

Potencijal domaće i divlje mačke kao rezervoara bakterije *Leptospira* spp.

Čagljević, Leonarda

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:178:999125>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI
STUDIJ *VETERINARSKA MEDICINA*

DIPLOMSKI RAD

Leonarda Čagljević

Potencijal domaće i divlje mačke kao rezervoara bakterije *Leptospira* spp.

Zagreb, 2024.

Leonarda Čagljević

Odjel za veterinarsko javno zdravstvo i sigurnost hrane

Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom,

Predstojnik: prof. dr. sc. Vilim Starešina

Mentor: prof. dr. sc. Nenad Turk

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Vilim Starešina
2. Izv. prof. dr. sc. Zrinka Štritof
3. Izv. prof. dr. Josipa Habuš
4. Izv. prof. dr. Suzana Hađina (zamjena)

Rad sadržava 39 stranica, 9 slika, 10 tablica, 35 literaturnih navoda.

ZAHVALA

Veliko hvala mojim mentorima prof. dr. sc. Nenadu Turku, asistentici dr. med. vet. Ivi Benvin i dr. sc. Vesni Mojčec Perko, dipl. ing. mol. biol na vođenom mentorstvu, suradljivosti, trudu te iznimnoj angažiranosti kroz cijeli proces izrade ovog diplomskog rada.

Zahvala prof. dr. sc. Magdi Sindičić na ustupanju bubrega divljih mačaka.

Zahvaljujem se svojoj obitelji, zaručniku i kolegama na podršci tijekom studiranja.

POPIS KRATICA

5' i 3' - nekodirajući krajevi molekule DNK

B5 – pufer *NucleoSpin® Tissue* komercijalnog *kit*-a za izolaciju DNA

BE – pufer *NucleoSpin® Tissue* komercijalnog *kit*-a za izolaciju DNA

BW – pufer *NucleoSpin® Tissue* komercijalnog *kit*-a za izolaciju DNA

Ct – točke križanja PCR analize (eng. *cycle threshold*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*)

dATP – deoksiadenozin trifosfat (eng. *deoxyadenosine triphosphate*)

dCTP – deoksicitidin trifosfat (eng. *deoxycytidine triphosphate*)

dGTP – deoksigvanozin trifosfat (eng. *deoxyguanosine triphosphate*)

dNTP - deoksinukleotid trifosfati (eng. *deoxynucleotide triphosphate*)

dTTP – deoksitimidin trifosfat (eng. *thymidine triphosphate*)

EU – Europska unija

FIV – virus mačje imunodeficijencije (eng. *Feline immunodeficiency virus*)

FeLV – virus mačje leukemije (eng. *Feline leukemia virus*)

FIP – virus mačjeg peritonitisa (eng. *Feline infectious peritonitis*)

FCV – mačji kalicivirus (eng. *Feline calicivirus*)

FRP – *Specific Primer - Probe Mix*

IC kit – *Internal control kit*

IgG – imunoglobulin G

IgM – imunoglobulin M

IL-6 – interleukin 6

IU – internacionalna jedinica (eng. *international units*)

LEPTOlab – Laboratorij za leptospire Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

LipL32 – gen koji kodira lipoprotein vanjske membrane patogenih leptospira

LLOD – donja granica detekcije (eng. *lower limit of detection*)

LPHS - leptospirozni plućni hemoragijski sindrom

LPS – lipopolisaharid (eng. *lipopolysaccharide*)

MAT - mikroskopska aglutinacija

PCR - lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*)

RH – Republika Hrvatska

RPM – broj okretaja u minuti (eng. *revolutions per minute*)

SABA hemo – izolat pozitivne kontrole *Leptospire spp.*

T1 – pufer *NucleoSpin® Tissue* komercijalnog *kit*-a za izolaciju DNA

TLR-2 – *toll-like receptor-2*

TNF- α – čimbenik nekroze tumora alfa

TNR – *Trap-neuture-retrurn*

UV – ultraljubičasto (eng. *ultraviolet*)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA.....	3
2.1. Kratka povijest leptospiroze.....	3
2.2. Etiologija leptospiroze i svojstva bakterija <i>Leptospira</i> spp.....	4
2.3. Epizootiologija, patogenezna i klinička slika leptospiroze.....	6
2.4. Divlje mačke – prehrana i povezanost bakterije <i>Leptospira</i> spp.....	12
2.5. Domaće mačke – specifičnosti epizootiologije i infekcije s <i>Leptospira</i> spp.....	14
3. MATERIJAL I METODE.....	17
4. REZULTATI.....	25
5. RASPRAVA.....	29
6. ZAKLJUČCI.....	31
7. LITERATURA.....	32
8. SAŽETAK.....	37
9. SUMMARY.....	38
10. ŽIVOTOPIS.....	39

1. UVOD

Leptospiroza je re-emergentna zoonoza koja se u životinja i ljudi očituje različitim kliničkim oblicima, od blagih subkliničkih infekcija do teških septikemijskih oblika s visokom smrtnošću (ZAHARIJA i sur., 1982.). Leptospiroza, zoonoza rasprostranjena diljem svijeta zahvaća populaciju gotovo svih sisavaca. Bolest se u pravilu očituje kao akutna, septikemijska bolest domaćih i divljih životinja te ljudi, a posebna pozornost pridaje se inficiranim životinjama koje izlučuju bakterije *Leptospira* spp. urinom, pri čemu kontaminiraju okoliš čineći ga sekundarnim izvorom infekcije za druge životinje i ljude. Stoga je praćenje prevalencije i kontrola leptospiroze u populaciji domaćih i divljih životinja izrazito važna zbog javnozdravstvenog aspekta (SCHULLER i sur., 2015.).

Republika Hrvatska glavno je endemsko žarište Europe i trinaesta država u svijetu po učestalosti humane leptospiroze što je povezano s činjenicom leptospiroze kao bolesti prirodnih žarišta, koja sezonski prati kulminaciju populacije glodavaca (BALEN TOPIĆ i sur., 2010.). Bolesti prirodnih žarišta zarazne su bolesti koje imaju više različitih čimbenika koji pridonose preživljavanju uzročnika, kao što su u slučaju leptospiroze u RH rezervoari, klimatski uvjeti i uvjeti tla, ekološke niše i biocenoza – veliku površinu zemlje prekrivaju šume i poplavna područja. U RH glavni izvor infekcije su mišoliki glodavci, štakori i voluharice te je njihov potencijal kao rezervoara leptospiroze odavno prepoznat. Leptospiroza je svrstana i u skupinu re-emergentnih zoonoza, odnosno u zarazne bolesti kod kojih je porast učestalosti posljednjih nekoliko godina posljedica promjene virulencije, puteva ili načina širenja uzročnika ili pak pojave novog kliničkog oblika bolesti, što je bio jedan od razloga provođenja navedenog istraživanja.

Hipotezu o mačkama kao rezervoarima leptospiroze razmatraju različite lilterature, pa tako postoje serološki potvrđeni dokazi infekcije domaćih mačaka bakterijom *Leptospira* spp., ali na temelju rijetkih izvješća o očitovanju kliničke slike, mačke se smatraju otpornima na bolesti u usporedbi s drugim životinjskim vrstama.

Iako se mačke u pravilu ne smatraju značajnim čimbenikom u epizootiologiji leptospiroze, istraživači su zbog stalnog dodira mačaka s glodavcima, glavnim rezervoarima leptospira, nastojali spoznati o leptospirozi mačke, njezinoj primljivosti za infekciju, te njezinoj ulozi u širenju leptospiroze.

