

# Serološko istraživanje leptospiroze u mačaka

---

**Muselin, Ema**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:672376>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-09**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

Ema Muselin

*Serološko istraživanje leptospiroze u mačaka*

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

*Ovaj rad izrađen je na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.*

**Predstojnik:** izv. prof. dr. sc. Vilim Starešina

**Mentorica:** izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš

**Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:**

1. Izv. prof. dr. sc. Zrinka Štritof
2. Doc. dr.sc. Matko Perharić
3. Izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš
4. Izv. prof. dr. sc. Suzana Hađina (zamjena)

## ZAHVALE

*Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Josipi Habuš na znastvenom i stručnom vodstvu, svim savjetima i izdvojenom vremenu tijekom izrade ovog rada kao i tijekom volontiranja na Klinici za zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.*

*Zahvaljujem dr.sc. Vesni Mojčec Perko i Maji Štrkalj na ljubaznom odnosu, strpljenju i pomoći tijekom izvođenja praktičnog dijela rada.*

*Zahvljujem svim djelatnicima Klinike za zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta na ugodnom radnom okruženju, a posebno volonterkama "Mlade nade zaraza" zbog kojih su dugi dani provedeni na klinici prolazili puno brže.*

*Veliko hvala mojoj obitelji na neizmornoj podršci tijekom svih godina studiranja i što su mi omogućili da se bavim onim što volim, kao i dečku Ivanu na ljubavi i razumijevanju.*

*I na kraju od srca hvala kolegama koji su prerasli u prave prijatelje i koji su bili uz mene tijekom najljepših, ali i najtežih trenutaka studiranja.*

## SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
2.	PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA.....	2
2.1.	Povijest.....	2
2.2.	Etiologija.....	3
2.3.	Epizootiologija.....	5
2.3.1.	Domaćini/rezervoari leptospiroze.....	7
2.3.2.	Leptospiroza - bolest prirodnog žarišta.....	11
2.4.	Patogeneza.....	12
2.5.	Klinička slika.....	13
2.6.	Dijagnostika.....	15
2.6.1.	Dokaz uzročnika.....	15
2.6.1.1.	Izravni dokaz.....	15
2.6.1.2.	Izdvajanje uzročnika na hranjivim podlogama.....	16
2.6.2.	Molekularne metode.....	16
2.6.3.	Dokaz protutijela.....	17
2.7.	Liječenje i preventiva.....	18

<b>3.</b>	<b>MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.</b>	<b>Serološka metoda mikroskopske aglutinacije .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.</b>	<b>Obrada podataka .....</b>	<b>24</b>
<b>4.</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>25</b>
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>31</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI .....</b>	<b>38</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>39</b>
<b>8.</b>	<b>SAŽETAK .....</b>	<b>49</b>
<b>9.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>50</b>
<b>10.</b>	<b>ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>51</b>

## POPIS KRATICA

ALP – (*eng. Alkaline phosphatase*) – alkalna fosfataza

ALT – (*eng. Alanine aminotransferase*) – alanin aminotransferaza

ASP – (*eng. Aspartate aminotransferase*) – aspartat aminotransferaza

BUN – (*eng. Blood urea nitrogen*) – ureja

CR – (*eng. Creatinine*) – kreatinin

DNK – (*eng. Deoxyribonucleic acid, DNA*) – deoksiribonukleinska kiselina

ELISA – (*eng. Enzyme-linked immunosorbent assay*) – imunoenzimni test

HCT – (*eng. Hematocrit*) – hematokrit

IgM – imunoglobulin M

IgG – imunoglobulin G

MAT – (*eng. Microscopic agglutination test*) – metoda mikroskopske aglutinacije

ND – nedeterminirano

PBS – (*eng. Phosphate buffered saline*) – fosfatni pufer

PCR – (*eng. Polymerase chain reaction*) – lančana reakcija polimerazom

PLT – (*eng. Platelets*) – trombociti

PU/PD – poliurija i polidipsija

RBC – (*eng. Red blood cells*) – eritrociti

SIRS – (*eng. Systemic inflammatory response syndrome*) – sindrom sistemskog upalnog odgovora

## POPIS SLIKA

<b>Slika 1.</b> Leptospira, slikana elektronskim mikroskopom .....	4
<b>Slika 2.</b> Epizootiologija leptospiroze. ....	6
<b>Slika 3.</b> Najčešće infektivne serološke skupine i njihovi rezervoari, evolucijski i slučajni domaćini .....	8
<b>Slika 4.</b> Pregled seroprevalencije leptospiroze i vjerojatno infektivnih serovara u mačaka u različitim geografskim područjima.....	10
<b>Slika 5.</b> Označene mikrotitracijske plitice s V dnom za izvođenje kvalitativnog i kvantitativnog dijela pretrage.....	22
<b>Slika 6.</b> Prikaz leptospira pod mikroskopom s tamnim vidnim poljem.....	23
<b>Slika 7.</b> Podjela mačaka uključenih u istraživanje s obzirom na rezultate MAT-a .....	25
<b>Slika 8.</b> Vjerojatno infektivna serološka skupina.....	27
<b>Slika 9.</b> Udio pozitivnih životinja unutar svake dobne kategorije.....	28
<b>Slika 10.</b> Usporedba učestalosti anemije, povišenja koncentracije ureje, kreatinina i jetrenih enzima te elektrolitnog disbalansa u skupini seropozitivnih i seronegativnih mačaka .....	29
<b>Slika 11.</b> Udio seropozitivnih i seronegativnih mačaka kod kojih su prisutni poliurija/polidipsija, proljevanje, povraćanje, proteinurija i hematurija.....	30
<b>Slika 12.</b> Udio seropozitivnih i seronegativnih mačaka kod kojih su prisutni letargija, anoreksija, hiper/hipotermija, respiratorni simptomi, promjene na koži i ascites.....	31



## POPIS TABLICA

<b>Tablica 1.</b> Dijagnostički panel br. 3 - panel antigena kojeg smo koristili u dijagnostici.....	21
<b>Tablica 2.</b> Prikaz pozitivnih rezultata i vjerojatno infektivnih seroloških skupina.....	26
<b>Tablica 3.</b> Podatci o mačkama s titrom $\geq 1:800$ .....	32

## 1. UVOD

Leptospiroza je zarazna bolest mnogih domaćih i divljih životinja te čovjeka uzrokovana patogenim bakterijama iz roda *Leptospira*. Prilikom istraživanja epizootiologije leptospiroze velika se pažnja posvećuje onim životinjskim vrstama koje se smatraju rezervoarima ili pak razvijaju lakše ili teže kliničke oblike bolesti. Istraživanje leptospiroze u mačaka pritom se nepravedno zapostavlja, uglavnom zbog činjenice što mačke izuzetno rijetko razvijaju kliničke znakove bolesti. Postoji svega nekoliko recentnih znanstvenih radova o leptospirozi mačaka koje potvrđuju mogućnost infekcije pa čak i produljenog izlučivanja (kliconoštva). Podatci o prevalenciji leptospiroze u mačaka, vjerojatno infektivnim serovarima te mogućim rizičnim čimbenicima povezanim uz infekciju u Republici Hrvatskoj, ali i globalno, relativno su oskudni. Naša pretpostavka je da seroprevalencija leptospiroze u mačaka unutar endemskih područja Republike Hrvatske nije zanemariva te da će vjerojatno biti na razini one utvrđene u pasa. Stoga je cilj našeg istraživanja bio pretražiti 84 arhivirana uzoraka seruma mačaka prikupljenih tijekom kliničke obrade pacijenata od 2018. do 2021. godine. Odabrani su oni serumi mačaka koje su po izjavi vlasnika barem dijelom boravile, odnosno izlazile van kuće, a svi prikupljeni serumi pretraženi su metodom mikroskopske aglutinacije (MAT). Temeljem dobivenih podataka utvrdili smo seroprevalenciju leptospiroze u mačaka iz Zagreba i okolice te odredili najučestalije vjerojatno infektivne skupine i ostale povezane rizične čimbenike.

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Povijest

Moderna povijest leptospiroze počinje 1886. godine kada je Adolf Weil opisao specifičnu žuticu kod ljudi praćenu povećanjem slezene i poremećajem rada bubrega (WEIL, 1886.). Iako je etiologija još uvijek bila nepoznata, sama infekcija je povezana s osobama koje provode vrijeme u prirodi i koje su bile u kontaktu s vodom. Bolest je tada nazvana Weilova bolest, a taj se naziv koristi još i danas kad se opisuju teži oblici bolesti u ljudi praćeni žuticom. Uzročnik ove bolesti je prvi put vizualiziran u tkivu i opisan 1907. kad je zbog svoje morfologije nazvan *Spirocheta interrogans* (STIMONS, 1907.). Leptospira je izdvojena po prvi put 1916. u Japanu. Krv radnika iz rudnika ugljena, koji su bolovali od Weilove bolesti, eksperimentalno je intraperitonealno injektirana zamorčiću. Klinička slika kod zamorčića uključivala je žuticu, konjunktivitis, gubitak apetita, anemiju, hematuriju i albuminuriju. Spirohete su pronađene u većini tkiva, a najveći broj zabilježen je u bubrezima i jetri. Zanimljivo je da eksperimentalno inficirani miševi i štakori nisu pokazivali znakove akutne infekcije bez obzira na količinu injektirane infektivne tvari te su opisani kao mogući rezervoari ove bolesti (INADA i sur., 1916.). Ista je grupa znanstvenika nekoliko mjeseci nakon ovog otkrića uspjela uzgojiti uzročnika leptospiroze in vitro, u mediju napravljenom od emulzije zamorčićeva bubrega te su odredili optimalnu temperaturu za rast ovih bakterija koja iznosi 27-35 °C. Ime *Leptospira* za ovaj rod bakterija predložen je 1918. godine kako bi se uzročnik, tada još zvane Weilove bolesti, razlikovao od drugih uzročnika slične morfologije (ADLER, 2015.).

Vrlo brzo nakon što se uzročnik leptospiroze izdvojio iz ljudi i štakora, htjelo se saznati više o prijemljivosti mačaka na infekciju i o ulozi mačke u širenju ove bolesti. Mačke, koje su 1918. godine eksperimentalno inficirane leptospirama iz serološke skupine Icterohaemorrhagiae, nisu uginule već su postale kliconoše (NOGUCHI, 1918.). Poslije tog saznanja zanimanje se znanstvenika za povezanost ove životinjske vrste i leptospiroze povećalo. U Indoneziji su prvi put izdvojene bakterije iz roda *Leptospira* iz mačke nakon prirodne infekcije (MERTEN, 1938.), dok su leptospire u Republici Hrvatskoj prvi put izdvojene iz bubrega mačaka nakon eksperimentalne infekcije 1974. godine (MODRIĆ, 1974.), a 1978. godine i iz prirodno inficiranih mačaka (MODRIĆ, 1978.).

## 2.2. Etiologija

Bakterije iz roda *Leptospira* su gram negativne, pokretne bakterije spiralnog oblika (Slika 1.) koje se u uobičajenom mediju kreću prosječnom brzinom od 10  $\mu\text{m/s}$  (FAINE i sur. 1999.). One su obligatni aerobi, čija optimalna temperatura rasta iznosi 28-30 °C (FAISAL i sur. 2012.).

Promjera su oko 0,1  $\mu\text{m}$  i dužine 6-20  $\mu\text{m}$ . Slabo se boje standardnim bojama pa se za njihovu vizualizaciju služimo mikroskopom s tamnim vidnim poljem (CVETNIĆ, 2008.). Patogene vrste roda *Leptospira* koje su tek izdvojene iz domaćina su u pravilu duže i zavijenije od onih koje su već prilagođene umjetnim hranjivim podlogama (ELLIS i sur., 1983.).

Za izdvajanje i umnažanje bakterija iz roda *Leptospira* koriste se različite tekuće i polutekuće hranjive podloge s dodatkom kunićjeg seruma (ELLINGHAUSEN i sur., 1965.). Najčešće se koriste EMJH (Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris) ili hranidbene podloge prema

Korthofu s 10 % kunićjeg seruma, a dodatak vitamina ili hemoglobina pospješuje njihov rast (CVETNIĆ, 2008.). Mogu se koristiti i hranidbene podloge prema Stuartu i Fletcheru.



**Slika 1.** Leptospira, slikana elektronskim mikroskopom

(Izvor: <https://www.sciencephoto.com/media/1148677/view>)

Taksonomski, rod *Leptospira* pripada porodici *Leptospiraceae* i redu *Spirochaetales* (FAINE i sur. 1999.). Rod dalje možemo klasificirati na temelju genomskih karakteristika molekularnim metodama ili na temelju antigenih karakteristika serološkim metodama (GRENEE, 2012.). Osnovni takson unutar genomskog klasifikacijskog sustava je genomski vrsta, dok je osnovni takson serološke klasifikacije serovar. Serovari su ovisno o svojoj srodnosti svrstani u 24 serološke skupine. Unakrižna reaktivnost (pa stoga i imunost) prisutna je samo unutar iste serološke skupine (ADLER i sur. 2010.).

