 1995; Swedberg & Eliasson-Selling, 2006). *Leptospira interrogans* serovar pomona kan orsaka svår sjukdom med ikterus (Burnstein & Baker, 1954) hos gris, men även reproduktionsstörningar såsom abort. *L. interrogans* serovar sejroe kan ge hög feber, depression och inappetens och *Leptospira interrogans* serovar icteroheamorrhagiae kan orsaka en mängd olika symtom (Fennestad & Borg-Petersen, 1966).

Historia

Det dröjde nästan 50 år efter att Weil skrev sin artikel om leptospiror på människa, innan det konstaterades att även husdjur kunde bli sjuka av bakterier från genus *Leptospira*. Efter andra världskriget började dåvarande SVA (då Statliga Veterinär Institutet) göra regelbundna serologiska tester för leptospiror hos svenska husdjur (von Wendt, 1956). Under åren 1946-49 undersöktes 28 blodprover från gris och endast ett av proverna var positivt för leptospiraarter.

Det fanns muntliga uppgifter om klinisk sjukdom hos gris orsakad av leptospiraarter från två veterinärer på fältet. Von Wendt har skrivit om dessa fall i sin artikel efter personliga meddelande från de två veterinärerna Brag och Ehlers. Veterinär Brag var i ett svinstall där unga grisar var akut sjuka med hög feber och ikterus. Blodprover från grisarna togs vid två tillfällen. Antikroppstitern vid första tillfället var 1:600, och den hade stigit vid andra tillfället till 1:3 200. Detta visade att leptospiraarter kunde vara orsaken till sjukdom. Vid patologianatomisk undersökning hittades leptospiraarter i njurarna hos smågrisarna. Veterinär Ehlers var på en annan svingård, där flera unga grisar hade dött efter att ha visat liknande symtom. Histopatologi från njurvävnad togs och även här konstaterades

leptospiraarter. Vilka serovarer som orsakade sjukdomarna klarades inte, då ingen serologisk diagnostik fanns tillgänglig (von Wendt, 1956).

Under 1950-talet undersöktes 1000 grisar vid slakt med serologiska metoder för att se om det förekom antikroppar mot leptospiraarter. Av de analyserade proverna hade 4,6 % en antikroppstiter över 1:400, vilket klassades som positivt (von Wendt, 1956).

I Sverige utfördes en serologisk screening på gris under 1980-talet (Sandstedt & Engvall, 1985). Blodprover från 116 grisar undersöktes för antikroppar mot *L. interrogans* serovar bratislava. Proverna kom från södra och mellersta Sverige. En antikroppstiter över 1:300 räknades som positivt prov, vilket 20 % av grisarna hade. Under 1990-talet gjordes en serologisk studie av Swedberg och Eliasson-Selling. De studerade en avelsbesättning med reproduktionsstörningar och letade efter antikroppar mot *L. interrogans* serovar bratislava. Vid analys av 39 blodprov från avelsbesättningen hade 34 % en antikroppstiter över 1:100 (Swedberg & Eliasson-Selling, 2006).

På fyra grisgårdar i Danmark rapporterades det om en ökad förekomst av aborter, döda och mumifierade foster under slutet av 1990-talet. Undersökning av grisarna gjordes genom serologi och flertalet av suggorna befanns ha antikroppar mot flera leptospiraserovarer; pomona, tarassovi och bratislava. Samtliga av dessa gårdar hade suggorna på djupströbädd. Vid granskning av djupströbäddarna hittades möss av icke namngiven art. Immunofluorescens för påvisande av leptospiraarter gjordes på grisplacentor, vilka var kraftigt fluorescerande (Friis et al., 2000).

Nuvarande situation

I Sverige har inte beskrivits några fall där leptospiraarterna orsakat allvarliga sjukdomsutbrott med hög dödlighet. Från 1990-talet och framåt har grisar från hela landet (Figur 2.) undersökts serologiskt på Statens veterinärmedicinska anstalt med avseende på antikroppar mot *L. interrogans* serovar pomona. Varje år undersöks cirka 3000 blodprover, framför allt från tamgrisar samt ett hundratal prover från vildsvin. Inget prov har visats vara positivt för antikroppar mot serovar pomona (Bergström, pers.medd, 2009).

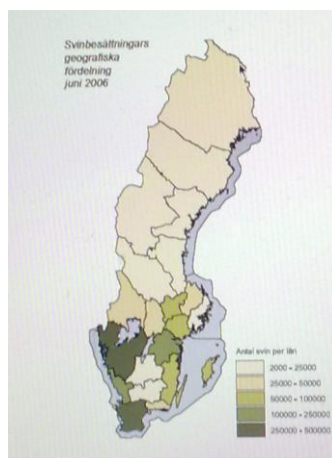


Fig 2. Grispopulation i Sverige (Efter SVA: Regeringsuppdrag sjukdomsrapportering 2006)

Sjukdom på människa

Svenska forskares intresse för leptospiros på människa kom i början på 1920-talet. En läkare vid namn Olin fick möjligheten att åka till Paris och studera Weils sjukdom. Vid studier av tidigare litteratur i Sverige, fanns enstaka fall som liknade Weils sjukdom på människa beskrivna (Olin, 1934).

I en artikel från 1936, "Om Weils sjukdom och dess förekomst i Sverige", beskrev Malmgren fall av leptospiros hos människa. Under perioden 1923 till 1935 rapporterades 22 patientfall av vilka sju avled till följd av leptospiros. Riskyrkesgrupper var slakteriarbetare och lantbrukare som jobbade med grisar.