Različita istraživanja utvrdila su prisutnost specifičnih protutijela nastalih po infekciji sa serovarima Australis, Autumnalis, Ballum, Bratislava, Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona i Saxkoebing (MARKOVICH i sur., 2012.; RODRIGUEZ i sur., 2014.; WEIS i sur., 2017.; SPRIBLER i sur., 2019.). Pokusnim infekcijama utvrđeni su subklinički oblici ili pojava blažih kliničkih oblika uz porast tjelesne temperature i pojavu proljeva (ANDRÉ-FONTAINE, 2006.). Literatura opisuje i prirodne infekcije koje su se očitovale akutnim glomerulonefritisom uz poliuriju i polidipsiju, letargijom i anoreksijom (ARBOUR i sur., 2012.). Istražuje se i uzročno-posljedična veza između infekcije leptospirama i kronične bubrežne insuficijencije (HARTMAN i sur., 2020.).

Zbog dokaza patogenih sojeva leptospira u urinu naizgled zdravih mačaka uz pomoć lančane reakcije polimerazom, PCR-a i naciepljivanjem bakterijskih kultura, pretpostavlja se da mačke uistinu mogu biti rezervoari bolesti. S druge pak strane, u većini istraživanja leptospirurija nije potvrđena u slobodno živućih odnosno uličnih mačaka, za koje se pretpostavlja da su bile u kontaktu s bakterijom (SYKES i sur., 2023.).

Ovo istraživanje usmjereno je na otkrivanje potencijala domaćih i divljih mačaka kao rezervoara bakterije *Leptospira* spp. Cilj provedenog istraživanja bio je ustanoviti da li u određenim okolnostima domaće i divlje mačke mogu nositi leptospire u bubregu i posljedično izlučivati leptospire urinom i mogu li u tom slučaju predstavljati rezervoare leptospiroze. Drugi je cilj bio ustanoviti ima li razlike u prevalenciji infekcije leptospirama u domaćih i divljih mačaka s obzirom na različit način života i različiti okoliš u kojem obitavaju.

Očekivani znanstveni doprinos ovoga istraživanja je stjecanje boljeg uvida o ulozi mačke u epidemio/epizootiološkom ciklusu leptospiroze.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Kratka povijest leptospiroze

Leptospiroza je kao bolest po prvi puta opisana u Njemačkoj, 1886. godine. Jedan od prvih naziva leptospiroze bila je Weilova bolest, nazvana prema liječniku Adolfu Weilu. Leptospiroza je u početku bila opisana kao zarazna bolest kod koje dolazi do nefritisa, povećanja slezene i žutice (tzv. *zarazni ikterus*) (WEIL, 1886.).

Leptospiroza se u kliničkom smislu može podijeliti na ikterični i neikterični oblik bolesti. Ikterična faza leptospiroze prepoznata je kao Weilova bolest, a tako se prema nekim literaturama naziva i danas. Weilova bolest obilježena je težim infekcijama, traje od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci a manifestacija bolesti uključuje vrućicu, zatajenje bubrega, žuticu, krvarenje i respiratorni distres. Ikterična faza također može zahvatiti srce, središnji živčani sustav i mišiće. Anikterični sindrom je samoograničavajuća bolest nespecifičnih simptoma nalik gripi. Bolest može potrajati do nekoliko dana i rijetko je fatalna. Prema istraživanjima predstavlja približno 90% svih dokumentiranih slučajeva leptospiroze (WANG i sur., 2022.).

Uzročnika prethodno spomenute Weilove bolesti, *Spirochaeta icterhaemorrhagiae*, otkrili su Ryokichi Inada i Yutaka Ido u Japanu, 1915., a već iduće godine utvrdili da je riječ o zoonozi (INADA i IDO, 1915.). Iste godine su njemački istraživači Uhlenhuth i Fromme biološkim pokusom dokazali spiralnu bakteriju *Spirochaeta icterogenes* (UHLENHUTH i FROMME, 1915.).

Leptospiroza u RH prvi je puta otkirvena u psa 1926. godine. (BABIĆ, 1927.), a zatim i u ljudi 1935. godine (ANTUNOVIĆ-MIKAČIĆ, 1935).

2.2. Etiologija leptospiroze i svojstva bakterija *Leptospira* spp.

Bakterije *Leptospira* spp. pripadaju redu *Spirochetales* i porodici *Leptospiraceae*. One su tanke, spiralne bakterije koje su u prošlosti bile klasificirane na osnovi antigenskih obilježja u dvije vrste; *L. interrogans* koja je obuhvaćala sve patogene leptospire i *L. biflexa* koja je obuhvaćala sve saprofitne bakterije, s više od 250 patogenih serovara kao osnovnim taksonom (ADLER i DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010.).

Serološka tipizacija patogenih leptospira u velikom broju različitih serovara temeljila se na vanjskim lipopolisaharidnih antigenima. Serovari su prema tome svrstavani u antigenski povezane serološke skupine, a zbog ponavljajućih serovara koji su se mogli utvrditi u više različitih vrsta, svaka serološka skupina sadržavala je serovar istog imena (npr. serovar Grippotyphosa, serološka skupina Grippotyphosa).

Prema današnjoj klasifikaciji, leptospire se na temelju molekularnih metoda odnosno sastava sekvence njihove DNA grupiraju u patogene i saprofitske podvrste. Šezdeset i osam poznatih vrsta leptospira grupirano je u kompleks koje zajedničkim imenom nazivamo leptospire u širem smislu (*L. interrogans* sensu lato), koje se zatim dijele na patogene i intermedijarno patogene leptospire te saprofitske vrste (Tablica 1). Patogene leptospire mogu se još podijeliti na leptospire visoke virulencije i leptospire niske virulentnosti (SYKES i sur., 2023.).

Leptospire su pokretne, gram negativne aerobne i spororastuće bakterije čija optimalna temperatura rasta varira od 30 °C. Uglavnom su široke 0,1 do 0,15 µm a dugačke 6 do 20 µm; izdužene su, a od ostalih spiroheta morfološki se razlikuju po tome što imaju „upitnik“ ili završetak u obliku kuke (Slika 1). Dugo vremena preživljavaju u vlažnom mediju i tlu, a pokreću se pomoću periplazmatskih flagela. Patogenost ovih bakterija temelji se na djelovanju njihovih enzima: hijaluronidaze, oksidaze, katalaze, transaminaze i lipaze u organizmu domaćina, a neke leptospire imaju i hemolitičko djelovanje (RISTOW i sur., 2008.).