Leptospire se ovisno o svojoj sposobnosti uzrokovanja infekcije dijele na saprofitne, intermedijarne i patogene. Saprofitne vrste, kao što je *Leptospira biflexa*, serovar Patoc, žive u vodi ili vlažnom tlu te ne inficiraju životinjskog domaćina. Za razliku od apatogenih leptospira, održavanje onih patogenih ovisi o njihovim rezervoarima. Pretpostavlja se da je izrazita heterogenost unutar roda *Leptospira* zapravo posljedica vremensko i prostorno uvjetovane prilagodbe leptospira na pojedine životinjske vrste. Mijenjajući svoje površinske lipopolisaharide (antigene) došlo je do izrazite serološke divergencije. Posljedično tome pojedine serovare u određenim geografskim područjima održavaju pojedine životinjske vrste (FAINE i sur. 1999; ADLER i sur. 2010.). Jednom izvan domaćina, patogene leptospire se ne umnažaju, ali mogu ostati infektivne i do nekoliko mjeseci ako se nalaze u optimalnom okolišu (alkalno vlažno tlo, odgovarajuća temperatura) (GRENEE, 2012.).

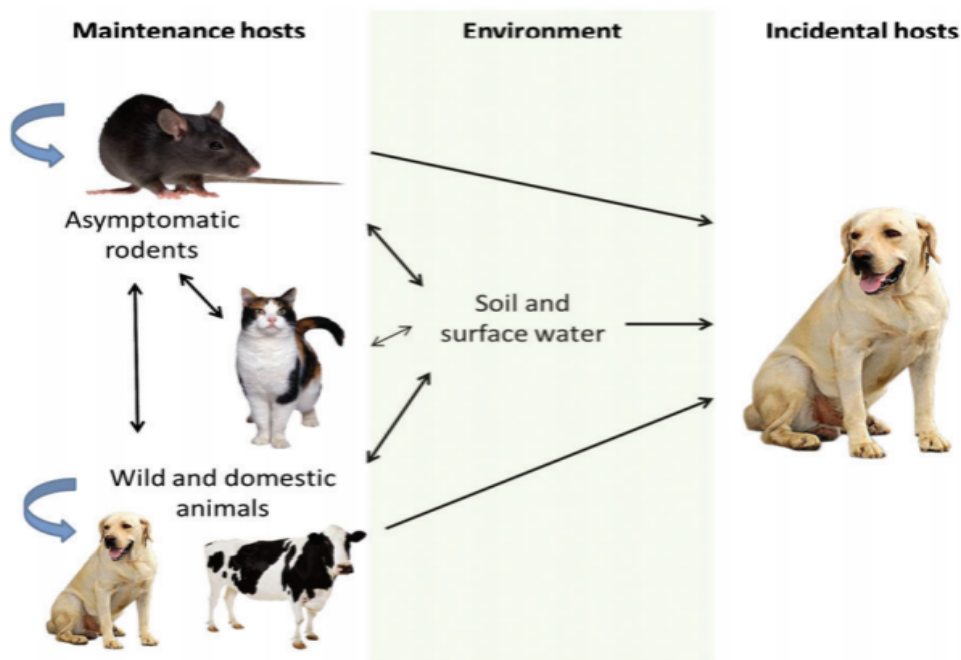
### **2.3. Epizootiologija**

Leptospiroza je geografski izrazito rasprostranjena, ali s najvišim incidencijama u tropskim i subtropskim područjima. U umjerenom klimatskom pojasu incidencija je najveća u nizinskim područjima, porječjima, odnosno područjima s alkalnim tlom i u vrijeme kasnog ljeta ili rane jeseni kada je tlo toplo i vlažno te ima puno površinskih voda (CVETNIĆ, 2008.).

Izvor zaraze su bolesne životinje i životinje kliconoše koje leptospire izlučuju urinom. Naime, patogene vrste *Leptospira* koloniziraju proksimalne bubrežne kanaliće domaćina nakon čega urinom izlaze u okoliš gdje u vodi ili vlažnom tlu mogu preživjeti i do nekoliko mjeseci (TRUEBA i sur., 2004.). Upravo se zbog toga između domaćina prenosi direktnim ili, puno

češće, indirektnim kontaktom s kontaminiranim okolišem (GREENE, 2012.). Ulazna vrata infekcije su sluznice i neoštećena, no vodom omekšana koža (Slika 2).

S obzirom na njihov očuvan nagon za lovom, pretpostavlja se da je infekcija u mačaka najčešće posljedica kontakta, žvakanja odnosno ingestije plijena - inficiranih mišolikih glodavaca (SYKES, 2014.), no do infekcije može doći i prilikom kontakta s urinom divljih i domaćih životinja (LARSSON i sur., 1985.), odnosno kontaminiranim okolišem. Upravo zbog te veće izloženosti i bližem kontaktu s rezervoarima smatramo da su vanjske mačke u značajno većem riziku od zaražavanja. (TALEBKHAN GAROUSSI i sur., 2015.; AZOCAR-AEDOL i sur, 2014.).



**Slika 2.** Epizootiologija leptospiroze (Izvor: SCHULLER i sur., 2015.).

### 2.3.1. Domaćini/rezervoari leptospiroze

Kao što je već spomenuto, održavanje patogenih leptospira ovisi o njihovim rezervoarima te pojedine serovare u određenim geografskim područjima održavaju različite životinjske vrste. Razlikujemo nekoliko vrsta domaćina/rezervoara. Pravim rezervoarima ove zarazne bolesti smatramo različite vrste glodavaca, koji nakon infekcije ne obolijevaju i ostaju doživotne kliconoše.

Evolucijski domaćini su pak životinjske vrste kod kojih prilagodba na određeni serovar još nije u potpunosti završila. U tih životinja infekcija s adaptiranim serovarom izaziva blagu kliničku sliku s dugotrajnim, ali ne i doživotnim kliconoštvom. Primjerice, govedo je evolucijski domaćin za serovar Hardjo-bovis, psi za serovar Canicola, svinje za serovar Pomona, itd. (Slika 3). Treba znati da takva poveznica između serovara i životinjskih vrsta (domaćina) nije apsolutna, a molekularni mehanizmi prilagodbe još su uvijek nepoznati (PICARDEAU, 2017.).

Slučajni domaćini su pak oni koji nisu dio uobičajenog ciklusa održavanja pojedinog serovara u određenom području, već su se slučajno uključili u epizootiološki/epidemiološki ciklus leptospiroze. U tim slučajevima često dolazi do očitovanja težih oblika bolesti, a ako takva životinja preboli infekciju ostaje relativno kratkotrajni kliconoša. Smatra se da se većina sisavaca, te poneki gmazovi i vodozemci, mogu inficirati bilo kojim patogenim serovarom leptospira (BISCOLA i sur.; 2011.; ROE i sur., 2010.).



Host Range for Some Isolates of Common Serogroups of <i>Leptospira</i> Infecting Animals						
Selected Serogroup	Known Primary Reservoir Hosts	Incidental Hosts			Other Domesticated Animals	Representative Wild Animals
		Dog	Cat	Human		
Bratislava	Rat, pig, horse?	+	-	+	Cow, horse	Mouse, raccoon, opossum, hedgehog, vole, fox, skunk, bandicoot, weasel, nutria
Autumnalis	Mouse	+	-	+	Cow	Rat, raccoon, opossum, bandicoot
Icterohaemorrhagiae	Rat	+	+	+	Cow, horse, pig, cavy <sup>a</sup>	Mouse, raccoon, opossum, hedgehog, fox, woodchuck, nutria, ape, skunk, civet, muskrat, mongoose
Pomona	Cow, pig, skunk, opossum	+	+	+	Horse, sheep, goat, rabbit, cavy <sup>a</sup>	Mouse, raccoon, hedgehog, wolf, fox, woodchuck, vole, sea lion, deer, civet
Canicola	Dog	+	+	+	Cow, horse, pig	Rat, raccoon, hedgehog, armadillo, mongoose, bandicoot, nutria, vole, jackal, skunk
Batavia	Dog, rat, mouse	+	+	+	Cow	Hedgehog, vole, armadillo, bandicoot, shrew, leopard cat
Hardjo	Cow	+	-	+	Pig, horse, sheep	Wild bovidae
Australis	Rat, mouse	+	-	+	Dog	Bandicoot
Zanoni	Rat, mouse	+	-	+	Cow, dog	Bandicoot
Grippotyphosa	Vole, raccoon, skunk, opossum	+	+	+	Cow, pig, sheep, goat, rabbit gerbil, cavy <sup>a</sup>	Mouse, rat, fox, bandicoot, squirrel, bobcat, shrew, hedgehog, muskrat, weasel, mole, leopard cat

**Slika 3.** Najčešće infektivne serološke skupine i njihovi rezervoari, evolucijski i slučajni domaćini (Izvor: GREENE, 2012.)

Pojavnost i učestalost vjerojatno infektivnih serovara na različitim geografskim područjima znatno se razlikuje (Slika 4.) (GREENE, 2012.). U velikom istraživanju provedenom u Južnoj Americi od 126 seruma, uzorkovanih od vanjskih mačaka, u njih 10 (8,1%) utvrđena je prisutnost specifičnih protutijela. Najčešći vjerojatno infektivni serovari bili su Autumnalis (30.0%), Canicola (20.0%), Bataviae (20.0%) i Grippotyphosa (10.0%) (AZOCAR-AEDO i sur., 2014.). U Teheranu, Iran, gdje je udio pozitivnih mačaka iznosio 27%, prevladavajući vjerojatno infektivni serovar u mačaka bio je serovar Canicola (94.7%), ali dokazana je i seroreaktivnost na serovar Pomona (5.3 %) (JAMSHIDI S. i sur., 2009.).

U Škotskoj od 9,2 % pozitivnih mačaka pet pozitivnih reakcija bilo je na serovar Hardjo, dvije na serovar Autumnalis i jedna na Icterohaemorrhagiae (AGUNLOYE, 1996.), dok primjerice u Estoniji prevalencija je iznosila 12,8%, a prevladavajući serovari bili su Pomona, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagie i Bratislava (LEHTLA, 2020.). Modrić i suradnici (2010.) istraživali su seroprevalenciju leptospiroze u mačaka na tri različite lokacije u Republici Hrvatskoj. Specifična protutijela ustanovljena su u krvnom serumu u različitom titru (od 1:100 do 1:8000) u 21,42% mačaka sa područja Zagreba, 28,09% mačaka iz Baranje i 30,41% mačaka iz seoskih područja istočne Slavonije. Razlikovala se i učestalost vjerojatno infektivnih serovara pa je tako u mačaka s područja Zagreba najčešći vjerojatno infektivni serovar bio serovar Icterohaemorrhagiae (10/24), u Baranji serovar Pomona (23/59), a u istočnoj Slavoniji serovar Bataviae (16/66). Navedeni rezultati ukazuju na relativno visoku prevalenciju leptospiroze kao i činjenicu da u različitim područjima Republike Hrvatske vjerojatno imamo različite izvore infekcije (MODRIĆ i sur., 2010.).

<b>Table 1</b> Prevalence data for leptospirosis in cats diagnosed by microscopic agglutination test					
Location	n	Positive serovar(s)	Negative serovar(s)	Prevalence (%)	Reference
Malaysia – Johor and Selangor	110	Ballum, Bataviae*, Copenhageni and Javanica	Australis, Autumnalis, Canicola, Celledoni, Cynopteri, Djasiman, Grippotyphosa, Hardjo, Hardjo-bovis, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Lai, Malaysia, Pomona, Pyrogenes and Tarassovi	18.1	9
Thailand – 13 locations	260	Anhoa, Autumnalis, Celledoni, Copenhageni, Djasiman, Icterohaemorrhagiae and Patoc*	Australis, Ballum, Bataviae, Bratislava, Broomi, Canicola, Coxi, Cynopteri, Grippotyphosa, Haemolytica, Khorat, Paidjan, Pomona, Pyrogenes, Rachmati, Saxkoebing and Sejroe	5.4	10
USA – Iowa	139	Bratislava*, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae and Pomona	Canicola	8.6	8
Germany – Munich	215	Australis*, Autumnalis, Bratislava, Copenhageni and Grippotyphosa	Canicola, Pomona and Saxkoebing	17.9	11
Caribbean island of St Kitts	50	Cynopteri and Pomona	Alexi, Australis, Autumnalis, Bataviae, Ballum, Borincana, Bratislava, Canicola, Celledoni, Cynopteri, Djasiman, Georgia, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Mankarso, Pomona, Pyrogenes, Tarassovi and Wolffi	4	21
Brazil – Lago Grande	43	Andamana and Patoc	Autumnalis, Australis, Bataviae, Bratislava, Butembo, Canicola, Castellonis, Copenhageni, Cynopteri, Grippotyphosa, Guaricura, Hardjo-prajitno, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Pyrogenes, Shermani, Tarassovi, Whitcombi and Wolffi	4.7	22
Mexico – Mérida	13	Australis and Canicola*	Autumnalis, Bratislava, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, Panama, Pomona, Tarassovi and Wolffi	23.2	23
Iran – Mashhad	147	Hardjo*, Icterohaemorrhagiae and Pomona	Autumnalis, Ballum, Canicola and Grippotyphosa	12.9	12
Taiwan – Southern Taiwan	225	Australis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Pyrogenes and Shermani*	Autumnalis, Bataviae, Canicola, Panama, Pomona and Tarassovi	9.3	13
Canada – Quebec	240	Bratislava, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae and Pomona*	Canicola and Hardjo	10.8	14
Chile – Valdivia, Osorno, Paillaco and San Pablo	124	Autumnalis*, Bataviae and Canicola	Ballum, Hardjo, Icterohaemorrhagiae and Pomona	25.2	15
Serbia – Belgrade	161	Australis*, Bratislava, Canicola, Grippotyphosa, Pomona* and Pyrogenes	Autumnalis, Bataviae, Icterohaemorrhagiae and Sejroe	26.7	24
Canada – Quebec	40	Autumnalis and Bratislava*	Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae and Pomona	25	25
Reunion Island	30	Panama	Australis, Autumnalis, Bataviae, Canicola, Castellonis, Cynopteri, Grippotyphosa, Hardjo-bovis, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Pomona, Pyrogenes, Sejroe and Tarassovi	26.6	26
Iran – Ahvaz	102	Australis and Ballum*	Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae and Pomona	4.9	27
USA – Massachusetts	63	Autumnalis*, Bratislava, Icterohaemorrhagiae and Pomona	Canicola, Grippotyphosa and Hardjo	4.8	20
Spain – Andalucía	53	Ballum and Icterohaemorrhagiae*	Australis, Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Pomona, Saxkoebing, Sejroe and Tarassovi	14	16
Greece – Thessaloniki	99	Ballum, Bataviae, Bratislava, Canicola, Panama, Pyrogenes and Rachmati*	Hebdomadis, Panama and Pomona	33.3	17
Scotland – Glasgow	87	Autumnalis, Hardjo-bovis* and Icterohaemorrhagiae	Autumnalis, Bratislava, Ballum, Canicola, Cynopteri, Grippotyphosa, Javanica, Pomona and Tarassovi	9.2	18
New Zealand – North Island	225	Balcanica, Ballum, Canicola, Copenhageni*, Hardjo* and Pomona	Australis, Bataviae, Javanica, Pyrogenes and Tarassovi	8.8	28