Människor blir oftast infekterade av serovarer från serogruppen *Icterohaemorrhagiae* (Levett, 2001; Adler & Faine 2006). Inkubationstiden är oftast mellan fem till tio dagar. Först fås en leptospiremi i sju till åtta dagar och därefter kommer en fas med leptospiruri och det stadiet kan pågå i månader (Turner, 1969) till år (Adler & Faine, 2006).

En stor majoritet av leptospirosfallen hos människa är subkliniska (Levett, 2001). I 90 % av sjukdomsfallen behövs inte någon behandling med antibiotika utan sjukdomen självläker (Planck och Dean, 2000). En del infektioner med leptospiroarter ger en klinisk sjukdom med symtom som feber, huvudvärk, magsmärtor och hudutslag. När immunförsvaret bildar antikroppar försvinner symtomen vid mild sjukdom (Levett, 2001). Symtombilden kan vara mycket lik den vid influensasjukdom (Adler & Faine, 2006). Den allvarligare formen av sjukdomen på människa brukar kallas ikerisk leptospiros. Symtomen härrör då från sviktande organ som lunga, lever och njure (Levett, 2001).

Utbrott av leptospiros är beskrivet på människa i Europa där de sjuka smittats genom leptospirainfekterat vatten. I Frankrike insjuknade fem människor som alla hade badat i en kanal. Efter epidemiologiska studier kunde det konstateras att råttpopulationen ökat markant i området runt vattnet innan människorna blev sjuka och fick kliniska symtom (Perra et al., 2002). Ett liknande utbrott skedde på Irland 2004 och drabbade kanotister som utsatts för av gnagare urinkontaminerat vatten (O'Meara, 2004). Tjeckien har haft problem med översvämningar och i samband med detta skedde det en ökning av antalet sjukdomsfall (Stanwell-Smith, 1998).

Enligt svenska smittskyddsinstitutets hemsida över antalet fall av leptospiros hade det mellan åren 2004-2008 konstaterats ett fall av inhemsk infektion, i Östergötland år 2008. Smittan ansågs komma från infekterade råttor. År 2008 fanns totalt sex fall av leptospiros registrerat, där tre människor fått sjukdomen utomlands. På de två övriga sjukdomsfallen fanns det inga uppgifter hur de blivit infekterade. Utomlands fick en till tre svenskar per år leptospiros under perioden 2004-2008.

Sjukdomen finns över hela jorden men är vanligare i tropiska klimat. Det kan bero på att det är svårare att hålla en god hygien i ett varmare klimat (Levett, 2001). I tropiska klimat ligger många utvecklingsländer och där sker det en snabb urban tillväxt, vilket innebär större smittorisker. Naturkatastrofer som översvämning är vanligare och i vatten trivs leptospiroarterna (Plank & Dean, 2000). Enligt världshälsoorganisationen WHO hemsida beräknas att det är 0,1-1 per 100 000

innevånare och år som får leptospiros i tempererade klimat. I tropiska länder beräknas att det är 10-100 per 100 000 innevånare och år som blir sjuka. Människor som riskerar infektion jobbar nära djur och vatten, inom jordbruk, veterinärer, anställda inom livsmedelsindustrin, militärer och klokarbetare (Turner, 1969).

DIAGNOSTIK

Diagnostik av leptospiros är svår då det saknas känsliga och lättillgängliga metoder (Michel et al., 2008). Olika diagnostiska metoder har utvecklats under tiden bakterien varit känd. En optimalt test ska ha precision och exakthet. För att veta att ett test ger en korrekt mätning används termerna sensitivitet och specificitet. Om sensitivitet är hög ökar risken för många falska positiva. Testet är bra på att hitta infekterade och då ökar risken att även friska individer får ett positivt testresultat. Om specificiteten är hög ökar risken för många falska negativa. Testet är bra på att hitta friska individer och då ökar risken att även infekterade får ett negativt testresultat (Engel, 2006).

Odling

Leptospiraarterna är svåra att odla och helst ska de få växa till i flytande medium. Eftersom bakterien är långsamväxande ställs det stora krav på steriliteten vid inokulering för att inga kontaminationsbakterier ska få möjlighet att växa till. Provmaterial som kan användas till odling är exempelvis blod och urin (Levett, 2001). Bakterien kan behöva odlas i tre till fyra veckor för att kunna verifiera diagnos, men ibland krävs även längre odlingstid (Adler & Faine, 2006).

Serologi

Mikroskopiskt agglutinations test, MAT

Det har utvecklats en mängd olika serologiska metoder för att påvisa leptospiraarter. Den metod som har använts under lång tid och anses vara ”golden standard” är Mikroskopiskt agglutinations test (MAT). Serum från patienten blandas med antigener från kända serovarer och agglutinerings observeras (Levett, 2001). Om inte rätt antigener finns med i testet kan resultatet bli falskt negativt. Då det förekommer olika serovarer i olika geografiska områden kan MAT vara svår att standardisera (Plank och Dean, 2000). Det gäller därför att ha en aning om vilka serovarer som kan tänkas förekomma där provet är taget. För att använda MAT krävs tillgång till många serovar-antigener (Kee, 1993). På världshälsoorganisationens hemsida finns rekommendationer för 17 serovarer som bör vara med vid test på människa. Nackdelar med MAT kan vara att den inte går att använda akut för att påvisa leptospiros då antikroppar tar en vecka att bilda (Kee et al., 1993; Levett, 2001). Parprover är i det flesta fall ett måste för att påvisa ett pågående utbrott av leptospiros, vilket ytterligare fördröjer diagnos (Levett et al., 1998).

Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) är en annan metod som utnyttjar antigen-antikropps reaktioner. Ett antigen sätts på en yta, och serum som ska testas droppas på. Om antikroppar finns fäster de in till antigenet. Därefter

droppas antiantikroppar med fluorescerande ämne på antigen-antikroppskomplexet. När antiantikropparna fäster in skapas ett fluorescerande ljus och testet tolkas som positivt. Fördelar med metoden kan vara att den är känsligare än MAT för att upptäcka IgM antikroppar och hittar då infekterade individer tidigare i sjukdomsförloppet. Det finns flera olika ELISA som har utvecklats för att upptäcka patogena leptospiraarter. Enligt svenska Smittskyddsinstitutet hemsida använder de en ELISA metod för att upptäcka sjuka individer.

Polymerase chain reaction

Flera olika polymerase chain reaction (PCR) baserade metoder har utvecklats de senaste 20 åren för att påvisa leptospiraarter. Metoderna går ut på att upptäcka specifika DNA-sekvenser. Metoden gör det möjligt att hitta mycket små mängder av DNA. Vid PCR skiljs DNA molekylens två strängar åt genom upphettning (denaturering). Syntetiskt tillverkade primers fäster in på DNA-sekvenserna och bestämmer vilken DNA bit som ska kopieras. För att kopiera DNA-sekvenserna krävs kvävebaser, enzymet DNA polymeras och temperaturskillnader. Detta leder till att den DNA-sekvens som ska hittas förökas upp i mycket stor mängd. Det finns olika typer av PCR-metoder utvecklade. Konventionell PCR tar relativt lång tid. Det tar ungefär två till tre timmar för att uppföröka en DNA-sekvens i en PCR maskin. Därefter måste DNA produkterna köras i en gelelektrofores för att sedan visualiseras i UV-ljus. Realtids PCR är en nyare metod. Speciellt med denna variant av PCR är att den går snabbare och ingen agarosgel-elektrofores eller att visualisera bilden i UV ljus behövs. Metoden kräver dock apparatur som är dyrare än vid en konventionell PCR (Slack et al., 2006).

De första PCR-metoderna som kunde upptäcka leptospiraarter skilde inte mellan de patogena och de icke patogena. Nyutvecklade PCR system kan urskilja de patogena leptospiraarterna (Smythe et al., 2002; Branger et al., 2004; Palaniappan et al., 2005; Slack et al., 2006; Fearnley et al., 2007).

Samtliga PCR metoder har fokuserat på en DNA-region som bara finns hos patogena leptospiraarter. Problemet har varit att det inte går att skilja patogena arter åt. DNA-sekvenserna som används har varit för välbevarade, det vill säga att till stor del har alla patogena leptospiraarter lika DNA-sekvenser. PCR används på kliniska prover (WHO, 2003), men inte i Sverige enligt Smittskyddsinstitutets hemsida.

Slack et al. (2006) hittade en gen, *gyrB* som kan ha potential att skilja mellan patogena leptospiraarter. De har utvecklat en realtids PCR för påvisande av *gyrB* genen. Felet med denna metod kan vara att de potentiellt patogena arterna i den intermediära gruppen inte upptäcks.

Fearnley et al. (2007) har utvecklat en realtids PCR som detekterade en konserverad region av 16S rRNA-genen, som bara de patogena leptospiraarter har. Smythe et al. (2002) utvecklade en realtids PCR analys med ett primerpar som band in till 16S rRNA-genen för patogena leptospiraarter. Främsta målet med Smythes realtids PCR var att analysmetoden skulle gå snabbt. Det tog ungefär fem timmar att få fram ett resultat. En fördel var att det går att köra PCR-metoden direkt på serum eller urin (Smythe et al., 2002).

Palaniappian et al. (2005) utvecklade en konventionell PCR. De tillverkade primers, Lig1/Lig2, till väl bibehållna DNA-sekvenser som kodar för leptospiral immunoglobulin-like (*Lig*) proteiner. Generna som kopieras kallas för *ligA* och *ligB*.

Branger et al. (2004) utvecklade en konventionell PCR-metod där de kopierade en gensekvens för ett lipoprotein, hemolysis-associated protein-1 (*hap1*) också kallad LipL32. En Realtids PCR har också utvecklats för denna DNA-sekvens av Levett (Levett, 2005). Primerparet Adia 214® och Adia 215® valdes ut efter studier av *hap1* genens nukleotidsekvenser. Analys av frysta prover gav falskt negativa resultat.

MATERIAL OCH METODER

Gnagarmaterial

Till denna studie undersöktes njurar från 116 svenska gnagare. De flesta djuren kom från lokaler i Uppland (B, C, D, H) men även Stockholm (I), Halland (K) och Västmanland (J) var representerade (Tabell 4).