Slika 1. Prikaz bakterije *Leptospira* spp.; izvor:

<https://sciencephotogallery.com/featured/leptospira-bacterium-thom-leach-science-photo-library.html>

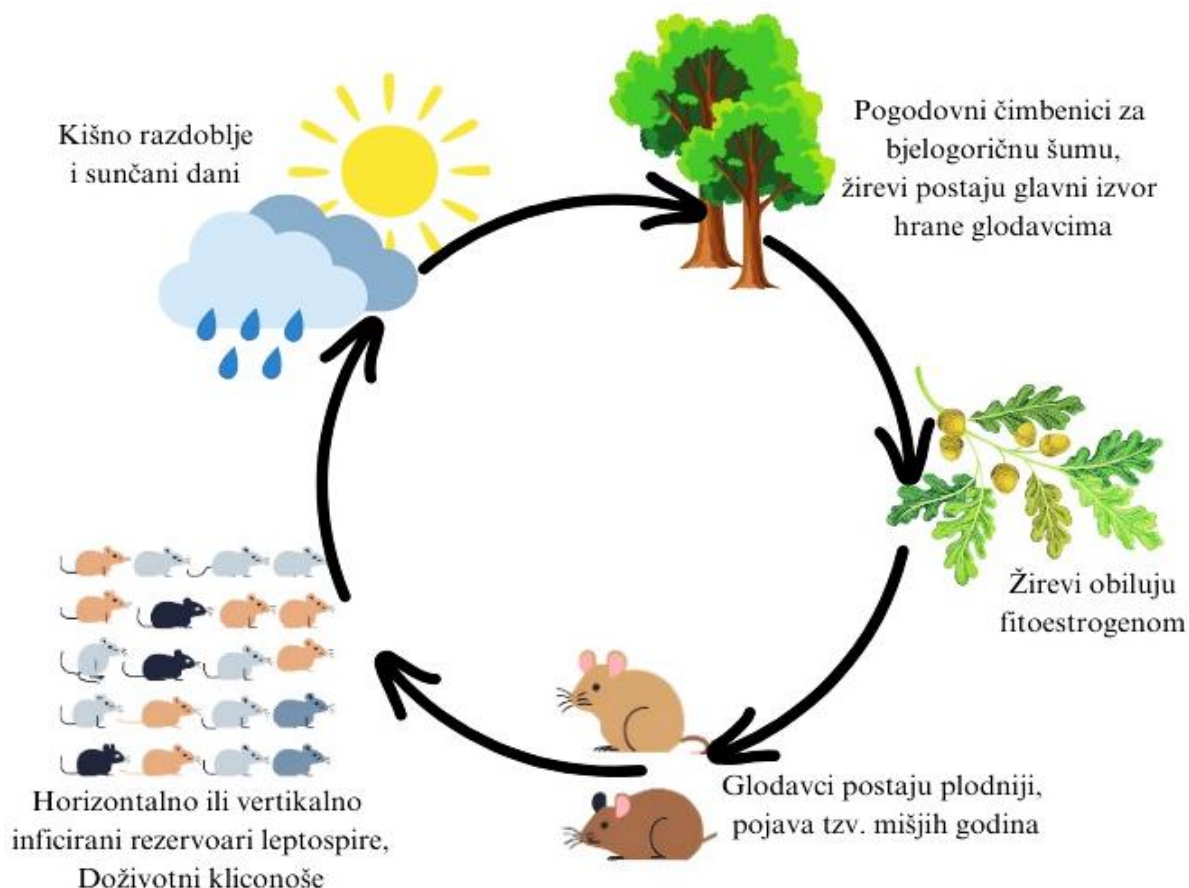
Tablica 1. Genomska klasifikacija bakterija *Leptospira* spp.

PATOGENE LEPTOSPIRE	INTERMEDIJARNO PATOGENE LEPTOSPIRE	SAPROFITSKE LEPTOSPIRE
<i>L. interrogans</i>	<i>L. inadai</i>	<i>L. biflexa</i>
<i>L. kirschneri</i>	<i>L. broomii</i>	<i>L. wolbachii</i>
<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. fainei</i>	<i>L. meyeri</i>
<i>L. santarosai</i>	<i>L. wolffii</i>	<i>L. terpstrae</i> (genomospecies 3)
<i>L. noguchii</i>	<i>L. licerasiae</i>	<i>L. vanthielii</i> (genomospecies 4)
<i>L. weilii</i>		<i>L. yanagawae</i> (genomospecies 5)
<i>L. alexanderi</i>		<i>L. vanthielli</i>
<i>L. alstonii</i> (genomospecies 1)		
<i>L. kmetyi</i>		
<i>L. mayottensis</i>		

2.3. Epizootiologija, patogeneza i klinička slika leptospiroze

Iako se mačke u pravilu ne smatraju ključnim faktorom u epizootiologiji leptospiroze, istraživanja su usmjerena na primljivost mačaka na infekciju i njihovu ulogu u širenju leptospiroze (FAINE i sur, 1999.).

Kao što je već spomenuto, glavni rezervoar leptospiroze upravo su glodavci (Slika 2), a prema svjetskim istraživanjima usmjerenim na humanu leptospirozu, mnoge divlje i domaće životinje mogu poslužiti kao rezervoarski domaćini. Smeđi štakor, *Rattus norvegicus* najvažniji je izvor infekcije u ljudi (HAAKE i LEVETT, 2015.). Pošto u RH značajnu ulogu rezervoara imaju mišoliki glodavci, kućni miš (*Mus musculus*) vezan je uz serovar Sejroe, obična poljska voluharica (*Microtus arvalis*) povezuje se primarno uz serovar Grippytyphosa, crnoprugasti poljski miš (*Apodemus agrarius*) uz Pomona, a žutovrati poljski miš (*Apodemus flavicollis*) uz serovar Saxkoebing (ZAHARIJA i sur., 1982.).



Slika 2. Epizootiologija leptospiroze, autorska slika.

Infekcije *Leptospirum* spp. nastaju kada su sluznice ili oštećena kožna barijera direktno izložene patogenim sojevima koji se izlučuju iz bubrežnih tubula zaraženih rezervoara (SYKES i sur., 2023.). Iako je primarni izvor zaraze urin odnosno tkivne tekućine rezervoara, potvrđeni su slučajevi u kojima se leptospira prenosila čak i nakon kontakta s kontaminiranim tlom, vegetacijom i vodom (WANG i sur., 2022.).

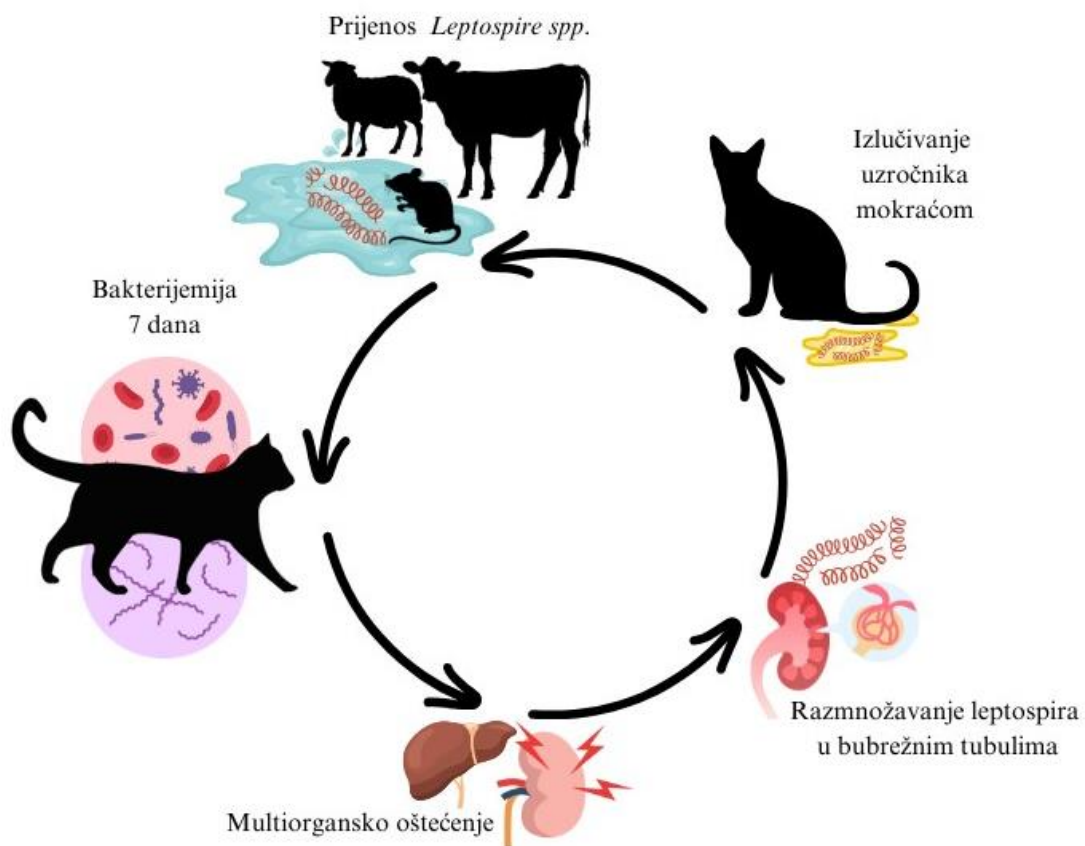
Leptospiroza je specifična po tome što za pojedine serovare postoje poznati primarni, odnosno definitivni domaćini. Tako su psi su domaćini za serovar Canicola; goveda za Hardjo; svinje za serovare Pomona i Bratislava; a glodavci za Icterohaemorrhagiae i Copenhageni. Upravo navedene vrste u većoj mjeri doprinose širenju leptospiroze u okolišu u usporedbi sa slučajnim ili slijepim (*dead-end host*) domaćinima, najčešće ljudima. Najčešće dokazani serovari leptospira u mačaka na području EU pripadaju serološkim skupinama Australis, Autumnalis, Ballum, Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona i Sejroe, a potvrđeni su testom mikroskopske aglutinacije, MAT-om; dijagnostičkom metodom koja se provodi na temelju prevalencije protutijela IgG i IgM koja aglutiniraju živi antigen i smatra se zlatnim standardom u dijagnostici leptospiroze (MURILLO i sur., 2020.).