\*Most prevalent serovar reported in the study

**Slika 4.** Pregled seroprevalencije leptospiroze i vjerojatno infektivnih serovara u mačaka u različitim geografskim područjima (Izvor: MURILLO i sur.,2020).

U jednom istraživanju mogućih rizičnih čimbenika povezanih sa seropozitivnošću u mačaka (RODRIQUEZ i sur., 2014.) uvrđeno je da su serološki pozitivne mačke bile češće one životinje koje češće borave vani, one koje su vlasnici okarakterizirali kao „dobre lovce“ i one mačke koje su živjele u domaćinstvu s još barem jednom mačkom. S druge strane, prisustvo psa u domaćinstvu nije bilo dovedeno u vezu s povećanim rizikom.

### **2.3.2. Leptospiroza - bolest prirodnog žarišta**

Leptospiroza je tzv. bolest prirodnih žarišta. Žarišta leptospiroze predstavljaju geografska područja na kojima je učestalost leptospiroze veća jer unutar njih postoje biotički i abiotički čimbenici koji podržavaju održavanje i cirkulaciju uzročnika (ZAHARIJA i sur., 1982.).

Prirodna žarišta leptospiroze mogu se podijeliti na arhaična, sinantropna i antropourgična.

Stara „arhaična“ žarišta leptospiroze su područja unutar kojih leptospirozu održavaju mišoliki glodavci, a povoljni abiotički čimbenici podržavaju produženo preživljavanje ovih bakterija u okolišu. Područja koja su nastala djelovanjem čovjeka nazivaju se sinantropna žarišta, a nastala su približavanjem pojedinih vrsta glodavaca (štakori, kućni miš) ljudskim nastambama zbog lakše dostupne hrane. Sinantropna žarišta su najčešće gusto naseljena mjesta s lošim sanitarno-higijenskim uvjetima. Prevladavajući serovar koji inficira ljude u tim područjima je serovar *Icterohaemorrhagiae* čiji je rezervoar štakor (BALAN TOPIĆ i sur., 2010.; BARANTON i POSTIC, 2006.; CICERONI i sur., 2000.; HABUŠ i sur. 2017.; JANSEN i sur., 2005.). Antropourgična žarišta nastaju uvođenjem i uzgojem domaćih životinja koje su, nakon prilagodbe leptospira, postale tzv. evolucijski domaćini za pojedine serovare (TURK, 2015.). U tim područjima prevladavaju infekcije serovarima koji su se prilagodili na pojedine vrste domaćih životinja.

## 2.4. Patogeneza

Nakon što leptospire prodru kroz sluznice ili oštećenu kožu u organizam, ulaze u krvotok, brzo se umnažaju te naseljavaju razne organe gdje se daljnja replikacija nastavlja (GREENE, 2012.). Za vrijeme septikemijske faze (leptospiremije), koja počinje jedan do dva dana poslije infekcije, leptospire se mogu izdvojiti iz krvi, različitih parenhimskih organa i cerebrospinalne tekućine. Primarna bakterijemija završava nakon 10 do 14 dana ako domaćin ima optimalni imunski odgovor, tj. pojavom humoralnih protutijela u cirkulaciji. Sekundarna bakterijemija, koja se javlja od 15. do 36. dana poslije infekcije, je rijetka (HATHAWAY i sur., 1983.). Nakon pojave aglutinacijskih protutijela dolazi do eliminacije leptospira iz krvotoka i većine parenhimskih organa opsonizacijom i lizom. Ove bakterije tada naseljavaju predilekcijska mjesta - proksimalne zavijene bubrežne kanaliće gdje se nalaze slijepljene u strukturi nalik biofilmu izvan dohvata specifičnih protutijela. Iz tako se naseljenog bubrega leptospire urinom mogu povremeno izlučivati u okoliš i do nekoliko mjeseci (CVETNIĆ, 2008.). Osim u bubregu, leptospire se mogu zadržavati i u mozgu, prednjoj očnoj komorici te spolnim organima (MILAS, 2012.).

Točan mehanizam kojim patogene leptospire uzrokuju oštećenja organa nije potpuno razjašnjen i može se razlikovati među organskim sustavima (MEDEIROSFDA i sur., 2010.).

Ove spirohete proizvode različite enzime uključujući fosfolipaze, sfingomijelinaze i tzv. proteine koje stvaraju pore (SYKES, 2014.) za koje se pretpostavlja da imaju značajnu ulogu u virulenciji, a oslobođeni endotoksini mogu izazvati oštećenja krvožilnog i živčanog sustava (CVETNIĆ, 2008.). Kod teških infekcija može doći do edema tkiva i vaskulitisa što je posljedica akutne ozljede endotela. Ove su pojavnosti tipične za sistemsku infekciju praćenu tzv. sindromom sistemskog upalnog odgovora (SIRS). Lipopolisaharidi, koji se nalaze u vanjskoj

ovojnici, najvjerojatnije stimuliraju adheziju neutrofila i aktivaciju trombocita, što također može doprinijeti upalnom odgovoru i koagulopatijama koje se javljaju (GREENE, 2012.).

## **2.5. Klinička slika**

Infekcija patogenim serovarima može uzrokovati raznoliku kliničku sliku i to od subkliničkih i blagih do teških kliničkih oblika praćenih otkazivanjem bubrega, oštećenjima jetre ili plućnim hemoragijskim sindromom često uz smrtni ishod (BHARTI i sur., 2003.). Kako će se klinički očitovati bolest i koliko dugo će trajati kliconoštvo ovisi o infektivnoj dozi, virulenciji serovara koji uzrokuje infekciju te vrsti i imunološkom odgovoru domaćina (LEVETT, 2001.).

Inkubacija leptospiroze iznosi otprilike sedam dana, ali u svom trajanju može značajnije varirati, ovisno o gore navedenim čimbenicima (GREENLEE i sur., 2005.). Pojedina istraživanja pretpostavljaju da bi inkubacijski period u mačaka mogao biti i nešto duži od onog kod drugih domaćih životinja (LARSSON i sur., 1985.). Studije koje opisuju eksperimentalne, ali i prirodne infekcije mačaka, upućuju na činjenicu da se u ove vrste životinja infekcija vrlo rijetko klinički očituje (GREENE, 2012.). Ipak, u jednom istraživanju leptospiroze mačaka u Kanadi (RODRIQUEZ i sur. 2014) utvrđeno je da su seropozitivne životinje češće imale akutnu leziju bubrega u odnosu na onu skupinu mačaka koja je bila serološki negativna. Druga istraživanja također opisuju povezanost između prisutnosti specifičnih protutijela u mačaka i zatajenja bubrega i/ili histopatološkog dokaza upale bubrežnog tkiva (MILLÁN i sur., 2009.; OJEDA i sur., 2018.). Istraživanje provedeno u Francuskoj pronašlo je izravnu vezu između serološke reaktivnosti u mačaka i povećane učestalosti poliurije i polidipsije (LUCIANI, 2004.), a tijekom

istraživanja u Sjedinjenim Američkim Državama provedenog na tri prirodno inficirane mačke prvi simptomi koji su se javili bili su poliurija i polidipsija (ARBOUR i sur., 2012.).

Sukladno navedenom, može se pretpostaviti da, kao i kod pasa, i kod mačaka leptospiroza u pojedinim slučajevima može dovesti do akutnog oštećenja bubrega koji pak može voditi do kroničnih oboljenja (RODRIGUEZ i sur., 2014.; SCHULLER i sur., 2015.). Promjene na jetri u mačaka zabilježene su, ali se puno rjeđe opisuju nego što je to slučaj kod zaraženih pasa (ANGULOYE i sur., 1996.; ARBOUR i sur., 2012.; SHOPET i sur., 1980.).

Nalazi hematoloških i biokemijskih nalaza krvi u mačaka sa suspektnom leptospirozom nisu jednoznačni. Broj će leukocita ovisiti o stadiju i intenzitetu bolesti. Tijekom bakterijemije možemo naći leukopeniju, dok u kasnijim stadijima broj leukocita može biti povišen. Kod većine mačaka imamo srednje do jače izraženu azotemiju (ARBOUR i sur., 2012.; BEADU-LANGE i sur., 2014.; LAPOINTE i sur., 2013.; RODRIGUEZ i sur., 2014.; WEIS i sur., 2017.).

Toksini leptospira inhibiraju aktivnost  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze u epitelnim stanicama bubrežnih kanalića kod pasa i mačaka što može dovesti do izraženog gubitka elektrolita urinom, uzrokujući hipokalijemiju (BURTH i sur., 1997.). Povišene vrijednosti fosfora u serumu mačaka povezuju se sa smanjenom glomerularnom filtracijom. Analizom urina inficiranih mačaka nađena je hipostenurija, hematurija i proteinurija (ARBOUR i sur., 2012.; OJEDA i sur., 2018.)

Osim navedenih kliničkih znakova, u mačaka kod kojih je leptospiroza potvrđena serološki i /ili PCR-om, opisuju se i uveitis, hromost, slabost, febrilitet, gubitak težine, ascites, povraćanje, proljev, bol prilikom manipulacije i upalne promjene na koži i mekušima (ARBOUR i sur., 2012.; BEADU-LANGE i sur., 2014.; AGUNLOYE i sur., 1996.; LAPOINTE i sur., 2013.; MYLONAKIS i sur., 2005.; RODRIGUEZ i sur., SHROPSHIRE i sur., 2016.; 2014.; WEIS i sur., 2017.).

## **2.6. Dijagnostika**

Sumnju na leptospirozu postavljamo temeljem epizootioloških podataka i kliničkog nalaza, no da bi objektivno dijagnosticirali bolest potrebno je dokazati uzročnika izdvajanjem ili molekularnim dijagnostičkim metodama ili pak dokazati prisustvo specifičnih protutijela u serumu serološkim metodama. Rutinska dijagnostika leptospiroze uglavnom se temelji na dokazu protutijela u serumu mikroskopskom aglutinacijom (MAT) i/ili dokazom uzročnika u krvi ili urinu PCR-om. Bakteriološka pretraga krvi ili urina ne upotrebljava se u rutinskoj dijagnostici zbog dugog vremena potrebnog za izvođenje.

### **2.6.1. Dokaz uzročnika**

Uspješnost laboratorijske dijagnostike ovisna je o pravodobnom i pravilnom uzorkovanju. U ranom stadiju bolesti (7-10 dana od infekcije) leptospire se nalaze u krvi, ali ih možemo naći i u većini parenhimskih organa. U tom stadiju najbolji uzorak je puna krv koju moramo uzorkovati prije davanja antibiotske terapije. Djelovanjem specifičnih protutijela dolazi do uklanjanja leptospira iz krvotoka i većine organa, no one zaostaju u proksimalnim bubreženim kanalićima od kud se izlučuju urinom. U tim stadijima možemo uzorkovati urin imajući na umu da je izlučivanje urinom sporadično zbog čega se mogu javiti i lažno negativni rezultati.

U slučaju da se dijagnostika vrši nakon smrti životinje materijal od izbora uvijek je bubreg.

#### **2.6.1.1. Izravni dokaz**

Moguće je dokazati leptospire izravno u urinu ili nekoj drugoj tjelesnoj tekućini pomoću mikroskopa s tamnim vidnim poljem, no takva metoda je izrazito slabo osjetljiva i specifična.