Tabell 4. Provtagna djur

Lokal	Platstyp	Antal av varje art				
		Brunråtta	Husmus	Skogsmus	Större skogsmus	Vattensork
A	Stadsmiljö	6	-	-	-	1
B	Smågrisbesättning	-	22	-	1	-
C	Integrerad grisbesättning	-	7	-	4	-
D	Slaktsvinsbesättning	10	2	-	-	-
E	Nötstall	-	3	-	-	-
F	Lantgård	5	1	-	-	-
G	Kvarn	6	-	-	-	-
H	Integrerad grisbesättning	11	4	-	-	-
I	Slaktsvinsbesättning	-	20	-	-	-
J	Integrerad grisbesättning	-	9	2	-	-
K	Smågrisbesättning	-	2	-	-	-

DNA extraktion

De märkta provrören togs upp ur -70 °C frysen för tining. När njurvävnaden tinat togs >25 µg av njurarna och lades i ett nytt märkt eppendorfrör. Njurvävnaden

krossades med hjälp av en steril blå ögla. Extrahering av DNA ur den krossade njurvävnaden utfördes med DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN Group, 2006) enligt tillverkarens instruktioner. Proverna späddes sedan 1:10 genom att 5 µl provlösning blandades med 45 µl Milli-Q vatten, för att minska koncentrationen av inhibitoriska substanser som sannolikt följt med från njurvävnaden vid extrahering. Samtliga spädningar sparades och frystes ner i -20 °C.

Ett litet antal prover testades slumpvis med en DNA picometer som mätte koncentrationen av DNA. Det konstaterades att tillräckligt med DNA fanns för att analysera proverna med hjälp av PCR.

PCR

Två konventionella PCR-system som kunde upptäcka patogena leptospiraarter användes.

Lig PCR

Ett PCR-system beskrivet av Palaniappan et al. (2005) användes. Primerparet Lig1/Lig2 fäster specifikt in till en gen som kodar för en patogenicitet hos leptospiraarterna (Tabell 5).

Tabell 5. Primerpar använda i Lig PCR (Efter Palaniappan et al., 2005)

Primer	Primer sekvenser
Lig 1	5'-TCA ATC AAAACA AGG GGC T-3'
Lig 2	5'-ACT TGC ATT GGA AAT TGA GAG-3'

Reaktionsmixen med en total volym av 25 µl innehållande 0,2 mM dNTP, 3 mM MgCl₂, 0,68 µM primer och 1,25 enheter Taq DNA polymeras, blandades med 1 µl av DNA. PCR programmet bestod av en initial denaturering vid 95 °C i 5 min och följdes av 35 cykler uppförökning. En cykel bestod av denaturering vid 95 °C i 30 sekunder, annealing (här fäster primer in till DNA strängarna) vid 48 °C i 45 sekunder och förlängning vid 72 °C i 30 sekunder. När de 35 cyklerna var klara följdes de av en ytterligare förlängning vid 72 °C i 7 minuter (Palaniappan et al., 2005). PCR- produkterna kördes i en agarosgelelektrofores på en 1,5 % agarosgel med ethidium bromide. Som storleksmarkör användes en 100 baspars stege, som sattes i en av gelbrunnarna. Positiv kontroll utgjordes av koklysat på *L. interrogans* serovar icterohemorrhagiae och *L. interrogans* serovar canicola. Negativ kontroll bestod av *Leptonema illinei*, *L. biflexa* och MilliQ vatten och sattes med cirka 10 provers mellanrum. Efter körning av produkterna i agarosgelelektrofores visualiserades de med UV-ljus.

Adia PCR

Denna PCR amplifierar *hap1* genen som kodar för en annan patogenicitetsfaktor hos leptospiraarterna (Tabell 6) (Branger et al., 2004).

Tabell 6. Primerpar använda i Adia PCR (Efter Branger et al., 2004)

Primer	Primer sekvenser
Adia214®	5'-GCA AGC ATT ACC GCT TGT GG-3'
Adia215®	5'-TGT TGG GGA AAT CAT ACG AAC-3'

Reaktionsmixen blandades till en total volym på 25 µl innehållande 0,2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 µM primer (Adia214® och Adia215®) och 1,0 enheter Taq DNA polymerase, och sist tillsattes 2 µl av DNA (Radaelli et al., 2009). PCR programmet bestod av en initial denaturering vid 94 °C i 2 min, därefter 45 cykler uppförökning. En cykel bestod av denaturering vid 94 °C i 20 sekunder, annealing vid 56 °C i 40 sekunder och förlängning vid 72 °C i 30 sekunder. När de 35 cyklerna var klara följdes de av ett ytterligare förlängningssteg vid 72 °C i 7 minuter (Branger et al., 2004). Gelelektrofores utfördes som ovan.

Sekvensering

DNA rening av PCR produkterna gjordes med ett kommersiellt kit, QIAquick® PCR Purification Kit (50) (QIAGEN). De positiva PCR produkterna från Adia PCR sekvenserades på SVA från bägge ändarna. Sekvenserna bearbetades med CLC Main Workbench 5 och därefter jämfördes dessa mot övriga deponerade sekvenser i BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov/blast>).

RESULTAT

Lig PCR

De positiva och negativa kontrollerna fungerade under körningarna. Metoden gav inte några DNA produkter från våra prover. Enstaka prover blev positiva under de första körningarna men det gick inte att reproducera i senare körningar. Efter körning på agarogelen sågs många ospecifika band.

Adia PCR

15 prover gav en positiv reaktion när Adia PCR användes (Tabell 7). På gelen hade banden den förväntade storleken på 262 baspar. Positiva och negativa kontrollerna fungerade bra. I en körning blev den ena positiva kontrollen negativ.