Mačja je leptospiroza prvi put opisana 1972. godine, a klinička slika bolesti izrazito varira zbog potencijala mačaka kao rezervoara bolesti. Mačke u tom slučaju mogu prenositi bolest, a da pritom ne razviju kliničku sliku leptospiroze (MURILLO i sur., 2020.). u RH leptospiroza mačaka sustavno je istraživana od 1974. godine, od kada su po prvi puta detektirana protutijela u serumu sto dvanaest mačaka u okolici Zagreba, a iz bubrega jedne mačke izoliran je serovar Australis (MODRIĆ, 1978.). Prema novijim istraživanjima leptospiroze u domaćih mačaka, iz bubrega mačaka izdvojeno je ukupno pet sojeva leptospira (dva soja Pomona i po jedan soj Australis, Icterohaemorrhagiae i Bataviae). Postotak mačjih seruma s protutijelima za leptospire na području Zagreba bio je 21, 42%, u Baranji 28, 09%, u Slavoniji 30, 41% i na području Siska 30% (MODRIĆ i sur., 2010.).

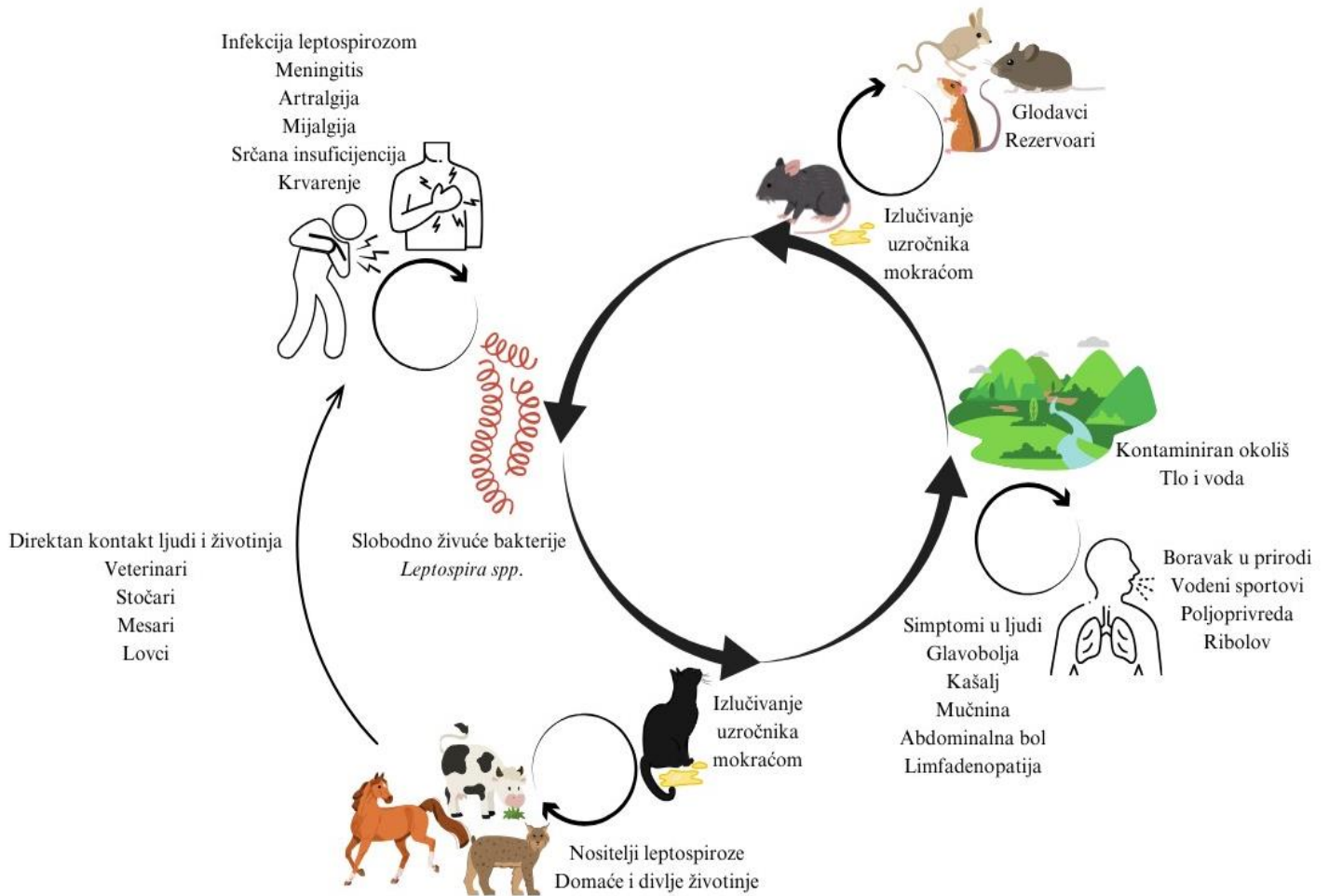
Infekcije s patogenim bakterijama *Leptospira* spp. nastaju prilikom oštećenja sluznice ili kože domaćina koji je izložen patogenim sojevima. Primarno zahvaćeni organi djelovanjem leptospira u većine sisavaca su bubrezi. Bakterije iz krvotoka infiltracijom preko bubrežnih tubula i intersticija dovode do očitovanja tipične kliničke slike leptospiroze (Slika 3). Svojom sposobnošću zaobilaženja i izbjegavanja aktivacije imunosnog sustava domaćina preživljavaju u organizmu dulje vrijeme.