Također, zahtijeva da su bakterije u uzorku prisutne u vrlo velikom broju te znatnu stručnost osobe koja očitava pretragu. Za izravan dokaz leptospira u organima tijekom post-mortem dijagnostike nerijetko su potrebna i posebna bojanja na bazi srebra ili se pak rabe imunohistokemijske metode.

#### **2.6.1.2. Izdvajanje uzročnika na hranjivim podlogama**

Izdvajanje uzročnika iz krvi, urina, cerebrospinalne tekućine ili bubrega je moguće, no ova se metoda ne koristi često u rutinskoj dijagnostici. Razlog tome je što je dugotrajna, slabije osjetljiva od molekularnih metoda i provodi se samo u specijaliziranim laboratorijima. Za izdvajanje leptospira koriste se posebne hranjive podloge, a nacijepljeni materijal inkubira se i do tri mjeseca. No iako nema prevelikog značaja u dijagnostici ova metoda je bitna za znanstvenike i epidemiologe jer se jedino njome izdvajaju žive bakterije koje se mogu poslije tipizirati (SYKES, 2014.).

#### **2.6.2. Molekularne metode**

Molekularne metode kao što su lančana reakcija polimerazom (*eng.* Polymerase chain reaction-PCR) i lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (*engl.* Real Time PCR) izravno i objektivno dokazuju prisustvo specifičnog odsječka DNK patogenih leptospira u uzorku. Preporuča se korištenje lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu zbog njene visoke osjetljivosti i specifičnosti, ali i brzine izvođenja (BOURHY i sur. 2011.). Kao uzorak možemo koristiti krv, urin, cerebrospinalnu tekućinu te posmortalno tkiva, idealno bubreg. Nedostatak ovih metoda dijagnostike je nemogućnost utvrđivanja serovara ili serogrupe koja je uzrokovala bolest.

### 2.6.3. Dokaz protutijela

Za dokaz specifičnih protutijela koriste se serološke metode. Referentna metoda u dijagnostici leptospiroze je metoda mikroskopske aglutinacije (MAT). Može se koristiti i ELISA u obliku brzog komercijalnog testa koji detektira specifična protutijela za leptospirozu (IgM), ali samo u početku bolesti kada taj razred protutijela nastaje (ADLER, 2014.). Njihov nedostatak je, osim navedenog, i da takvi brzi testovi ne mogu odrediti infektivni serovar niti serološku skupinu, kao niti titar protutijela, a i vrsno su specifični. Tako komercijalni kitovi za dijagnostiku leptospiroze kod mačaka još nisu razvijeni (MURILLO i sur., 2020.).

Kao što je već spomenuto, MAT predstavlja zlatni standard u dijagnostici leptospiroze. To je kvantitativna metoda kojom možemo odrediti i vjerojatno infektivan serovar odnosno serološku skupinu. Ova serološka metoda temelji se na principu aglutinacije gdje antigen (leptospira) i protutijelo reagiraju te tvore netopljive komplekse koje promatramo pod mikroskopom s tamnim vidnim poljem. Uzorkujemo serum, a za samo izvođenje su nam potrebne žive kulture leptospira. S obzirom na veliki broj patogenih serovara unutar roda *Leptospira* i izostanka unakrižnih reakcija koristimo panel antigena koji sadržava najčešće infektivne serovare za pojedinu vrstu životinja na određenom geografskom području.

Za dokaz akutnih infekcija uzorkuju se parni serumi. Nakon prvotne pretrage, ponovno uzorkujemo serum nakon sedam do četrnaest dana i na temelju kretanja titra protutijela možemo odrediti o kakvom se tipu infekcije radi. Da bismo zaključili da je životinja u akutnoj infekciji, moramo imati dokaz protutijela u visokom titru u prvom serumu. U slučaju da je prvi serum bio negativan ili pak pozitivan u niskom titru, u drugom serumu treba doći do serokonverzije odnosno četverostrukog porasta titra protutijela.

## 2.7. Liječenje i preventiva

Preporučeni protokol liječenja leptospiroze kod mačaka temelji se na protokolu liječenja pasa (HARTMANN i sur., 2013.). Sastoji se od etiološke, potporne i simptomatske terapije. Etiološko liječenje se sastoji od dvije faze antimikrobne terapije. Prva faza ima za cilj spriječiti umnažanje leptospira i tu se koriste najčešće penicilini, ali mogu i drugi kemoterapeutici na koje su leptospire osjetljive. Tu spadaju aminoglikozidi, flourkinoloni, makrolidi i tertraciklini.

Nakon što je pacijent stabilno prelazi se na drugu fazu gdje je preporuka koristiti doksiciklin ili streptomycin, s obzirom da samo ta dva antimikrobna lijeka uklanjaju leptospire iz bubrega i sprečavaju kliconoštvo (FAINE i sur., 1999.).

Potporna i simptomatska terapija su, pogotovo u početku bolesti, izrazito bitne i povećavaju šanse za oporavak životinje. One ovise o ozbiljnosti kliničkih znakova i prisutnosti oštećenja bubrega i jetre. Sprečavanje zatajenja bubrega je najvažniji dio liječenja leptospiroze kod psa te se smatra da isto vrijedi i za mačke (HARTMANN i sur. 2013.).

Imunoprofilaksa je razvijena za pse, konje, goveda i svinje, no djelovanje cjepiva je kratkotrajno i ograničeno zbog nemogućnosti unakrižne zaštite među različitim serološkim skupinama. Stoga se profilaksa treba temeljiti i na sprečavanju kontakta životinja i ljudi s izvorom infekcije i na suzbijanju kliconoštva i rezervoara ove bolesti. U mačaka to znači onemogućiti mački kontakt s mogućim inficiranim glodavcem ili kontaminiranim okolišem. Mačke koje ne borave vani imaju jako nizak rizik oboljenja (HARTMANN i sur. 2013.).

### **3. MATERIJALI I METODE**

Tijekom ovog istraživanja pretraženo je 84 uzorka seruma mačaka s područja Zagreba i okolice prikupljenih u razdoblju od 2018. do 2021. godine i arhiviranih u Laboratoriju Klinike za unutarnje bolesti i Klinike za zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Odabirani su samo oni serumi mačaka za koje su vlasnici tijekom uzimanja anamneze izjavili da izlaze van kuće odnosno stana. Svi uzorci pretraženi su metodom mikroskopske aglutinacije.

#### **3.1. Serološka metoda mikroskopske aglutinacije**

Metoda mikroskopske aglutinacije (MAT) je referentna serološka metoda za dijagnosticiranje leptospiroze. To je subjektivna metoda kojom se utvrđuje prisutnost specifičnih protutijela serumu. Metoda se temelji na reakciji antigena i protutijela (IgM i IgG) pri čemu dolazi do tvorbe netopivih kompleksa odnosno aglutinata. MAT ima svoj kvalitativni i/ili kvantitativni dio. U kvalitativnom dijelu pretrage utvrđuje se postoje li, u osnovnom razrjeđenju pretraživanog seruma (1:50), protutijela za određeni serovar leptospira (antigen).

Rezultat kvalitativne pretrage može biti pozitivan ili negativan. Kvantitativni MAT izvodi se ako je rezultat kvalitativnog dijela pretrage pozitivan. Rade se dvostruka serijska razrjeđenja seruma kako bi se ustanovio konačni titar protutijela. Za izvođenje MAT-a upotrebljavaju se žive leptospire.

### 1.Materijali:

85 uzoraka seruma mačaka

12 referentnih sojeva leptospira - dijagnostički panel br. 3 (*Tablica 2*)

### 2.Pribor i oprema:

Termostat 28-30 °C

Mikroskop s tamnim vidnim poljem

Laboratorijski plamenik

Pipeta, višekratna 20-200 µl ili 30-300 µl

Pipeta 2-20 µl ili 0,5-10 µl

Pipeta dispenser

Odgovarajući nastavci za pipete

Epruvete Eppendorf, volumena 1,5 ml

Staklene epruvete s navojnim PP čepom 16 x 100 A

Mikrotitracijska plitica s 96 jažica i V dnom

Mikrobiološka eza

Latex rukavice

Predmetna stakalca

Vodootporni marker

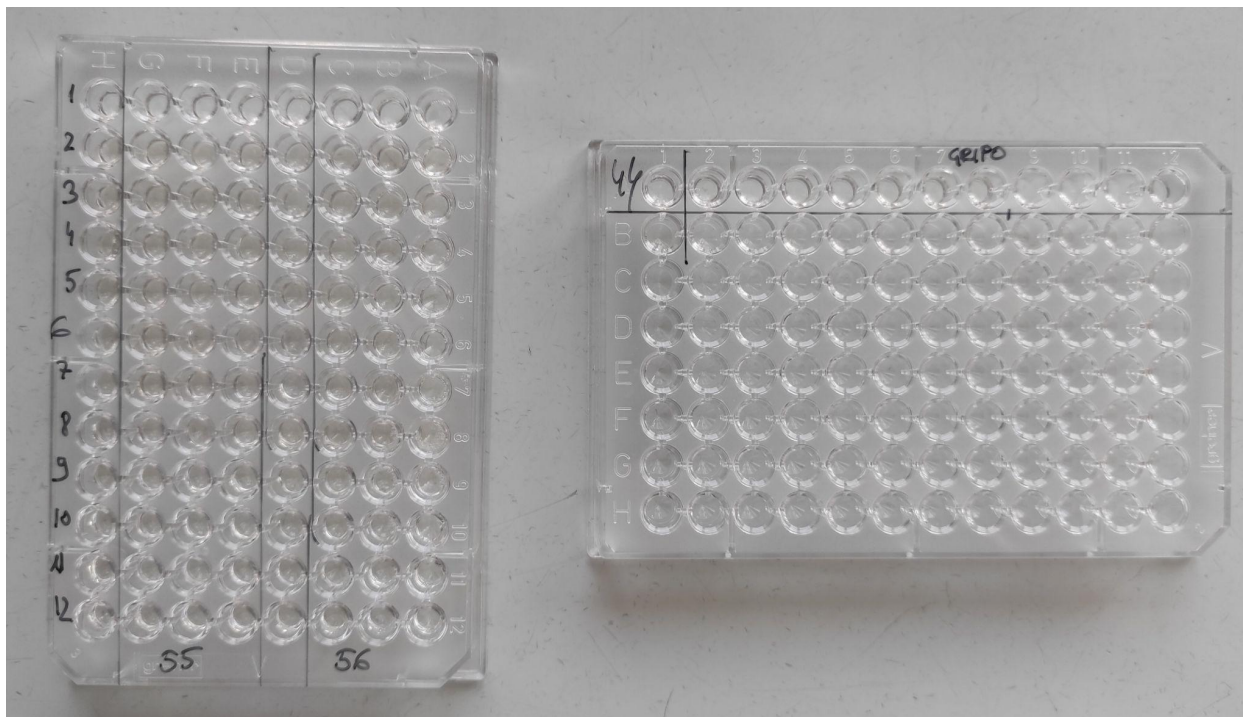
### 3.Reagensi:

Fosfatni pufer (PBS)

**Tablica 1.** Dijagnostički panel br. 3 - panel antigena kojeg smo koristili u dijagnostici

Rb.	Serološka skupina	Serovar	Soj	Genomska vrsta
1	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V	<i>L. kirschneri</i>
2	Sejroe	Sejroe	M 84	<i>L. borgpetersenii</i>
3	Australis	Bratislava	Jež Bratislava	<i>L. interrogans</i>
4	Pomona	Pomona	Pomona	<i>L. interrogans</i>
5	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV	<i>L. interrogans</i>
6	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	<i>L. interrogans</i>
7	Tarassovi	Tarassovi	Perepelistin	<i>L. borgpetersenii</i>
8	Sejroe	Saxkoebing	Mus 24	<i>L. interrogans</i>
9	Ballum	Ballum	Mus 127	<i>L. borgpetersenii</i>
10	Bataviae	Bataviae	Swart	<i>L. interrogans</i>
11	Javanica	Poi	Poi	<i>L. borgpetersenii</i>
12	Sejroe	Hardjo	Hardjobovis	<i>L. interrogans</i>

MAT se izvodi u prethodno valjano označenim mikrotitracijskim plastičnim pločicama s 96 jažica. Mikrotitracijska pločica se pri izvođenju kvalitativnog dijela pretrage polaže okomito, a prilikom kvantitavnog dijela vodoravno (Slika 4).



**Slika 5.** Označene mikrotitracijske plitice s V dnom za izvođenje kvalitativnog (lijeva plitica) i kvantitativnog dijela pretrage (desna plitica)

(Izvor: Privatna fotografija)

U svaku jažicu mikrotitracijske plitice stavlja se po 50  $\mu$ l PBS-a pomoću multikanalne pipete. U jažicu drugog stupca (iza linije) stavlja se po još 50  $\mu$ l PBS-a i po 4,2  $\mu$ l pretraživanog seruma. Višekanalnom pipetom sadržaj jažica drugog stupca miješa se te se prebacuje po 50  $\mu$ l sadržaja iz drugog stupca u treći, ponovno se miješa te se postupak ponavlja do jažica posljednjeg stupca iz kojeg se nakon miješanja odbacuje 50  $\mu$ l sadržaja.