Tabell 7. Prover positiva i Adia PCR

Identitet	Art	Lokal	Platstyp
AB34	Vattensork	A	Stadsmiljö
AB44	Brunrått	A	Stadsmiljö
AB55	Skogsmus	J	Grisbesättning, integrerad
AB75	Husmus	B	Grisbesättning, smågris
AB87	Husmus	B	Grisbesättning, smågris
AB94	Husmus	B	Grisbesättning, smågris
AB98	Husmus	B	Grisbesättning, smågris
AB100	Husmus	B	Grisbesättning, smågris
AB109	Husmus	B	Grisbesättning, smågris
AB113	Husmus	I	Grisbesättning, slaktsvin
AB122	Husmus	I	Grisbesättning, slaktsvin
AB123	Husmus	I	Grisbesättning, slaktsvin
AB124	Husmus	I	Grisbesättning, slaktsvin
AB137	Husmus	C	Grisbesättning, integrerad
AB138	Större skogsmus	C	Grisbesättning, integrerad

Sekvensering

Efter sekvensering kunde nio DNA-sekvenser konstateras tillhöra leptospiraarter (Tabell 8).

Tabell 8. *Leptospira*: Resultat av sekvenseringen

Identitet	Art	Lokal	Lokaltyp	Resultat
AB34	Vattensork	A	Stadsmiljö	100 % <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. weili</i>
AB44	Brunrått	A	Stadsmiljö	98 % <i>L. borgpetersenii</i>
AB75	Husmus	B	Grisbesättning, smågris	100 % <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. weili</i>
AB87	Husmus	B	Grisbesättning, smågris	96 % <i>L. borgpetersenii</i>
AB94	Husmus	B	Grisbesättning, smågris	100 % <i>L. interrogans</i> serovar copenhageni
AB98	Husmus	B	Grisbesättning, smågris	98 % <i>L. interrogans</i> serovar copenhageni
AB100	Husmus	B	Grisbesättning, smågris	100 % <i>L. interrogans</i> serovar copenhageni
AB137	Husmus	C	Grisbesättning, integrerad	99 % <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. weili</i>
AB138	Större skogsmus	C	Grisbesättning, integrerad	99 % <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. weili</i>

Sekvensen AB 55 gick inte att analysera då den innehöll blandade sekvenser. Två av sekvenserna från husmöss AB109 och AB124 kunde konstateras tillhöra den

nionde muskromosomen. Tre övriga prover från husmöss AB113, AB122 och AB123 hade blandade sekvenser som till stor del tillhörde den nionde muskromosomen.

DISKUSSION

För första gången har patogena leptospiraarter detekterats med PCR i Sverige. De positiva fynden kom från två olika grisbesättningar samt från en råtta och en vattensork infångade i stadsmiljö.

I de prover där bakterien hittades fanns störst likhet i DNA-sekvensen med de patogena arterna *L. weili*, *L. borgpetersenii* och *L. interrogans* serovar copenhageni. DNA-sekvenserna för *L. weili* och *L. borgpetersenii* är så lika i sin nukleotidföljd i *hap1* genen att de inte går att säga vilken av dessa två vi hittat. Möss infångade i två olika grisbesättningar bar på *L. interrogans* serovar copenhageni, *L. borgpetersenii* och *L. weili*. *Leptospira interrogans* serovar copenhageni har vad författaren vet inte hittats på husmöss i tidigare undersökningar i Skandinavien. Serovaren copenhageni ingår i serogruppen Icterohemorrhagiae (Brenner et al., 1999) som kan infektera både gris och människa. Fler undersökningar borde göras på dessa gårdar, till exempel se om suggorna har reproduktionsproblem och om de har suggor som har reagerat positivt serologiskt i så fall analysera vilka serovarer de har antikroppar mot. Det skulle vara intressant att ta reda på om grisar och gnagare på gårdarna bär på samma serovarer.

Att svenska gnagare bär på bakterien har konstaterats i flera äldre undersökningar (Olin, 1934; Malmgren, 1941). En vattensork och en brunråtta infångade i stadsmiljö bar på *L. weili* eller *L. borgpetersenii*. I en tidigare undersökning i Skandinavien har inte leptospiraarter hittats hos vattensorkar (Fennestad & Borg-Petersen, 1972). Vattensorkar har blivit vanligare i Sverige de senaste tio åren och orsakar skador för jordbruksnäringen (Jansson, 2009). Det vore intressant att fånga fler gnagare i stadsmiljö och analysera dem för förekomst av leptospiraarter. Blodprov från människor kunde samlas in och testas serologiskt för att se om de bar på antikroppar mot samma serovarer som gnagare härbärgerar. Undersökningar av gnagare fångade i stadsmiljö skulle kunna visa om det finns risk för människor att bli smittade. Frågan som måste ställas är om leptospiros är ett växande problem i Sverige. Smittskyddsinstitutet har inte sett en ökning av leptospiros hos människa under de senaste 10 åren. År 2008 registrerades emellertid ett större antal fall än föregående år. Ökningen av antalet inhemska fall var dock försumbar.

I Sverige har vad författaren vet, aldrig tidigare PCR använts för att påvisa leptospiraarter. De metoder som har används av SMI och SVA är odling och serologiska metoder och då framför allt ELISA och Mikroskopiskt agglutinations test (MAT).

Fördelen med PCR är att det är en enkel metod (Palaniappian et al., 2005). Utrustningen för att köra PCR finns redan på laboratorierna. Material till PCR såsom primerpar och reaktionslösningar är enkla att beställa. Eftersom PCR på

leptospiror aldrig tidigare körts i Sverige finns det inget laboratorium som idag har en PCR uppsatt för denna diagnostik.