Najpoznatiji patogeni mehanizam oštećenja bubrežnih tubula je izravno vezanje bakterijskog proteina vanjske membrane LipL32 na toll-like receptor-2 (TLR-2) u epitelnim stanicama bubrežnih tubula, što posljedično dovodi do aktivacije intracelularnih upalnih medijatora i samog početka upale. Uz to, prilikom vezanja bakterijskog antigena na receptore, organizam domaćina odgovara proizvodnjom čimbenika nekroze tumora alfa (TNF- α) i aktivacijom nuklearnog faktora *kappa*, što na kraju rezultira akutnom i kroničnom ozljedom bubrega povezanom s leptospirozom (CHOU i sur., 2023.).

Leptospiroza se najčešće ispoljava u kroničnom obliku, osim kod pasa. Rekonvalescentno kliconoštvo koje traje i do nekoliko mjeseci nakon preboljenja bolesti, uz veliku divergenciju kliničke slike – od subkliničke infekcije do teškog ikteričnog sindroma s prestankom funkcije bubrega i visokom smrtnošću svrstava bolest u vrlo opasnu zoonozu. Izvori zaraze su dakle različite vrste domaćih i divljih životinja koje luče leptospire urinom (leptospirurija) dugo vremena nakon ozdravljenja, a leptospire tako dospijevanju u tlo i vodu i time nastaju novi, sekundarni izvori infekcija (ZAHARIJA i sur., 1982.).



Slika 3. Mehanizam patogeneze leptospiroze u mačaka, autorska slika.



Slika 4. Prijenos leptospiroze kao zoonoze, autorska slika.

Izloženost ljudi leptospirozi u prošlosti je prvenstveno bila vezana uz vodene sportove, ali u novije vrijeme Sjedinjene Američke Države bilježe porast profesionalne izloženosti leptospirama. Različita zanimanja mogu biti izložena povećanom riziku obolijevanja, kao npr. poljoprivredni radnici, veterinari, farmeri, mesari, lovci, ali i sami vlasnici ljubimaca (Slika 4). Nakon izlučivanja leptospira mokraćom zaražene životinje, bakterije u vodenim površinama mogu preživjeti i do šesnaest dana, a tlu gotovo dvadeset i četiri dana. U ljudi i životinja također je zabilježen placentarni prijenos koji dovode do pobačaja u prve dvije trećine graviditeta (WANG i sur., 2022.).

Primarne lezije uzrokovane leptospirama nastaju nakon diseminacije krvotokom na endotelu krvnih žila, što dovodi do lokalizirane ishemije. Ishemija pak dovodi do nekroze različitih zahvaćenih organskih sustava, u mačaka konkretno nekroze bubrežnih tubula. Bubrežna kolonizacija leptospirama javlja kod većine inficiranih životinja zbog toga što su upravo bubrežni tubuli mjesto razmnožavanja leptospira. Umnožavanje leptospira u organizmu domaćina aktivira kaskadu reakcija uz oslobađanje citokina i upalnih medijatora, što posljedično dovodi do najčešćeg kliničkog simptoma – nefritisa. Kronicitet ove bolesti uzrokuje kronično zatajenje bubrega, stanje opisano u mačaka s leptospirozom. Deset dana nakon infekcije, leptospire ulaze u tubularni lumen i kroz određeno vrijeme, koje može potrajati i do nekoliko mjeseci, izlučuju se mokraćom iz domaćina (rekonvalescentno kliconoštvo). Duljina izlučivanja bakterija *Leptospira* spp. putem mokraće varira između životinjskih vrsta te ovisi o serovaru kojim je životinja inficira (MURILLO i sur., 2020.).

Jednom kada leptospire dođu do tubularnog lumena, one koloniziraju tzv. *četkastu granicu* proksimalnog bubrežnog tubularnog epitela, iz kojeg lučenje bakterija urinom može biti izrazito dugotrajno, pritom bez značajnog pogoršanja kliničke slike domaćina. Upravo se iz tog razloga infekcija domaćina leptospirama, odnosno rezervoara može se smatrati komenzalskim odnosom (HAAKE i LEVETT, 2015.).

Za vrijeme trajanja leptospiremije koja se u prosjeku javlja unutar prvih sedam dana od infekcije, urođeni imunološki mehanizmi domaćina pokreću tkivne i sustavne odgovore na infekciju koji dovode do zatajenja organa i posljedično tomu očitovanju teškog oblika leptospiroze. Pacijenti koji boluju od teškog oblika leptospiroze u organizmu pokreću tzv. *citokinsku oluju* s višim razinama IL-6, TNF- α i niza drugih citokina u usporedbi s pacijentima blažeg kliničkog stanja (REIS i sur., 2008.).

Pulmonalni oblik leptospiroze plućnog tkiva, koji se kao najnoviji klinički entitet pojavio prije dvadesetak godina, obilježavaju različiti stupnjevi intraalveolarnog krvarenja u odsutnosti infiltrata upalnih stanica odnosno vaskulitisa. Intraalveolarni edem, fibrin i hijalinske membrane, koje su svojstvena popratna pojava difuznog oštećenjem alveola, također mogu biti prisutni, no nisu dominantni znakovi leptospiroze (SYKES i sur., 2023.).

Višemjesečno izlučivanje leptospiroze dokazano je različitim istraživanjima, te je prema jednoj studiji prisutnost leptospiralne DNA potvrđena u mokraći mačaka više od osam mjeseci nakon infekcije, s malom ili nikakvom povezanosti s bolešću. S druge strane, ove spoznaje ne isključuju mogućnost razvoja nefritisa u kasnijoj fazi rekonvalescencije (MURILLO i sur., 2020.).

2.4. Divlje mačke – hranidba i povezanost s bakterijama *Leptospira* spp.

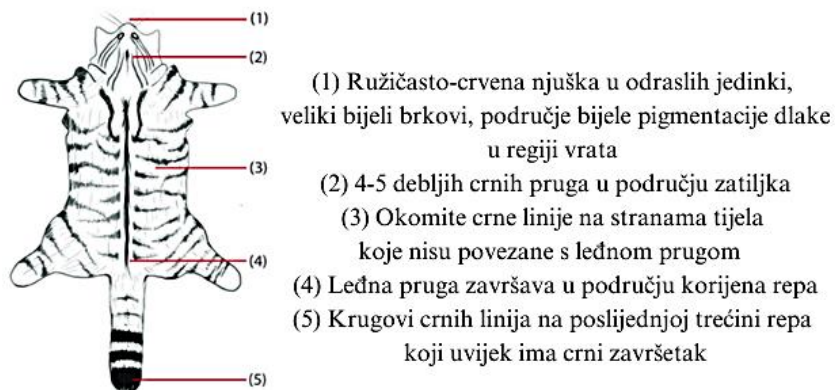
Populacije europske divlje mačke, *Felis silvestris silvestris* (Slika 5) fragmentirane su kroz veći dio raspona podvrsta i mogu biti ugrožene hibridizacijom s domaćom mačkom, *Felis catus* (BEUGIN i sur., 2019.). Europska divlja mačka morfološki se razlikuje od domaće mačke. Divlje mačke općenito su veće, imaju nešto kraći rep, širu lubanju i dulje noge. Krzno im je neujednačene boje, varira od nijansa sive do žućkaste. Glavno obilježje prema kojoj prepoznajemo divlju mačku jest upravo njihov rep, prošaran crnim krugovima koji uvijek završava crnim vrhom (Slika 6). U RH obitava u području bjelogoričnih šuma, a prehrana divlje mačke uključuje: štakore, mišolike glodavce, puhove, zečeve, pojedine vrste ptica, ponekad sitnije predstavnike zvijeri iz porodice kuna, a rjeđe napada i srneću lanad. Kunići su uz glodavce preferirani plijen u većini područja sa zabilježenom aktivnošću divljih mačaka. Divlje mačke obično su aktivne noću ili u sumrak i zoru. Zabilježena zanimljivost prilikom lova na plijen je da europske divlje mačke čiste strvinu, ali se navodi da je to rijetkost kod afričkih i azijskih divljih mačaka (*Felis silvestris libyca* i *Felis silvestris notatus*). Skladištenje hrane također je zabilježeno samo kod europske divlje mačke.