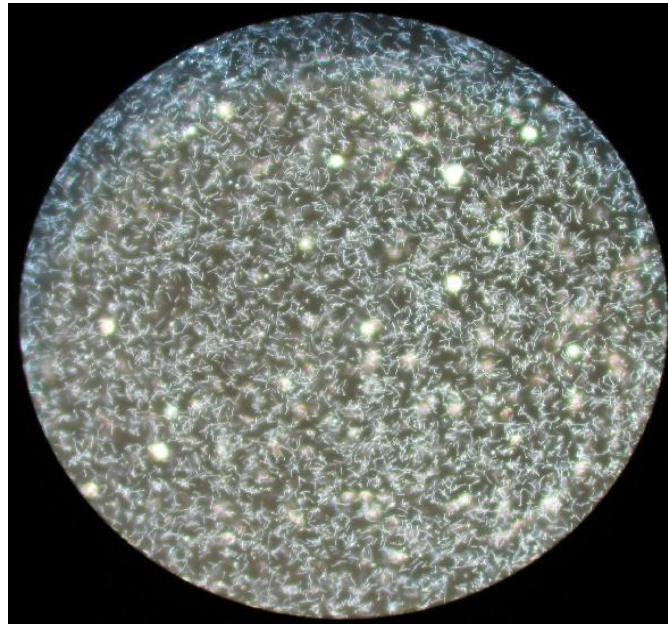
Nakon što smo od osnovnog razrjeđenja (1:50) dobili dvostruka serijska razrjeđenja, dispenser pipetom, u svaku jažicu se doda 50  $\mu$ l kulture antigena, na način da će se u različitim redovima nalaziti različiti serovari. Redoslijed na ploči odgovara navedenom redoslijedu prikazanom u

Tablici 2. Mikrotitracijske se plitice zatim prekrivaju prozirnou pokrovnou pločou te se inkubiraju dva sata u termostatu pri 28-30°C.

Nakon inkubacije mikrobiološkom ezou se iz mikrotitracijskih plitica prenese kap na predmetno stakalce te se pomoću mikroskopa s tamnim vidnim poljem očitava reakcija (Slika 5). Svaki serum u kojem je aglutiniralo najmanje 50 % leptospira smatra se pozitivnim.

Kod pozitivnih reakcija radi se kvantitativna pretraga. Postupak je jednak kao i kod kvalitativne pretrage s razlikou broja razrjeđenja. Tad se, naime, traži konačan titar, odnosno najveće razrjeđenje u kojem je još uvijek vidljiva pozitivna reakcija.

Tijekom ovog istraživanja pozitivnim rezultatom smo smatrali sve one u kojih je utvrđen titar protutijela 1:50 i viši na bilo koji serovar *Leptospira spp.* unutar panela.



**Slika 6.** Prikaz leptospira pod mikroskopom s tamnim vidnim poljem

(Izvor: <https://leptospira.amsterdamumc.org/leptospirosis-reference-centre/>)



### 3.2. Obrada podataka

Kako bismo utvrdili postoji li povezanost seroreaktivnosti u mačaka s očitovanjem određenih kliničkih znakova pretraženi su podatci arhivirani u ambulantnom protokolu. Podatci koje smo prikupljali bili su ograničeni na one koji su u prijašnjim znanstvenim istraživanjima leptospiroze u mačaka detektirani kao značajni. Sukladno tome bilježili su se podatci o prisustvu anoreksije, letargije, svakog odstupanja od normotermije, poliuriji i polidipsiji, uveitisu, ascitesu, upalnim promjenama na koži, hromosti, prisustvu respiratornih ili gastrointestinalnih problema. Od alteracija u hematološkim i biokemijskim pretragama bilježila su se povišenja koncentracije ureje, kreatinina i jetrenih enzima u serumu, prisustvo elektrolitnog disbalansa i anemije. Također su se pretraživali i bilježili podatci o mogućoj proteinuriji i hematuriji.

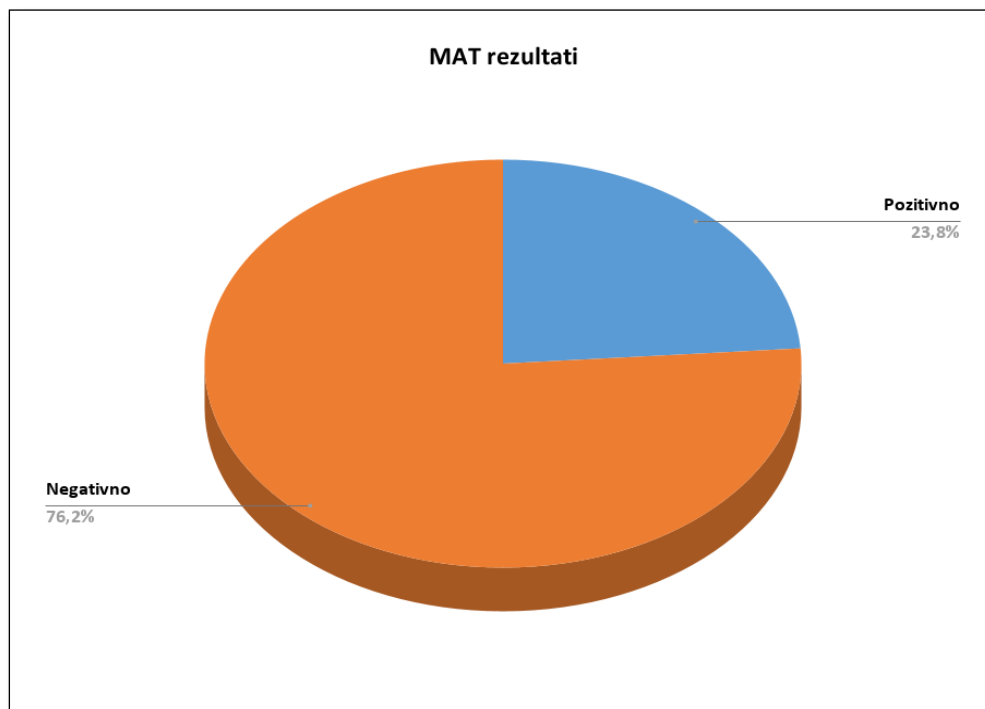
Prikupljeni su i obrađeni i podatci o dobi i spolu životinja, kao i podatci koji bi mogli biti smatrani određenim rizičnim čimbenikom koji pospješuje infekciju kao što je poznati kontakt s glodavcima ili imunosupresija zbog retrovirusnih bolesti mačaka.

Svi su podatci uneseni u Excell tablicu te se njihova prisutnost ili odsutnost uspoređivala s pozitivnim ili negativnim nalazom, a također je određen i statistički značaj za svaki navedeni čimbenik.

Za potrebe rada korištene su metode deskriptivne statistike te je pri statističkoj obradi podataka korišten Hi-kvadrat test uz razinu značajnosti  $p=0,05$ .

#### 4. REZULTATI

Specifična protutijela u različitom titru (od 1:50 do 1:1600) (Tablica 2.), serološkom metodom mikroskopske aglutinacije, ustanovljena su kod 20 mačaka (23,81%) (Slika 7.). Vjerojatno infektivnom serološkom skupinom smatrana je ona skupina čiji su predstavnici u reakciji reagirali s najvišim titrom. One pozitivne rezultate u kojima je s istim titrom reagiralo više od jednog serovara iz različitih seroloških skupina smatrali smo nedeterminiranim.



**Slika 7.** Podjela mačaka uključenih u istraživanje s obzirom na rezultate MAT-a

**Tablica 2.** Prikaz pozitivnih rezultata i vjerojatno infektivnih seroloških skupina

Rb.	REZULTAT	VJEROJATNO INFEKTIVNA SEROLOŠKA SKUPINA
1.	Sejroe 1:100; Sax 1:50	Sejroe
2.	Grippotyphosa 1:50; Bratislava 1:400; Pomona 1:200; Sax 1:50	Australis
3.	Bratislava 1:100; Pomona 1:100	Nedeterminirano
4.	Grippotyphosa-1:400; Bratislava 1:200; Pomona 1:800	Pomona
5.	Grippotyphosa 1:50; Pomona 1:400	Pomona
6.	Grippotyphosa 1:50; Pomona 1:200	Pomona
7.	Grippotyphosa 1:50	Grippotyphosa
8.	Grippotyphosa 1:50; Sejroe 1:200; Bratislava 1:200; Pomona 1:800; Sax 1:200	Pomona
9.	Grippotyphosa 1:100	Grippotyphosa
10.	Pomona 1:100	Pomona
11.	Grippotyphosa 1:50; Pomona 1:50	Nedeterminirano
12.	Pomona 1:50	Pomona
13.	Pomona 1:100	Pomona
14.	Canicola 1:50	Canicola
15.	Bratislava 1:100	Australis
16.	Bratislava 1:100	Australis
17.	Bratislava 1:50	Australis
18.	Bratislava 1:200; Icterohaemorrhagiae 1:50	Australis
19.	Grippotyphosa 1:50; Pomona 1:50	Nedeterminirano
20.	Pomona 1:1600	Pomona

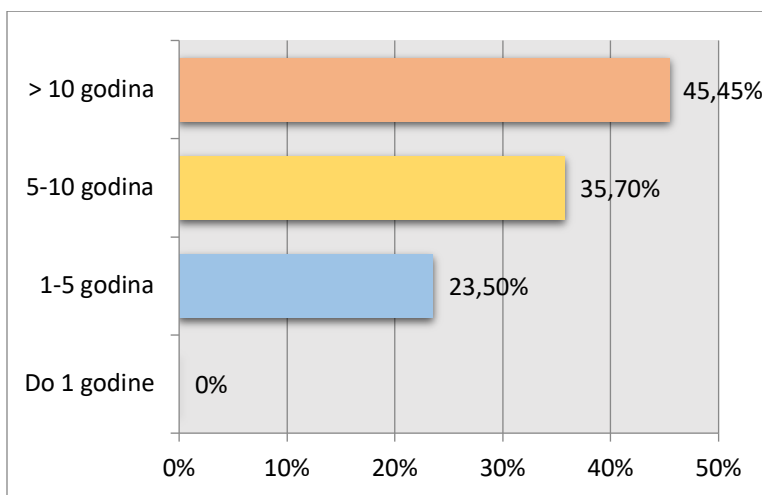
Pomona, kao vjerojatno infektivna serološka skupina, utvrđena je kod osam mačaka, Australis kod pet, Grippytyphosa kod dvije te Canicola i Sejroe kod jedne mačke. U tri preostala seruma titar protutijela je bio jednak za više serovara (nedeterminirano) (Slika 8).



**Slika 8.** Vjerojatno infektivna serološka skupina

Od ukupno 20 pozitivnih životinja njih sedam bilo je muškog, a 13 ženskog spola. Ipak, utvrđena razlika nije statistički značajna ( $p=0,385$ ) s obzirom da niti u ukupnom uzorku ( $n=84$ ) raspored spolova nije bio jednak. Od 83 mačke kod kojih smo mogli utvrditi spol, muških je bilo 34, a ženskih 49.

Kako bi se utvrdilo postoji li povezanost dobi mačaka sa seroprevalencijom kategorizirali smo pretražene životinje na one do jedne godine života; od jedne do pet godina, pet do deset te preko deset godina. Niti jedna seropozitivna mačka tijekom ovog istraživanja nije bila mlađa od jedne godine. 23,5% mačaka s protutijelima za leptospirozu pripadale su drugoj skupini (1-5 godina), dok je u trećoj bilo 35,7%, a u četvrtoj skupini 45,45% mačaka. Na Slici 9. se jasno može pratiti kako seropozitivnost raste s dobi životinja.

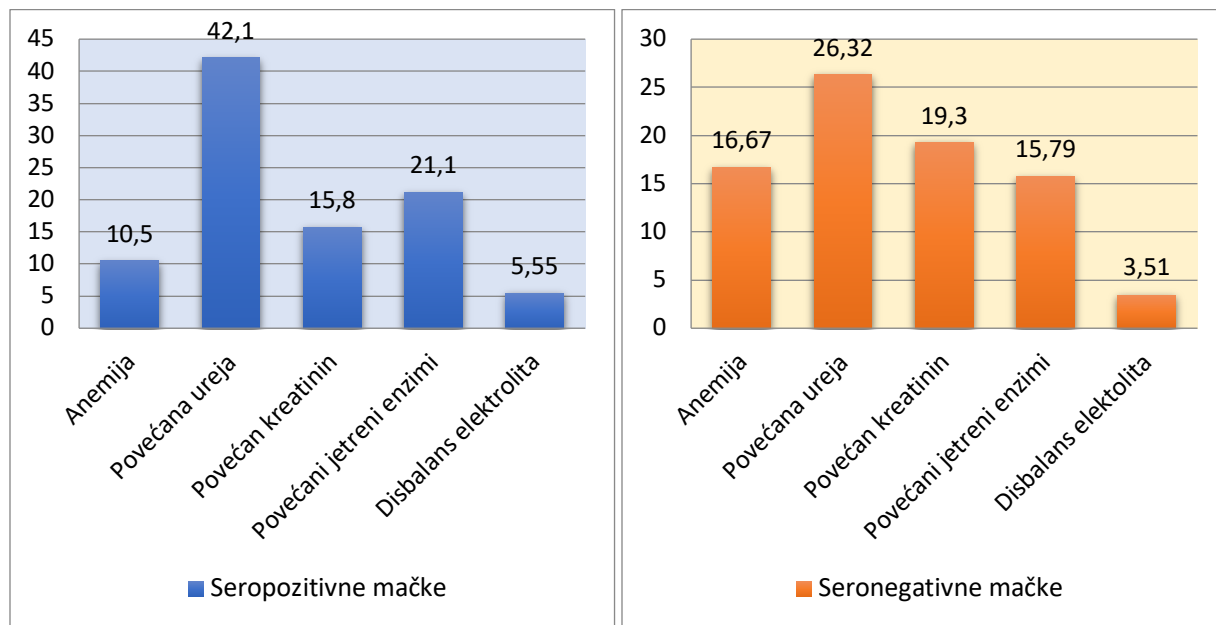


**Slika 9.** Udio pozitivnih životinja unutar svake dobne kategorije

Kako bismo utvrdili moguće rizične čimbenike koji pogoduju infekciji prikupili smo i obradili i podatke o poznatom kontaktu s glodavcima te podatke o mogućim komorbiditetima koji su povezani s imunosupresijom kao što su retrovirusne bolesti mačaka. Podatci je li mačka lovac i je li bila u kontaktu s glodavcima nisu postojali za 71 životinju. Od 13 mačaka, kod kojih su postojali podatci, samo kod dvije mačke vlasnici su potvrdili da imaju kontakt s glodavcima i obje su životinje bile seropozitivne. Kako nijedna mačka od seronegativnog uzorka nije imala

poznati kontakt s glodavcima (0%) Hi kvadrat test se nije mogao izračunati. Ipak, obzirom na navedeno kontakt mačke s glodavcem možemo smatrati rizičnim čimbenikom.