I den här undersökningen föll valet på en konventionell PCR-metod. PCR-metoden som skulle användas måste vara väl beprövad, kunna upptäcka intressanta patogena serovarer i Sverige och helst kunna skilja på de olika patogena arterna. Det sista kriteriet fick strykas då det inte finns någon sådan metod beskriven. Utifrån dessa förutsättningar hittades i litteraturen två lämpliga konventionella PCR-metoder, Lig PCR (Palaniappan et al., 2005) och Adia PCR (Branger et al., 2004). Båda metoderna användes för att kunna jämföra resultaten och för att de citerats mest av de tillgängliga konventionella metoderna och för att de hade använts på njurvävnad.

Ett problem var att våra prover hade varit frysta i -70 °C och båda valda PCR-metoderna hade använts på färskt provmaterial. Branger et al. (2004) konstaterade att fryst urin inte fungerade lika bra som färsk urin. Vävnader som njure innehåller inhibitoriska substanser (Branger et al., 2004), det är därför viktigt att använda en metod där DNA:t kan renas fram utan de inhibitoriska substanserna. Genom spädning av provlösningarna kan inhibitoriska substanser koncentration minskas, men samtidigt blir mängden DNA mindre.

PCR-systemet beskrivet av Palaniappan et al. (2005) Lig PCR fungerade inte tillfredställande i vår studie. Under samtliga körningar blev kontrollerna positiva, emellertid gav inte de prov som var positiva i Adia PCR några band vid gelelektroforesen. Lig PCR-metodens första körningar gjordes i juni 2009, och nästa PCR kördes i oktober. Tiden mellan körningarna kan kanske spela en roll. Proverna har utsatts för frysning och upptining och Lig PCR kan vara känsligare än Adia PCR vad gäller frysning. När Lig PCR metoden testades användes inga frysta prover (Palaniappan et al., 2005) och bevisligen kan det påverka (Branger et al., 2004). De positiva kontrollerna blev positiva vid samtliga körningar med Lig PCR. Möjligtvis kan Lig PCR vara känsligare för inhiberande substanser och primerparet kan då inte lika lätt binda in till DNA-sekvensen. De ospecifika små band som bildades i Lig PCR vid gelelektroforesen kan ha bildats av för låg annealings- och förlängningstemperatur och för kort annealings- och förlängningstid. Primers kan ha fäst in ospecifikt på olika ställen på DNA där de inte passade optimalt (Henegariu, 2009).

Branger et al. (2004) Adia PCR har fungerade bra under samtliga körningar. Vid sekvensering av DNA produkterna visade det sig att fem av proverna utgjordes av en något kortare DNA-sekvens som visade sig tillhöra den nionde muskromosomen. Eftersom den nionde muskromosomens DNA-sekvens var på 240 baspar och DNA-sekvensen från de patogena leptospiraarterna var på 262 baspar var de svåra att skilja åt vid gelelektroforesen. Proverna skulle ha vandrat under en längre tid i gelen vilket hade gjort det lättare att skilja de två DNA-produkterna åt storleksmässigt. Primerparet adia214 och adia 215 fäste ospecifikt, det vill säga de passade inte exakt på muskromosomen. DNA-sekvensen från muskromosomen kan ha kopierats på grund av för låg annealing- och förlängningstemperatur och för kort annealing- och förlängningstid. Reaktionsmixen kan ha innehållit för hög koncentration av primerpar, provlösning och Taq polymeras (Henegariu, 2009). Adia PCR kan behöva modifieras innan ytterligare användning på den här typen av prover, framförallt från mus

Liknande utbrott av leptospiros som skett i danska grisbesättningar beskrivna av Friis (Friis et al., 2000) för ungefär 10 år sedan, kanske även kan hända i svenska grisbesättningar. Vid jämförelse med länder i tropiska klimat är leptospiros inte lika aktuell här i Sverige. Med vårt klimat och våra hygieniska faciliteter bör bakterien ha det svårt att framkalla sjukdom på människor och djur. Leptospiraarterna är bakterier som finns över hela jorden, men frågan som måste ställas är om sjukdom skulle bli vanligare i Sverige om klimatet blir varmare. Enligt statens offentliga utredningar (SOU 2007:60) finns det en något ökad risk för infektion med leptospiror hos människor vid ett varmare klimat.

Leptospiros är en ovanlig sjukdom hos våra husdjur i Sverige och antikroppar mot sjukdomsframkallande serovarer har aldrig hittats hos nötkreatur. Ett fåtal hästar har konstaterats ha antikroppar mot leptospiror under 2000-talet. Mellan åren 2001-2006 anmäldes cirka 20 fall av leptospirainfektion hos hundar, där 10 positiva prov hittades 2006. Enligt SVA: Regeringsuppdrag sjukdomsrapportering, 2006 finns det en risk att leptospiros på husdjur kan bli vanligare i framtiden.