Europske divlje mačke imaju važnu ulogu u kontroli populacije glodavaca i drugih malih sisavaca, iako se u urbanim i poljoprivredno usmjerenim područjima i domaće mačke još uvijek prvenstveno drže u svrhu kontrole invazije glodavaca. Divlje mačke su ključni faktori u održavanju prirodnih ekosustava zemlje.

S druge pak strane, divlje mačke uključene su u održavanju raznih zaraznih bolesti bolesti kao što je i leptospiroza, a zbog specifičnog načina prehrane moguće djeluju i kao njezin rezervoar (YAMAGUCHI i sur., 2004.).



Slika 5. Europska divlja mačka, *Felis silvestris silvestris*;
izvor: <https://sparrou.net/en/mamifero/gato-montes/>



Slika 6. Morfološke razlike europske divlje mačke, prijevod; izvor:
https://www.researchgate.net/figure/Key-diagnostic-traits-for-Felis-silvestris-silvestris_fig3_349427126

2.5. Domaće mačke – specifičnosti epizootiologije i infekcije s *Leptospira* spp.

Sve je češća pretpostavka u današnje vrijeme kako upravo domaće mačke predstavljaju veliki rizik od prenošenja ove zoonoze, čak i ako klinički tijek bolesti povezan s patogenezom leptospiroze kod ove vrste još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. U prilog tomu dolazi i činjenica kako se prema provedenom istraživanju *Leptospira* spp. u urinu mačaka molekularnim metodama identificirala i više od osam mjeseci od infekcije, s time da jedinke nisu pokazivale detektibilna specifična protutijela u serumu (MURILLO i sur., 2020.). Po pitanju prirodne izloženosti mačaka patogenim leptospirama na području Europe, najnovija literatura navodi kako serološka prevalencija protutijela za *Leptospira* spp. izrazito varira ovisno o zemljopisnom području. Protutijela za *Leptospira* spp. očekivano je pronaći kod starijih, uličnih, urbanih mačaka čije prehrambene navike ovise isključivo o lovu plijena odnosno glodavaca. Serološke skupine Australis, Autumnalis, Ballum, Canicola, Grippytyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona i Sejroe najčešće su ustanovljene među mačkama u Europi, iako sa značajnim regionalnim varijacijama, kako u pogledu serovara tako i distribucije domaćina.

Izvjешća o kliničkoj slici leptospiroze u mačaka su rijetka i nespecifična – kliničko očitovanje bolesti obilježava mnoštvo različitih simptoma, od asimptomatske infekcije do fulminantne bolesti, što dijagnostički proces čini izazovnim. Općenito govoreći, akutna klinička slika leptospiroze uglavnom se javlja u mladih mačaka inficiranim patogenim hemolitičkim sojevima *Leptospira* spp., dok će u većini ostalih zabilježenih slučajeva klinički znakovi biti vjerojatno blagi. Klinički znakovi leptospiroze koji su posljedica eksperimentalne infekcije u mačaka uključuju poliuriju, polidipsiju, hematuriju, uveitis, letargiju, anoreksiju, gubitak tjelesne mase, ascites, povraćanje, proljev, bolnost, kutane i interdigitalne upalne lezije, izljev u tjelesne šupljine i nefritis.

Hematološke promjene uključuju leukocitozu, dok se u biokemijskim pretragama može zapaziti azotemija, hipokalijemija, hiperfosfatemija; a pretragom urina i hipostenurija, hematurija i proteinurija. Jetreni parametri rijetko su promijenjeni prema čemu zaključujemo kako se disfunkcija ne prijavljuje često kao u pasa.

Prisutnost bolesti povezanih s imunosupresijom u mačaka dovodi do smanjene otpornosti na infekcije s *Leptospira* spp., i na razvoj težeg oblika kliničke slike. Razne zarazne i nezarazne bolesti, stres, loša prehrana, lijekovi, veterinarske terapije, toksini, kao i sam način života uličnih mačaka također su povezani s imunosupresijom (Slika 7).

Konkretno, najčešće bolesti koje uzrokuju komorbiditete u uličnih mačaka su tzv. *mačje zarazne bolesti*, a njihovi uzročnici su: virus mačje panleukopenije (FPV), mačji herpesvirus, mačji kalicivirusi (FCV), virus mačjeg peritonitisa (FIP), virus mačje leukemije (FeLV) i virus mačje imunodeficijencije (FIV). Najprijemljivije su mačke do druge godine života, najosjetljiviji su mačići, dok imunosupresija može biti prolazna u odraslih mačaka. Prema istraživanjima procjenjuje se kako je do 1,4% svih uginuća u mačaka uzrokovano FIP-om. FeLV i FIV infekcije prijavljene su u mačaka diljem svijeta, a obje su infekcije povezane s različitim kliničkim znakovima i vremenom njihova očitovanja te mogu utjecati na kvalitetu života i dugovječnost mačaka. Mačke oboljele od bilo koje zarazne bolesti su imunosuprimirane s usporenim i smanjenim odgovorom primarnih i sekundarnih protutijela i samim time pogodne za infekcije različitim bakterijama, kao što je primjerice *Leptospira* spp. Tome u prilog ide i velika gustoća populacije uličnih mačaka ili mačaka u skloništima, čimbenik je koji će olakšati prijenos patoloških mikroorganizama između populacije.

Istraživanjem populacije mačaka u Italiji koje imaju pristup vanjskoj okolini u kojoj imaju priliku loviti plijen, pretpostavljeno je kako bi velika populacija tih mačaka mogla biti izložena leptospirama i time pridonijeti složenoj epidemiologiji ove bolesti. Zaključak istraživanja bio je kako su mačke koje imaju pristup vanjskoj okolini i ispoljavaju predatorsko ponašanje najvažniji čimbenik rizika obolijevanja mačaka od leptospiroze. Uz to, život u ruralnim područjima u bliskom kontaktu sa stočnim farmama, kontakt sa sinantropskim ili divljim vrstama i prisutnost drugih mačaka u kućanstvu također su povezani s povećanim rizikom od obolijevanja od leptospiroze. Identificirani su daljnji čimbenici rizika za okoliš, kao što je život u poplavljenim područjima u kojima se intenzivno iskorištavaju voda iz rijeka ili jezera. Sukladno tomu, u tropskim je zemljama učestalost kliničkih očitovanja leptospiroze u ljudi snažno povezana s kišnim sezonama (MAZZOTTA i sur., 2023.).



Slika 7. Usporedba životnih navika slobodno živućih mačaka i kućne mačke, prijevod; izvor:

<https://icatcare.org/unowned-cats/the-different-needs-of-domestic-cats/>

3. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je provedeno je na osamnaest uzoraka bubrega divljih mačaka dobivenih odstrelom grabežljivaca na lovištima na području RH te na dvadeset i dva uzorka bubrega domaćih uličnih mačaka europske pasmine koje su pretrpjele traumu i posljedično tomu uginule. Bubrezi su bili pohranjeni u Laboratoriju za leptospire (LEPTOlab) Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na -20°C (Tablice 2 i 3).