Od 12 seropozitivnih mačaka jedna (8,3%) je bila pozitivna na infekciju mačjim virusom imunodeficijencije (FIV) dok je kod seronegativnih mačaka od 44 mačke koje su bile testirane, njih sedam (15,91%) imalo jednu ili obe mačje retrovirusne zarazne bolesti.



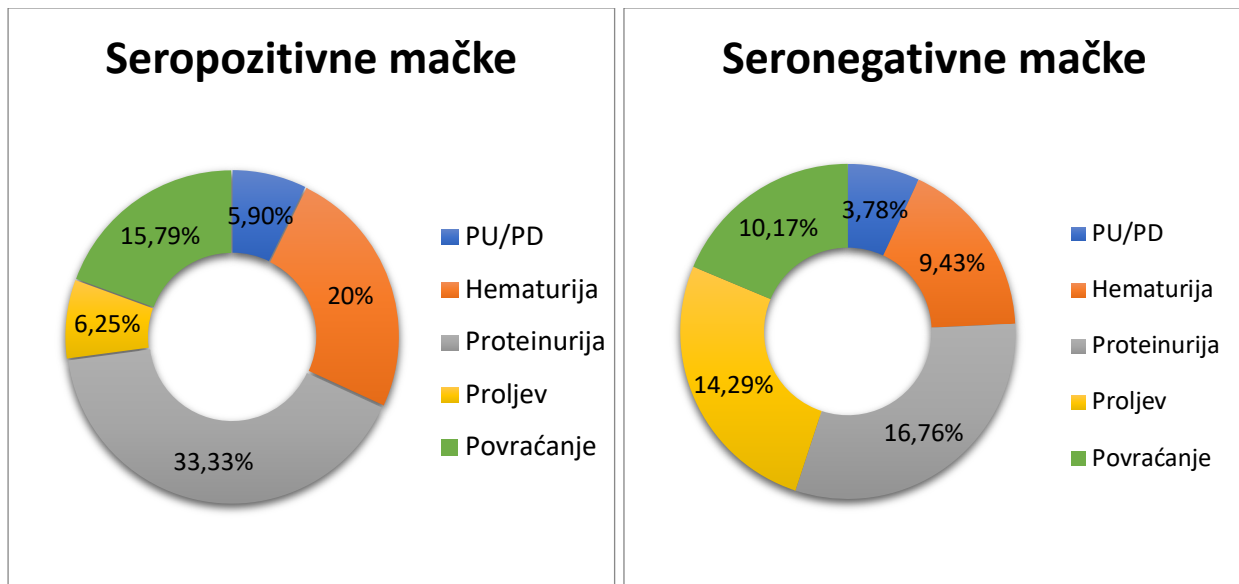
**Slika 10.** Usporedba učestalosti anemije, povišenja koncentracije ureje, kreatinina i jetrenih enzima te elektrolitnog disbalansa u skupini seropozitivnih i seronegativnih mačaka

Kako bismo utvrdili postoji li povezanost seroreaktivnosti u mačaka s očitovanjem određenih kliničkih znakova istraživali smo njihov udio u skupini seropozitivnih i seronegativnih životinja. Na Slici 10. prikazana je usporedba učestalosti anemije, povišenja koncentracije ureje, kreatinina i jetrenih enzima te elektrolitnog disbalansa u obje skupine životinja. Kao što se može

primijetiti kod seropozitivnih mačaka češće su se javljale povišene vrijednosti ureje i jetrenih enzima i elektrolitnog disbalansa. Ipak, razlike se nisu pokazale kao statistički značajne.

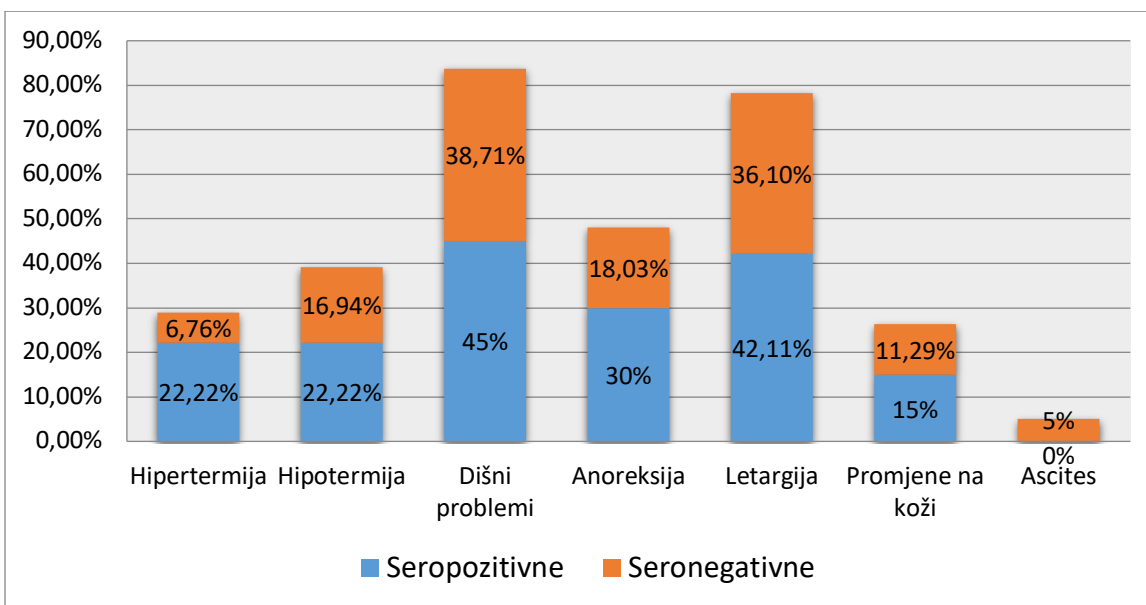
Uveitis je zabilježen kod 15 % seropozitivnih mačaka, dok je udio seronegativnih životinja sa uveitisom bio 1,67%. Prilikom izračuna statističkog značaja  $p$  je iznosio 0,0179, no zbog malih brojeva korištena je Yatesova korekcija te je  $p$  bio 0,076 te kao takav ipak nije značajan.

U prijašnjim istraživanjima različiti klinički znakovi kao što su povraćanje, poliurija/polidipsija, hematurija i proteinurija povezuju se s leptospirozom u mačaka. Ovi su klinički znakovi bili učestaliji i u skupini seropozitivnih mačaka (Slika 11.) tijekom našeg istraživanja, no bez statistički značajne razlike.



**Slika 11.** Udio seropozitivnih i seronegativnih mačaka kod kojih su prisutni poliurija/polidipsija, proljev, povraćanje, proteinurija i hematurija

Zadnjih šest kliničkih znakova koje smo pokušali povezati sa seropozitivnošću prikazani su na Slici 12. Skoro je polovica (45%) seropozitivnih mačaka imalo neku vrstu dišnih smetnji, no razlika nije bila statistički značajna ( $p=0,249$ ). Drugi klinički znak koji na prvi pogled izgleda značajno zbog velike razlike u postotku između seropozitivnih i seronegativnih jedinki je hipertermija. No on također kao i uveitis, nakon Yatesove korekcije nije imao značaj u ovom istraživanju ( $p=0,1$ ).



**Slika 12.** Udio seropozitivnih i seronegativnih mačaka kod kojih su prisutni letargija, anoreksija, hiper/hipotermija, respiratorni simptomi, promjene na koži i ascites

Titar protutijela  $\geq 1:800$  koji možemo povezati s akutnom leptospirozom utvrđen je kod tri životinje. Podatci o razlogu dolaska na Veterinarski fakultet kao i postavljene dijagnoze, zabilježeni klinički znakovi te laboratorijski nalazi prikazuju se u Tablici 3.



**Tablica 3.** Podatci o mačkama s titrom  $\geq 1:800$ 

	Titar i vjerojatno infektivna serološka skupina	Razlog dolaska	Prisutni klinički znakovi	Dijagnoza	Laboratorijski nalazi (promijenjeni)
<b>Mačka br. 1</b>	Pomona 1:1600	Vlasnica primijetila tvorbu ispod repa	Hiperemija Anoreksija	Prolaps rektuma	Limfociti- $1,38 \times 10^9/L$ Leukociti- $19,7 \times 10^9/L$ Seg. neutrofil- $16,94 \times 10^9/L$
<b>Mačka br.2</b>	Pomona 1:800	Životinja letargična i u respiratornom distresu	Letargija Hipotermija Tahipneja	Kronična, piogranulomatozna, ekstezivna pleurpneumonija	RBC- $4,8 \times 10^{12}/L$ HCT-25% PLT- $41 \times 10^9/L$ Leukociti- $2 \times 10^9/L$ Seg. neutofili- $0,26 \times 10^9/L$ Limfociti- $1,24 \times 10^9/L$ BUN-24,1 mmol/L CR-387 $\mu\text{mol}/L$ ALT-249 U/L AST-140 U/L ALP-128 U/L
<b>Mačka br.3</b>	Pomona 1:800	Sistematski pregled			

Sve su tri mačke na Veterinarski fakultet došle iz različitih razloga i s različitim kliničkim znakovima. Mačka s najvišim titrom (Pomona 1:1600) bila je hipertermična i anoreksična, a postavljena je dijagnoza prolapsa rektuma. Svi biokemijski parametri su bili unutar referentnih

vrijednosti, a u krvnoj slici jedine promjene su bile limfopenija, blaga leukocitoza te povećanje segmentiranih neutrofila. Druga je mačka (Pomona 1:800) zaprimljena hipotermična i u respiratornom distresu te su na rendgenskom prikazu viđene promjene na plućima. Hematološka pretraga pokazala je anemiju, trombocitopeniju, leukopeniju, neutropeniju te limfopeniju, a biokemijska povećane vrijednosti uree, kreatinina i jetrenih enzima. Treća je mačka (Pomona 1:800) došla na sistematski pregled te nije imala promjena ni u kliničkoj slici ni u hematološkim i biokemijskim nalazima.

## 5. RASPRAVA

Tijekom ovog istraživanja u mačaka s područja Zagreba i okolice utvrđena je seroprevalencija od 23,8%. U usporedbi s prevalencijom utvrđenom u drugim zemljama, npr. Škotskoj (9,2%), Estoniji (12,8%), Čileu (8,1%) (AGUNLOYE, 1996.; AZOCAR-AEDO i sur., 2014.; LEHTLA, 2020.), seroprevalencija dokazana u ovom istraživanju relativno je visoka. No ako je usporedimo sa seroprevalencijom dokazanom u Beogradu, Srbija, koja iznosi 26,7% (OBRENOVIĆ i sur., 2014.) ili s prethodnim istraživanjem u Republici Hrvatskoj u kojoj je udio pozitivnih mačaka na području Zagreba bio 21,48% (MODRIĆ i sur., 2010) možemo zaključiti da je karakteristična za ovo geografsko područje. Usporedimo li seroprevalenciju u ovom radu sa seroprevalencijom kod pasa u Republici Hrvatskoj, koja iznosi 23,45% (HABUŠ i sur., 2017.), možemo zaključiti da su na jednakoj razini, kao što je i pretpostavljeno na samom početku ovog istraživanja.

Već spomenuto istraživanje leptospiroze mačaka sa Zagrebačkog područja navodi serovar *Icterohaemorrhagiae* kao najčešći vjerojatni infektivni serovar koji je detektiran u čak 41,7% pozitivnih mačaka (MODRIĆ i sur., 2010.). Iako je seroprevalencija očito ostala slična, zamjećuje se značajna razlika u pojavnosti vjerojatno infektivnih serovara. Naime, u našem istraživanju najčešći vjerojatni infektivni serovar pripada serološkoj skupini Pomona (40 %), dok infekcija serovarom *Icterohaemorrhagiae* nije potvrđena ni u jednom uzorku (Tablica 2). No serovar Pomona je opisan kao najčešći vjerojatni infektivni serovar na području Baranje (39%) u spomenutom istraživanju iz 2010. godine (MODRIĆ i sur., 2010.).