Slutsats

Adia PCR fungerar för att detektera patogena leptospiror hos gnagare. Samtliga undersökta arter av gnagare i denna studie befanns bära på patogena leptospiraarter i sina njurar och skulle därför kunna sprida bakterien vidare till gris och människa.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Bergström, K. Statens Veterinärmedicinska Anstalt. Personligt meddelande, 2009.
- Bharti, A.R., Nally, J.E., Riccardi, J.N., Matthias, M.A., Diaz, M.M., Lovett, M.A., Levett, P.N., Gilman, R.H., Willig, M.R., Gotuzzo, E., Vinetz, J.M. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet. Infect. Dis.* 3, 757-771.
- Bolin, C.A., Cassells, J.A., Hill, H., Frantz, J.C. och Nielsen, J.N. 1991. Reproduction failure associated with *Leptospira interrogans* serovar bratislava infection in swine. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3, 152-154.
- Boqvist, S. Bakteriologi och livsmedelssäkerhet, Sveriges lantbruks universitet. Personligt meddelande, 2009.
- Branger, C., Blanchard, B., Fillonneau, C., Suard, I., Aviat, F., Chevallier, B., André-Fontaine, G. 2005. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiol. Lett.* 243, 437-445.
- Brenner, D.J., Kaufmann, A.F., Sulzer K.R., Steigerwalt, A.G., Rogers, F.C., Weyant, R.S. 1999. 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.* 49, 839-858.
- Brockie, R.E. Leptospiral infections of rodents in the North Island. 1977. *N Z Vet J.* 25, 89-96.
- Burnstein, T., Baker, J.A. Leptospirosis in Swine Caused by *Leptospira pomona*. 1954. *J. Infect. Dis.* 94, 53-64.
- Chapman, A.J., Adler, B., Faine, S. 1988. Antigens recognised by the human immune response to infection with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *J. Med. Microbiol.* 25, 269-278.
- Engel, M. 2006. Stödanteckningar till föreläsningar i Epidemiologi.
- Farrelly, H.E., Adler, B., Faine, S. 1987. Opsonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *J. Med. Microbiol.* 23, 1-7.
- Fearnley, C., Wakeley, P.R., Gallego-Beltran, J., Dalley, C., Williamson, S., Gaudie, C., Woodward, M.J. 2008. The development of a real-time PCR to detect pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue. *Res. Vet. Sci.* 85, 8-16.
- Fennestad, K.L., Borg-Petersen, C. 1966. Experimental Leptospirosis in Pregnant Sows. *J. Infect. Dis.* 116, 57-66.
- Fennestad, K.L., Borg-Petersen. 1972. Leptospirosis in Danish wild mammals. *J. Wildl. Dis.* 8, 343-351.
- Friis, N.F, Jorsal, S.E., Sorensen, V., Schirmer, A.L., Lindahl, J., Thorup, F. 2000. Enzootics of *Leptospira* Abortions in Danish Sow Herds Practising Loose Housing on Deep Straw Bedding. *Acta Vet. Scand.* 41, 387-290.
- Galli, M., Esposito, R., Crocchiolo, P., Chemotti, M., Gasparro, M., Dall'Aglio, P.P. 1985. Immune Complexes in Leptospirosis. *Infection.* 13, 3.
- Haake, D.A., Chao, G., Zuerner R.L., Barnett, J.K., Barnett, D., Mazel, M., Matsunaga, J., Levett, P.N., Bolin C.A. 2000. The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. *Infect. Immun.* 2276-2285.

- Statens veterinärmedicinska anstalt. 2006. Regeringsuppdrag sjukdomsrapportering. Uppsala.
- Henegariu, O. <http://www.med.yale.edu>. (online) ? Tillgänglig: <http://www.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/Trblesht.html>, 20091127.
- Isogai, E. Isogai, H., Kurebayashi, Y., Ito, N. 1986. Biological Activities of Leptospiral Lipopolysaccharide. Zentbl. Bakteriol. 261, 53-64.
- Jansson, R. <http://stud.epsilon.slu.se>. (online) 2009 Tillgänglig: http://stud.epsilon.slu.se/54/1/jansson_r_090602.pdf, 20091213.
- Kee, S.H., Kim, I.S., Choi, M.S., Chang, W.H. 1994. Detection of Leptospiral DNA by PCR. J. Clin. Microbiol. 1035-1039.
- Lee, S.H., Kim, S., Park, S.C., Kim, M.J. 2002. Cytotoxic Activities of *Leptospira interrogans* Hemolysin SphH as a poreforming Protein on Mammalian Cells. Infection and Immunity. 315-322.
- Levett, P.N. 2001. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 296-326.
- Levett, P.N., Morey, R.E., Galloway, R.L., Turner, D.E., Steigerwalt, A.G., Mayer, L.W. 2005. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. J. Med. Microbiol. 54, 45-49.
- Levett, P.N., Whittington, C.U. 1998. Evaluation of the indirect Hemagglutination Assay for Diagnosis of Acute Leptospirosis. J. Clin. Microbiol. 11-14.
- Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap och Statens veterinärmedicinska anstalt. 2009. Lantbrukets djur i en föränderlig miljö – utmaningar och kunskapsbehov. Uppsala.
- Malmgren, B. 1936. Om Weils sjukdom och dess förekomst i Sverige. Nord. Med. 379-386.
- Matthias, M.A., Levett, P.N. 2002. Leptospiral carriage by mice and mongooses on the island of Barbados. West Indian Med J. 51.
- Merien, F., Baranton, G., Perolat, P. 1997. Invasion of Vero Cells and Induction of Apoptosis in Macrophages by Pathogenic *Leptospira interrogans* Are Correlated with Virulence. Infect. Immun. 729-738.
- Merien, F., Truccolo, J., Baranton, G., Perolat, P. 2000. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. FEMS Microbiol. Lett. 185, 17-22.
- Mousing, J., Christensen, J., Haugegaard, J., Schirmer, A.L., Friis, N.F. 1994. A seroepidemiological survey of *Leptospira*-bratislava infections in Danish sow herds. Prev. Vet. Med. 23, 201-213.
- Nordström, G. 1941. Leptospirosis in Domestic Animals. Nord Med. 1583.
- O'Meara, M. <http://www.eurosurveillance.org> (online) 2004. Tillgänglig: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2592>, 20091221.
- Olin, G. 1934. Om Weils sjukdoms etiologi och epidemiologi med särskild hänsyn till svenska förhållande. Sv. Läkaresällskapets förhandlingar. 78-93.
- Palaniappan, R.U.M., Chang, Y.F., Chang, C.F., Pan, M.J., Yang, C.W., Harpending, P., McDonough, S.P., Dubovi, E., Divers, T., Qu, J., Roe, B. 2005. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. Mol. Cell. Probes. 19, 111-117.
- Palaniappan, R.U.M., Chang, Y.F., Hassan, F., McDonough, S.P., Pough, M., Barr, S.C., Simpson, K.W., Mohammed, H.O., Shin, S., McDonough, P., Zuerner, R.L., Qu, J.,