Istraživanje je započeto 13. rujna 2023. i trajalo je do 2. travnja 2024.

Tablica 2. Uzorci bubrega divljih mačaka

VRSTA ŽIVOTINJE	LEPTO broj	ORGAN	MJESTO POHRANE	DATUM I VRIJEME IZDVAJANJA
Divlja mačka	WC23	Bubreg	Zamrzivač Klinika	14.9.2023
Divlja mačka	WC24	Bubreg	Zamrzivač Klinika	22.9.2023
Divlja mačka	WC25	Bubreg	Zamrzivač Klinika	14.9.2023
Divlja mačka	WC26	Bubreg	Zamrzivač Klinika	15.9.2023
Divlja mačka	WC27	Bubreg	Zamrzivač Klinika	20.9.2023
Divlja mačka	WC29	Bubreg	Zamrzivač Klinika	15.9.2023
Divlja mačka	WC30	Bubreg	Zamrzivač Klinika	22.9.2023
Divlja mačka	WC31	Bubreg	Zamrzivač Klinika	22.9.2023
Divlja mačka	WC33	Bubreg	Zamrzivač Klinika	20.9.2023
Divlja mačka	WC35	Bubreg	Zamrzivač Klinika	22.9.2023
Divlja mačka	WC37	Bubreg	Zamrzivač Klinika	22.9.2023
Divlja mačka	WC38	Bubreg	Zamrzivač Klinika	22.9.2023
Divlja mačka	WC39	Bubreg	Zamrzivač Klinika	22.9.2023
Divlja mačka	WC40	Bubreg	Zamrzivač Klinika	20.9.2023
Divlja mačka	WC41	Bubreg	Zamrzivač Klinika	22.9.2023
Divlja mačka	WC42	Bubreg	Zamrzivač Klinika	22.9.2023
Divlja mačka	DNA-1	Bubreg	Zamrzivač Klinika	20.9.2023
Divlja mačka	DNA-2	Bubreg	Zamrzivač Klinika	20.9.2023

Tablica 3. Uzorci bubrega domaćih mačaka

VRSTA ŽIVOTINJE	LEPTO broj	ORGAN	MJESTO POHRANE	DATUM I VRIJEME IZDVAJANJA
Domaća mačka	L-p-1	Bubreg	Zamrzivač Zavod	6.3.2024
Domaća mačka	L-p-2	Bubreg	Zamrzivač Zavod	6.3.2024
Domaća mačka	L-p-3	Bubreg	Zamrzivač Zavod	22.2.2024
Domaća mačka	L-p-4	Bubreg	Zamrzivač Zavod	22.2.2024
Domaća mačka	L-p-5	Bubreg	Zamrzivač Zavod	22.2.2024
Domaća mačka	L-p-6	Bubreg	Zamrzivač Zavod	22.2.2024
Domaća mačka	L-p-7	Bubreg	Zamrzivač Zavod	1.3.2024
Domaća mačka	L-p-8	Bubreg	Zamrzivač Zavod	1.3.2024
Domaća mačka	L-p-9	Bubreg	Zamrzivač Zavod	1.3.2024
Domaća mačka	L-p-10	Bubreg	Zamrzivač Zavod	1.3.2024
Domaća mačka	L-p-11	Bubreg	Zamrzivač Zavod	6.3.2024
Domaća mačka	L-p-12	Bubreg	Zamrzivač Zavod	6.3.2024
Domaća mačka	L-p-13	Bubreg	Zamrzivač Zavod	6.3.2024
Domaća mačka	L-p-14	Bubreg	Zamrzivač Zavod	29.2.2024
Domaća mačka	L-p-15	Bubreg	Zamrzivač Zavod	29.2.2024
Domaća mačka	L-p-16	Bubreg	Zamrzivač Zavod	29.2.2024
Domaća mačka	L-p-17	Bubreg	Zamrzivač Zavod	28.2.2024
Domaća mačka	L-p-18	Bubreg	Zamrzivač Zavod	28.2.2024
Domaća mačka	L-p-19	Bubreg	Zamrzivač Zavod	29.2.2024
Domaća mačka	L-p-20	Bubreg	Zamrzivač Zavod	6.3.2024
Domaća mačka	L-p-21	Bubreg	Zamrzivač Zavod	6.3.2024
Domaća mačka	L-p-22	Bubreg	Zamrzivač Zavod	6.3.2024

Bubrezi su nakon odmrzavanja homogenizirani u laboratorijskom tarioniku pomoću tučka, prethodno usitnjeni koristeći sterilne škare, skalpele i pincete unutar laboratorijske komore (digestora). Homogenizacija uzoraka unutar laboratorijske komore odvijala se u sterilnim uvjetima te je nakon svake uporabe prostor očišćen i dezinficiran pomoću ultraljubičastog (UV) svjetla. Pojedini klinički uzorak težio je između 0,025 – 0,040 g; što je optimalan raspon težine uzorka, budući da uzorci koji prelaze 0,040 g mogu uzrokovati zagušenje silikagel membrane koja služi da bi se na njoj zadržala DNA uzorka, dok uzorci lakši od 0,025 g mogu prouzročiti kontraefekt, odnosno nedovoljno čiste DNA. Pojedini uzorak pohranio se u *Eppendorf* epruvete zapremnine 1,5 ml i označio. Nakon homogeniziranja, *NucleoSpin® Tissue* metodom izdvojena je DNA iz pojedinih tkiva bubrega. Osnovni princip izvođenja navedene metode jest liza stanica koja se postiže inkubacijom uzoraka u otopini proteinaze K (25 µl) te dodatkom pufera T1 (180 µl).

Uzorci se nakon miješanja stolnom laboratorijskom mješalicom (vorteksom) i centrifugiranja na 11000 rcf-a kroz 25 sekundi preko noći stavljaju u *ThermoMixer* na 56°C (300 rpm).

Odgovarajući uvjeti za vezanje DNA na silikagel membrane *Eppendorf* epruveta postižu se dodavanjem kaotropnih soli i etanola (210 µl) u lizat. U međukoracima dolazi do miješanja u vorteksu i centrifugiranja sadržaja na 11000 rcf-a kroz 25 sekundi u tzv. *epruvetama sakupljačicama*. Puferi koji se koriste za ispiranje uzoraka su BW (500 µl), B5 (600 µl) i konačno BE (100 µl), blago alkalni pufer čija je uloga osloboditi DNA s membrane. Posljednjim centrifugiranjem u protokolu, DNA se spušta sa membrane i konačan produkt je DNA otopljena u 100 µl pufera, odnosno 100 µl čiste genomske DNA, koja se nakon toga prikladno označuje i smrzava na -20°C.

Za potrebe PCR dijagnostike potrebno je u sterilnim laboratorijskim uvjetima izraditi PCR reakcijsku smjesu koja se sastoji od pufera za zbivanje reakcije, smjese deoksiribonukleotida u jednakom omjeru (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), para početnica (*primera*), odnosno odsječaka DNA specifičnog za dio genoma traženog uzročnika i od termostabilnog enzima *Taq* polimeraze. PCR smjesi dodajemo DNA izdvojenu iz kliničkog materijala i dokazujemo prisutnost DNA traženog mikroorganizma, u ovom slučaju bakterije *Leptospira* spp.