U prethodno navedenom istraživanju u Srbiji najčešći vjerojatno infektivni serovar je pripadao serološkoj skupini Australis (39%), dok je serovar koji pripada serološkoj skupini Pomona bio na drugom mjestu po učestalosti (35%) (OBRENOVIĆ i sur., 2014.).

Dob životinje se uzima kao predisponirajući čimbenik kod leptospiroze u mačaka, tj. dokazano je da su starije životinje češće seropozitivne od mlađih (LARSSON i sur., 1985.) Tijekom ovog istraživanja niti jedna seropozitivna mačka nije bila mlađa od jedne godine (0%). 8 mačaka, od ukupno 34 (23,5%) koje spadaju u drugu kategoriju (1-5 godina), bilo je seropozitivno. 5 pozitivnih od ukupno 14 (35,7%) je spadalo u treću dobnu kategoriju, a u kategoriji >10 godina se nalazilo 5 serološki pozitivnih mačaka od ukupno njih 11 (45,45%). Iako postoji nejednaka distribucija pretraživanih životinja po određenim kategorijama može se jasno vidjeti da udio pozitivnih životinja unutar svake kategorije zaista raste s dobi.

S obzirom na očuvan nagon za lovom, pretpostavlja se da se većina mačaka zarazi kontaktom s inficiranim mišolikim glodavcem (SYKES, 2014.). Istraživanje mogućih rizičnih čimbenika povezanih sa seropozitivnošću u mačaka potvrđuje da su seropozitivne mačke bile češće one mačke kod kojih su vlasnici potvrdili da love i da imaju kontakt s glodavcima (RODRIGUEZ i sur., 2014.). Tijekom ovog istraživanja kod 84,5 % od ukupnog uzorka mačaka (n=84) u protokolima nije postojao podatak je li mačka bila u kontaktu s glodavcima niti ima li afinitet prema lovu. Kod ostalih 17,5 % (13/84) vlasnici su samo dvije mačke okarakterizirale kao „dobre lovce“. Od te dvije mačke obje su bile seropozitivne i iako se statistički značaj nije mogao izračunati Hi kvadrat testom ovaj čimbenik svakako treba smatrati rizičnim.

U nekim je istraživanjima spomenuto da je poliurija i polidipsija bila prvi simptom koji se javio kod seropozitivnih mačaka (ARBOUR i sur., 2012; LUCIANI, 2004.), no tijekom ovog istraživanja poliurija i polidipsija je bila prisutna kod samo jedne serološki pozitivne mačke (p=0,71). Znajući da leptospire oštećuju bubrege i jetru, kod seropozitivnih životinja očekuju se povišeni biokemijski parametri specifični za te organe (ARBOUR i sur., 2012; BEADU-LANGE i sur., 2014; LAPOINTE i sur., 2013.; RODRIGUEZ i sur., 2014.). U ovom istraživanju su se

elektrolitni disbalansi te povišene vrijednosti ureje i jetrenih enzima u krvi češće javljali kod seropozitivnih mačaka u odnosu na seronegativne. Ipak, navedene razlike nisu bile statistički značajne.

Razlog zašto skoro svi rizični čimbenici nisu statistički značajni ili se ne javljaju u očekivanom postotku može biti jer je ukupan uzorak, pa tako i seropozitivan uzorak, bio nedovoljno velik, ali i zbog toga što 85% (17/20) serološki pozitivnih životinja, za vrijeme uzorkovanja krvi, pretpostavljamo, nije bilo u akutnoj infekciji kada očekujemo kliničke znakove. Naime, s obzirom na niske titrove koji su zabilježeni velika je mogućnost da se zapravo radi o rezidualnom titru.

Samo tri seropozitivne mačke u ovom radu imaju titar  $\geq 1:800$  koji se u dijelu dosadašnjih istraživanja dovodi u vezu s mogućom akutnom infekcijom (MIOTTO i sur., 2018.). No treba imati na umu da su spomenuti radovi o leptospirozi kod mačaka kliničke znakove pratili bez obzira na visinu titra iako je u većini radova najveći dokazani titar bio znatno veći od 1:800.

Mačka s najvišim titrom tijekom ovog istraživanja (Pomona 1:1600) bila je ženskog spola te je spadala u dobnu skupinu od jedne do pet godina. Došla je na prvi prijem s anamnezom da je vlasnik primijetio tvorbu ispod repa te je dijagnosticiran prolaps rektuma. Od ostalih navedenih kliničkih znakova mačka je imala hipertermiju i anoreksiju, što se svakako može povezati s postavljenom dijagnozom. Od krvnih parametara pomak je viđen u limfocitima ( $1,38 \times 10^9/L$ ) gdje je zabilježena limfopenija, leukocitima ( $19,7 \times 10^9/L$ ) s dokazom blage leukocitoze te u povećanom broju segmentiranih neutrofila ( $16,94 \times 10^9/L$ ).

Druge dvije mačke su imale titar od 1:800, a vjerojatno infektivni serovar bio je također serovar Pomona.

Mačka broj dva bila je muškog spola te je spadala u dobnu skupinu od jedne do pet godina života. Tijekom kliničkog pregleda bila je letargična i u respiratornom distresu. Na rendgenskom su prikazu viđene promjene na plućima što možemo dovesti u vezu s infekcijom serovarom Pomona koji slične patološke promjene na plućima uz iznimno teške kliničke slike očituje i u pasa (BHARTI i sur., 2003.; HABUŠ i sur., 2020.). Hematološkom pretragom krvi utvrđena je anemija (HCT-25%), leukopenija ( $2 \times 10^9/L$ ), limfopenija ( $1,24 \times 10^9/L$ ) te trombocitopenija (PLT- $44 \times 10^9/L$ ), a biokemijskom pretragom povišenje vrijednosti ureje (24,1 mmol/L), kreatinina (387  $\mu\text{mol/L}$ ) i jetrenih enzima (ALT-249 U/L; ALP-128 U/L; AST-140 U/L). Svi navedeni parametri odgovaraju akutnoj leptospirozi opisanoj kod pasa (GREENE, 2012; GOLDSTEIN i sur., 2006.). Životinja je naposljetku drenirana te je patohistološki nalaz pokazao kroničnu, piogranulomatoznu, ekstenzivnu pleuropneumoniju s bakterijskom kolonizacijom koja nije bila posljedica akutne leptospiroze. Treća mačka, ženka, nije imala kliničke simptome te je došla na sistematski pregled. Svi hematološki i biokemijski parametri bili su unutar referentnih vrijednosti. Ipak, bez obzira na navedeno ne možemo isključiti da se u ove mačke radilo o relativno svježoj infekciji s obzirom na to da su one kod mačaka vrlo često asimptomatske (GREENE, 2012.).

## 6. ZAKLJUČCI

1. U Zagrebu i okolici dokazano je prisustvo specifičnih protutijela u serumu 23,8% mačaka. Utvrđene vjerojatno infektivne serološke skupine bile su Pomona (40%), Australis (25%), Grippytyphosa (10%), Canicola (5%) i Sejroe (5%), dok se u 15% slučajeva vjerojatno infektivna serogrupa nije mogla determinirati.
2. Seropozitivnost je bila češća u mačaka čiji su vlasnici prijavili kontakt sa glodavcima.
3. Udio seropozitivnih životinja povećavao se s dobi.
4. Nije dokazana ni spolna predispozicija ni utjecaj imunosupresije povezane s retrovirusnim bolestima na učestalost infekcija u mačaka.
5. U skupini seropozitivnih mačaka utvrđen je veći udio onih koje su imale povišene vrijednosti ureje, jetrenih enzima, disbalans elektrolita, hipotermiju, hipertermiju, uveitis, povraćanje, dišne i kožne probleme, anoreksiju, hematuriju i proteinuriju te PU/PD, ali razlika nije bila statistički značajna.
6. Potrebno je provesti daljnja istraživanja koja će uključiti veći broj životinja, a kako bismo lakše povezali pojedine kliničke znakove s infekcijom u obzir bi trebalo uzimati one životinje s relativno visokim titrom ili one u kojih je infekcija dokazana molekularnim pretragama urina.

## 7. LITERATURA

1. AGUNLOYE C. A., A. S. NASH (1996): Investigation of possible leptospiral infection in cats in Scotland. *J.Small Anim. Pract.*, 37(3), 126–129.
2. ADLER, B. (2015): *Current Topics in Microbiology and Immunology: Leptospira and Leptospirosis*, Springer.
3. ADLER, B. i A. DE LA PEÑA MOCTEZUMA (2010): *Leptospira and leptospirosis*. *Vet. Microbiol.* 140, 287–296.
4. ARBOUR, J., M.-C. BLAIS, L. CARIOTO, D. SYLVESTRE (2012): Clinical Leptospirosis in Three Cats (2001–2009). *Journal of the American Animal Hospital Association*.
5. AZOCAR-AEDO L., G. MONTI, R. JARA (2014): *Leptospira* spp. in Domestic Cats from Different Environments: Prevalence of Antibodies and Risk Factors Associated with the Seropositivity. *Animals*, 612–626.
6. BALAN TOPIĆ, M., J. HABUŠ, Z. MILAS, E. ĆELJUSKA TOŠEV, Z. ŠTRITOF, N. TURK (2010): Human Leptospirosis in Croatia: current status of epidemiology and clinical characteristics. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 104, 202–206.



7. BARANTON G., D. POSTIC (2006): Trend in leptospirosis epidemiology in France. Sixtysix years of passive serological surveillance from 1920 to 2003. *Int. J. Infect. Dis.* 10, 162-170.
8. BEADU-LANGE C., E. LANGE (2014): Unusual clinical presentation of leptospirosis in a cat. *Rev. Vet. Clin.* 49: 115–122.
9. BHARTI, A.R., J.E. NALLY, J.N. RICALDI, M.A. MATTHIAS, M.M. DIAZ, M.A. LOVETT, P.N. LEVETT, R.H. GILMAN, M.R. WILLIG, E. GOTUZZO, J.M. VINETZ (2003): Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect. Dis.* 3, 757-71.
10. BISCOLA N. P., F. FORNAZARI, E. SAAD, V. B. RICHINI-PEREIRA, M. V. CAMPAGNER, H. LANGONI, B. BARRAVIERA, R. S. FERREIRA (2011): Serological investigation and PCR in detection of pathogenic leptospires in snakes. *Pesq. Vet. Bras.* 31, 806-811.
11. BOURHY, P., S. BREMONT, F. ZININI, C. GIRY, M. PICARDEAU (2011): Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *Journal of clinical microbiology*, 2154–2160.
12. BURTH P., M. YOUNES-IBRAHIM, F.H. GONÇALEZ, E.R. COSTA, M.V. FARIA (1997): Purification and characterization of a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase inhibitor found in an endotoxin of *Leptospira interrogans*. *Infect. Immun.* 65: 1557–1560.

13. CICERONI, L., S. ERMINIA, A. PINTO, P. PIZZOCARO, G. DETTORI, L. FRANZIN, R. LUPIDI, S. MANSUETO, A. MANERA, A. LOLI, L. MARCUCCIO, R. GRILLO, S. CIARROCCHI, M. CINCO (2000): Epidemiological trend of human leptospirosis in Italy between 1994 and 1996. *Eur. J. Epidemiol.* 16, 79-86
14. CVETNIĆ, S. (2008): Leptospiroza. U: *Bakterijske i gljivične bolesti životinja*, Medicinska naklada Zagreb; 336-346.
15. ELLINGHAUSEN, H.C., W. G. MCCULLOUGH (1965): Nutrition of *Leptospira Pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am. J. Vet. Res.* 26, 45-51.
16. FAINE, S., B. ADLER, C. BOLIN, P. PEROLAT (1999): *Leptospira and Leptospirosis*, Second edition, MediSci, Melbourne, Australia.
17. FAISAL, S.M., S. P. MCDONOUGH, Y.-F. CHANG (2012): *Leptospira: Invasion, Pathogenesis, and Persistence. The Pathogenic Spirochetes. Strategies for Evasion of Host Immunity and Persistence*, 143–172.
18. GOLDSTEIN, R.E., R.C. LIN., C.E. LANGSTON, P.V. SCRIVANI, H.N. ERB, S.C. BARR (2006): Influence of infecting serogroup on clinical features of leptospirosis in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 20(3), 489–494.

19. GREENE, C.E. (2012): Leptospirosis. U: Infectious disease of the dog and cat, Fourth edition; Elsevier Saunders, Missouri; 431-446.
20. GREENLEE, J.J., D.P. ALT, C.A. BOLIN (2005): Experimental canine leptospirosis caused by *Leptospira interrogans* serovars pomona and bratislava. American Journal of Veterinary Research 66, 1816-1822.
21. HABUŠ, J., Z. MILAS, Z. ŠTRITOF, V. MOJČEC PERKO, N. TURK (2015): Leptospiroza – bolest prirodnih žarišta. 82. znanstveno-stručni simpozij: Zoonoze. Slavonski Brod, Hrvatska.
22. HABUŠ, J., Z. POLJAK, Z. ŠTRITOF, V. MOJČEC PERKO, Z. MILAS, M. PERHARIĆ, K. MARTINKOVIĆ, S. HAĐINA, V. STEVANOVIĆ, V. STAREŠINA, N. TURK (2020): Prognostic factors for survival of canine patients infected with *Leptospira* spp. Vet. arhiv 90 (2), 111-128.
23. HARTMANN, K., H. EGBERNIK, M.G. PENNISI, A. LLORET, D. ADDIE, S. BELÁK, C. BOUCRAUT-BARLON, T. FRYMUS, T. GRUFFYDD-JONES, M.J. HOISE, H. LUTZ, F. MARSILLO, K. MÖSTL, A.D. RADFORD, E. THIRY, U. TRUYEN, M.C. HORZINEK (2013): *Leptospira* species infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. Journal of feline medicine and surgery, 576–581.