- Roe, B. 2004. Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. *J. Med. Microbiol.* 53, 975-984.
- Palaniappan, R.U.M., Chang, Y.F., Jusuf, S.S.D, Artiushin, S., Timoney, J.F., McDonough, S.P., Barr, S.C., Divers, T.J., Simpson, K.W, McDonough, P.L., Mohammed, H.O. 2002. Cloning and Molecular Characterization of an Immunogenic LigA Protein of *Leptospira interrogans*. *Infect. Immun.* 5924-5930.
- Perra A, Servas V, Terrier G, Postic D, Baranton G, André-Fontaine G, Vaillant V, Capek I. <http://www.eurosurveillance.org> (online) 2001. Tillgänglig: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=361>, 20091218.
- Plank, R., Dean, D. 2000. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes Infect.* 2, 1265-1276.
- Radaelli, E., Del Piero, F., Aresu, L., Sciarrone, F., Vicari, N., Mattiello, S., Tagliabue, S., Fabbi, M., Scanziani, E. 2009. Expression of major histocompatibility complex class II antigens in porcine leptospiral nephritis. *Vet. Pathol.* 46, 800-809.
- Rislakki, V., Vasenius, H. 1970. Further studies on leptospirosis in small rodents and shrews in Finland. *Acta. Vet. scand.* 11, 133-135.
- Rossetti, C.A., Vanasco, B.N., Pini, N., Carfagnini, J.C. 2004. Comparison of three diagnostic techniques for the detection of leptospires in the kidneys of wild house mice (*Mus musculus*). *Pesqui Vet Bras.* 24, 6-10.
- Rugman, F.P., Pinn, G., Palmer, M.F., Waite, M., Hay, C.R.M. 1991. Anticardiolipin antibodies in leptospirosis. *J. Clin. Pathol.* 44, 517-519.
- Sandstedt, K., Engvall, A. 1985. Serum antibodies to *Leptospira bratislava* in Swedish pigs and horses. *Nord Vet Med.* 37, 312-313.
- Slack, A.T., Symonds, M.L., Dohnt, M.F., Smythe, L.D. 2006. Identification of pathogenic leptospira species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol.* 6, 95.
- Smittskyddsinstitutet, SMI. www.smittskyddsinstitutet.se (online) ?. Tillgänglig: <http://www.smittskyddsinstitutet.se/statistik/leptospirainfektion/?base=domestic>, 20091117.
- Smythe, L.D, Smith. I.L., Smith, G.A., Dohnt, M.F., Symonds, M.L., Barnett, L.J., McKay, D.B. 2002. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect. Dis.* 2, 13.
- Stanwell-Smith R. <http://www.eurosurveillance.org> (online) 1998. Tillgänglig: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=1208>, 20091221.
- SOU 2007:60. Sverige inför klimatförändringarna – hot och möjligheter. Stockholm.
- Sunbul, M., Esen, S., Leblebicioglu, H., Hokelek, M., Pekbay, A., Eroglu., C. 2001. *Rattus norvegicus* acting as reservoir of *Leptospira interrogans* in the Middle Black Sea region of Turkey, as evidenced by PCR and presence of serum antibodies to *Leptospira* strain. *Scand. J. Infect. Dis.*
- Swedberg, C. Eliasson-Selling, L. 2006. *Leptospira interrogans* serovar bratislava hos gris – ett problem i Sverige? *Svensk Veterinär Tidning.* 1, 13-19.
- Taylor. D.J. 2006. *Pig Diseases* Eighth edition. 110-115. Suffolk: St Emundsby Press Ltd.
- Turner, L.H. Leptospirosis. 1969. *BMJ.* 1, 231-235.

- Webster, J.P., Ellis, W.A., MacDonald, D.W. 1995. Prevalence of *Leptospira* spp. in Wild Brown Rats (*Rattus norvegicus*) on UK Farms. *Epidemiol. Infect.* 114, 195-201.
- Weil, A. 1886. Ueber eine eigentümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende acute Infektionskrankheit. *Dtsche. Arch. Klin. Med.* 29, 209-232.
- Wendt von, J. 1956. Serological Examinations for Leptospirosis among Domestic Animals in Sweden. *Nord Vet Med.* 711-726.
- Werts, C., Tapping, R.I., Mathison, J.C., Chuang, T.H., Kravvchenko, V., Girons, I.S., Haake, D.A., Godowoski, P.J., Hayashi, F., Ozinsky, A., Underhill, D.M., Kirschning, C.J., Wagner, H., Aderem, A., Tobias, P.S., Ulevitch, R. 2001. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat. Immunol.* 2, 346-352.
- Världshälsoorganisationen, WHO. www.who.se (online) ?. Tillgänglig: http://www.who.int/csr/don/en/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf, 20091130