24. HATHAWAY S.C., W.A. ELLIS, T.W. LITTLE, A.E. STEVENS, H.W. FERGUSON (1983): *Leptospira interrogans* serovar hardjo in pigs: a new host-parasite relationship in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 113.153–154.
25. INADA R., I. YUTAKA, H. ROKURO, K. RENJIRO, I. HIROSHI (1915): The etiology, mode of infection, and specific therapy of Well's disease (SPIROCHÆTOSIS ICTEROH/EMORRHAGICA). , From the First Medical Clinic of the Imperial University in Kyushu, Fukuoka. 56-62.
26. JAMSHIDI. S, M. AKHAVI ZADEGAN, S. BOKAIE ,N. MAAZI, A. GHORBAN ALI (2009): Serologic study of feline leptospirosis in Tehran, Iran. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.
27. JANSEN A., I. SCHÖNEBERG, C. FRANK, K. ALPERS, T. SCHNEIDER, K. STARK (2005): Leptospirosis in Germany 1962–2003. *Emerg Infect Dis.* 11: 1048– 1054.
28. KO A.I., C. GOARANT, M. PICARDEAU (2009): *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Rev Microbiol.* Nature Rev Microbiol. 7, pp. 736-747.
29. LAPOINTE, C., I. PLAMONDON, M. DUNN (2013): Feline leptospirosis serosurvey from a Quebec referral hospital. *Can Vet J,* 497–499.

30. LARSSON C.E., C.A. SANTA ROSA, M.H. LARSSON, E.H. BIRGEL, W.R. FERNANDES, G.V. PAIM (1985): Laboratory and clinical features of experimental feline leptospirosis. *Int J Zoonoses*.
31. LEVETT, P. N. (2001): Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 296–326.
32. LEHTLA, A., K. MUST, B. LASSEN, T. ORRO, T., JOKELAINEN, A. VILTROP (2020): *Leptospira* spp. in Cats in Estonia: Seroprevalence and Risk Factors for Seropositivity. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*.
33. LUCIANI, O. (2004): Receptivite et sensibilite du chat aux leptospires./Doktorska disertacija. Ecole Nationale Veterinaire de Nantes, France.
34. MEDEIROSFDA, R., A. SPICHLER, D.A. ATHANAZIO (2010): Leptospirosis-associated disturbances of blood vessels, lungs and hemostasis. *Acta Tropica* 115, 155-162.
35. MERTENS, W.K. (1938): Over het voorkomen van *Leptospira icterohaemorrhagiae* bij katten. *Ned. Indische Bl. v. Diergeneesk*, 78-79.
36. MILLÁN, J., M.G. CANDELA, J.V. LÓPEZ-BAO, M. PEREIRA, M.A. JIMÉNEZ, L. LEÓN-VIZCAÍNO (2009): Leptospirosis in wild and domestic carnivores in natural areas in Andalusia, Spain. *Vector borne and zoonotic diseases* (Larchmont, N.Y.), 549–554.

37. MILAS, Z. (2012): Leptospiroza. U: Veterinarski priručnik, Medicinska naklada, Zagreb. 2516-2523 str.
38. MIOTTO, B.A., B.F. TOZZI, M. PANTEADO, A.G. GUILLOUX, L. ZANOLLI MORENO, M.B. HEINEMANN, A.M. MORENO, W. LILENBAUM, M. KURIBAYASHI HAGIWARA (2018): Diagnosis of acute canine leptospirosis using multiple laboratory tests and characterization of the isolated strains. BMC Vet. Res. 14,222.
39. MODRIĆ, Z. (1974): Experimental leptospirosis in the cat. Folia fac. Med. 12, suppl. Bratislava, 257-262.
40. MODRIĆ, Z. (1978): Prirodna i eksperimentalna leptospiroza u mačke. Vet. arhiv 48, 147-156.
41. MODRIĆ, Z., B. KATALINOĆ, N. KNEŽEVIĆ, K. MATANOVIĆ (2010): Istraživanja leptospiroze u domaće mačke (*Felis domestica* Briss.) u Hrvatskoj. Veterinarska stanica : znanstveno-stručni veterinarski časopis, 563-566.
42. MURILLO, A., M. GORIS, A. AHMED, R. CUENCA, J. PASTOR (2020): Leptospirosis in cats: Current literature review to guide diagnosis and management. Journal of feline medicine and surgery, 216–228.

43. MYLONAKIS, M.E., E. BOURTZI-HATZOPOULOU, A.F. KOUTINAS, E. PETRIDOU, M.N. SARIDOMICHELAKIS, L. LEONTIDES, A. SIOCHU (2005): Leptospiral seroepidemiology in a feline hospital population in Greece. *The Veterinary record*, 615–616.
44. OBRENOVIĆ S., S. RADOJČIĆ, N. STEVIĆ, D. BOGUNOVIĆ, S. VAKANJAC, M. VALČIĆ (2014): Seroprevalence of cat leptospirosis in Belgrade (Serbia). *Acta Vet. Brno*; 64; 510-518.
45. OJEDA, J., M. SALGADO, C. ENCINA, C. SANTAMARIA, G. MONTI (2018): Evidence of interspecies transmission of pathogenic *Leptospira* between livestock and a domestic cat dwelling in a dairy cattle farm. *The Journal of veterinary medical science*, 1305–1308.
46. PICARDEAU M. (2017): Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita?, *Nature Reviews Microbiology*, 297–307.
47. RODRIGUEZ J., C. LAPOINTE, J. ARSENAULT, L.CARIOTO, J. HARELLE (2014): Serologic and urinary PCR survey of leptospirosis in healthy cats and in cats with kidney disease. *J. Vet. Intern. Med.* 2014; 284–293.
48. ROE, W. D., L. E. ROGERS, B. D. GARTRELL, B. L. CHILVERS, P. J. DUIGNAN (2010): Serologic Evaluation of New Zealand Sea Lions for Exposure to *Brucella* and *Leptospira* spp. *J. Wildl. Dis.* 46, 1295–1299.

49. SCHULLER, S., T. FRANCEY, K. HARTMANN, M. HUGONNARD, B. KOHN, J.E. NALLY, J. SYEKS (2015): European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*. 159–179.
50. SHOPET, R., R.B. MARSHALL (1980): An experimentally induced predator chain transmission of *Leptospira ballum* from mice to cats. *Br Vet J*; 136: 265–270.
51. STIMONS, A.M. (1907): Note on an organism found in yellow-fever tissue. *U : Pub Health Rep (Washington)* 22:541.
52. SYKES, J.E. (2014): *Leptospirosis*. U:Canine and feline infectious disease, Elsevier Saunders, Missouri; 474-482.
53. TALEBKHAN GAROUSSI, M., M, MEHRAVARAN, G. ABDOLLAHPOUR, J. KHOSHNEGAH (2015): Seroprevalence of leptospiral infection in feline population in urban and dairy cattle herds in Mashhad, Iran. *Veterinary research forum : an international quarterly journal*, 301–304.
54. TRUEBA, G., S. ZAPATA, K. MADRID, P. CULLEN, D. HAAKE (2004): Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int. Microbiol.* 7, 35–40.



55. TURK, N. (2015): Leptospiroza-zaboravljena bolest prirodnih žarišta. Simpozij Klasične bakterijske i parazitarne bolesti-što nas očekuje?, 22. listopada, Zagreb, Hrvatska.
56. WEIL, A. (1886): Ueber einer eigenhuemliche, mit Milztumor, Icterus un Nephritis einhergehende, acute Infektionskrankheit. Deutsch Arch Klin Med 39:209.
57. WEIS, S., A. RETTINGER, M. BERGMANN, J.R. LLEWELLYN, N. PANTCHEV, R.K. STRAUBINGER, K. HARTMANN (2017): Detection of Leptospira DNA in urine and presence of specific antibodies in outdoor cats in Germany. Journal of feline medicine and surgery 19, 470–476.
58. ZAHARIJA, I., J. FALIŠEVAC, B. BORČIĆ, Z. MODRIĆ (1982): Leptospiroze: 30-godišnje istraživanje i izučavanje u SR Hrvatskoj. Zagreb: JUMENA.

## 8. SAŽETAK

Leptospiroza je zarazna bolest mnogih domaćih i divljih životinja te čovjeka uzrokovana patogenim baktirijama iz roda *Leptospira*. Podatci o prevalenciji leptospiroze u mačaka, kao i vjerojatno infektivnim serovarima, kliničkim znakovima povezanim s infekcijom te mogućim rizičnim čimbenicima povezanim uz infekciju u Republici Hrvatskoj, ali i u svijetu, relativno su oskudni. Kako bismo potvrdili našu pretpostavku da seroprevalencija leptospiroze u mačaka unutar endemskih područja Republike Hrvatske nije zanemariva, pretražili smo 84 arhivirana uzoraka seruma mačaka. Serumi su prikupljeni tijekom kliničke obrade pacijenata od 2018. do 2021. godine i pretraženi metodom mikroskopske aglutinacije. Prisustvo specifičnih protutijela dokazano je u serumu 20/84 (23,8%) mačaka. Utvrđene vjerojatno infektivne serološke skupine bile su Pomona (40%), Australis (25%), Grippotyphosa (10%), Canicola (5%) i Sejroe (5%), dok se u 15% slučajeva vjerojatno infektivna serogrupa nije mogla determinirati. Potvrđeno je da seropozitivnost raste s dobi životinje i da je povezana s vještinom lova, odnosno direktnim kontaktom s glodavcima. Nije dokazana spolna predispozicija niti utjecaj imunosupresije povezane sa retrovirusnim bolestima na učestalost infekcija u mačaka. Također, nismo uspjeli povezati seroreaktivnost u mačaka s očitovanjem određenih kliničkih znakova. Potrebno je provesti daljnja istraživanja koja će uključiti veći broj životinja, a moguće kliničko očitovanje trebalo bi procijenjivati samo kod onih životinja s pretpostavljenom akutnom infekcijom ili u onih kod kojih je infekcija dokazana molekularnim pretragama urina.

**KLJUČNE RIJEČI:** *Leptospira*, seroprevalencija, mačka, MAT

## 9. SUMMARY

Ema Muselin

### **Serological study of feline leptospirosis**

Leptospirosis is a zoonotic bacterial disease caused by infection with pathogenic species of genus *Leptospira*. With worldwide distribution, it is a disease affecting most mammalian species.

Due to the fact that clinical signs are rare in cats, data on prevalence, presumptive infective serovars, risk factors and clinical signs associated with infection are relatively scarce.

In order to confirm our hypothesis that the seroprevalence of leptospirosis in cats within endemic areas of the Republic of Croatia is not negligible, 84 archived samples of serum of feline sera were tested by Microscopic Agglutination Test (MAT). Overall, seroprevalence was 23,8% (20/84). The most common presumptive infective serogroup was Pomona (40%), followed by Australis (25%), Grippotyphosa (10%), Canicola (5%) and Sejroe (5%). It has been confirmed that seropositivity increases with the age of the animal and is associated with hunting skills, ie direct contact with rodents. Sex or the effect of retroviral-related immunosuppression on the incidence of infections in cats was not demonstrated, and we have not been able to link seroreactivity in cats to the manifestation of certain clinical signs.

All things considered, further research involving a much larger sample is needed. Clinical signs associated with the infection should be assessed only in those animals with a presumed acute infection or those in which the infection has been detected by molecular urine tests.

**KEY WORDS:** *Leptospira*, seroprevalance, cats, MAT

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 25. siječnja 1997. u Splitu. Nakon završene OŠ prof. Filipa Lukasa u Kaštel Starom upisala sam IV. gimnaziju Marka Marulića u Splitu. Veterinarski fakultet u Zagrebu sam upisala 2015. godine te svaku godinu upisujem kao redovna studentica.

Ljeto između treće i četvrte godine sam volontirala u Ambulanti grada Solina gdje se prvi put susrećem s praktičnim dijelom struke.

Zadnje dvije godine studija sam volontirala na Klinici za zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta te stekla dodatno znanje i iskustvo.

Preko Erasmus+ programa sam dva mjeseca provela u rehabilitacijskom centru za tuljane "Zeehondencentrum" u Nizozemskoj gdje sam naučila kako raditi s divljim životinjama i u novom okruženju. Prisustvovala sam također 8. međunarodnom kongresu "Veterinarska znanost i struka" održanom na Veterinarskom fakultetu.

Zadnju godinu studija sam radila diplomski rad u Laboratoriju za leptospire Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti te stekla nove vještine i osnovno znanje o dijagnostici leptospiroze.