PCR kit korišten za dijagnostiku leptospira pomoću *RealTime* PCR metode jest *Quanti Fast Pathogen PCR Mix + IC kit* – izolat pozitivne kontrole (DNA izdvojena iz prethodno utvrđenog pozitivnog kliničkog materijala za određeni mikroorganizam ili DNA iz čiste kulture mikroorganizma), u ovom slučaju SABA hemo. Pozitivne kontrole omogućuju visoku sigurnost procesa detekcijom i razlikovanjem negativnih od pozitivnih rezultata. Za potrebe negativne kontrole u ovom istraživanju korištena je pročišćena voda, a može se koristiti DNA izdvojena iz prethodno utvrđenog negativnog kliničkog uzorka. Optimizirana glavna mješavina (PCR *Mastermix*) osigurava da se PCR proizvodi u multipleksnoj reakciji umnožavaju s istom učinkovitošću i osjetljivošću kao PCR proizvodi u odgovarajućoj reakciji jednostruke amplifikacije te ju je potrebno čuvati na 2–8°C. *Quanti Fast* PCR Mix, odnosno glavna mješavina sastoji se od DNA polimeraze, *Quanti Fast* pufera za patogene i dNTP mješavine u koju ulaze dATP, dCTP, dGTP, dTTP. U *kit*-u se nalaze i boje, odnosno 50x ROX boja koja služi kao referentna boja za normalizaciju fluorescentnih signala na *RealTime* PCR uređajima. Sve zajedno čini PCR *Mastermix* koji se sastoji od 5x *Quanti Fast* PCR Mix, 10x *Specific*

Primer – Probe Mix (FRP), 10x *Internal Control* DNA, 10x *Internal Control Assay* i DNA/RNA-ase free water. Napravljen je FRP u koji ulaze dva primera, LipL32 – 45F i LipL32 – 286R, početnice koje su specifične za umnažanje dijela gena za lipoprotein vanjske membrane *LipL32* i probe (Tablica 4).

Tablica 4. Geni koji kodiraju lipoprotein vanjske membrane patogenih leptospira

LipL32-45F	5'-AAGCATTACCGCTTGTGGTG-3'
LipL32-286R	5'-GAACTCCCATTTCAGCGATT-3'
LipL32-189P	FAM-AAAGCCAGGACAAGCGCCG-BHQ-1

Kao što je već spomenuto, istraživanje se provodilo na osamnaest uzoraka bubrega divljih mačaka, ali zbog uračunatih gubitaka *Mastermix*-a, smjesa se radila za ukupno dvadeset i pet uzoraka, što se svodi na 62,5 µl *Quanti Fast PCR Mix*-a; 48,5 µl FRP-a; 31,25 µl IC DNA; 31,25 µl IC Assay te 144 µl vode (Tablica 5). U posljednjem koraku PCR *Mastermix* u količini od 11,5 µl pomiješan je s 1 µl DNA uzorka. PCR *Mastermix* razdijelio se u dvadeset i dvije epruvete, od kojih je osamnaest epruveta sadržavalo DNA uzorka, a uz njih su dvije bile pozitivne i dvije negativne kontrole.

Prilikom izrade *Mastermix*-a za dvadeset i dva uzorka bubrega domaćih mačaka, zbog gubitaka u nastavcima korištenih epruveta, smjesa je bila dostatna za ukupno dvadeset i sedam uzoraka i uključivala je 67,5 µl *Quanti Fast PCR Mix*-a; 52,38 µl FRP-a; 33,75 µl IC DNA; 33,75 µl IC Assay te 123,12 µl vode (Tablica 6). PCR *Mastermix* razdijelio se u dvadeset i šest epruveta, od kojih su dvadeset i dvije epruvete sadržavale DNA uzorka a uz njih su dvije bile pozitivne i dvije negativne kontrole. U svaku pojedinu prethodno označenu *Eppendorf* epruvetu pipetom je odmjereno 11,5 µl pripremljenog PCR *Mastermix*-a i na to je dodan 1 µl DNA uzorka.

Tablica 5. PCR *Mix* izrađen za osamnaest uzoraka bubrega divljih mačaka

PCR MIX	Volumen za jedan uzorak (µl)	Volumen za dvadeset i pet uzoraka (µl)
5x QuantiFast PCR Mix	2,5	62,5
10x Specific Primer-Probe Mix (FRP)	1,94	48,5
10x Internal Control DNA	1,25	31,25
10x Internal Control Assay	1,25	31,25
DNA/RNA-ase free water	4,56	114

Tablica 6. PCR *Mix* izrađen za dvadeset i dva uzorka bubrega domaćih mačaka

PCR MIX	Volumen za jedan uzorak (µl)	Volumen za dvadeset i sedam uzoraka (µl)
5x QuantiFast PCR Mix	2,5	67,5
10x Specific Primer-Probe Mix (FRP)	1,94	52,38
10x Internal Control DNA	1,25	33,75
10x Internal Control Assay	1,25	33,75
DNA/RNA-ase free water	4,56	123,12

Dobiveni uzorci obrađeni su na uređaju *Rotor-Gene Q* PCR, folder LipL32. Važnost gena *LipL32* kojeg umnažamo jest da upravo taj gen kodira lipoprotein vanjske membrane koji se, za razliku od *LipL21*, smatra faktorom virulencije koji nije prisutan u nepatogenim vrstama *Leptospira* spp. (HAAKE i sur., 2000.). Metoda izolacije leptospira korištena u ovom istraživanju temelji se na unaprijeđenoj tehnici otkrivanja *LipL32* gena pomoću *TaqMan* tehnologije i pritom istovremeno određuje donju granicu detekcije (LLOD), osjetljivost, specifičnost i izvedbu pomoću obogaćenih uzoraka krvi i urina (STODDARD i sur., 2009.).

Općenito govoreći, molekularne metode dijagnostike primjenjuju se u istraživanjima u kojima je mali broj mikroorganizama u istraživanom materijalu ili su u pitanju mikroorganizmi koji zahtijevaju posebne uvjete rasta. PCR se stoga primjenjuje u dijagnostici zaraznih, nasljednih i nenasljednih bolesti, forenzici, populacijskoj genetici, sistematici, bioinženjerstvu i u evolucijskoj biologiji. Upravo ova metoda omogućuje kemijsku sintezu i umnažanje određenog odsječka DNA u *in vitro* uvjetima. Kao što je već opisano, prije provođenja PCR analize potrebno je sekvencirati, odnosno izdvojiti cjelokupnu DNA iz nekog materijala uz pomoć komercijalnih kitova; nakon toga u sterilnim uvjetima izraditi PCR reakcijsku smjesu kojoj u posljednjem koraku dodajemo izdvojenu DNA iz kliničkog materijala.

RealTime PCR metoda temelji se praćenjem kvantifikacije umnoženog dijela DNA odnosno RNA uzoraka na računalu. Novonastali proizvod jasno je vidljiv zbog svojih fluorescirajućih bojanja.

Molekularna metoda dijagnostike pomoću PCR uređaja omogućuje kemijsku sintezu i umnažanje jednog ili više nukleotidnih slijedova DNA. *Rotor-Gene Q* uređaj je koji omogućuje visoko precizni PCR u stvarnom vremenu (*RealTime* PCR) te je prikladan za upotrebu u analizi ekspresije gena, genotipizaciji, detekciji patogena, i ostalim područjima istraživanja. Jedinstveni rotacijski format osigurava optimalnu toplinsku i optičku uniformnost uzoraka koji se neprestano vrte na 400 rpm-a. Rotiranje uzoraka sprječava kondenzaciju i uklanja mjehuriće zraka, ali pritom ne taloži DNA. PCR se temelji na cikličkoj promjeni temperature, a postupak je razdvojen u tri koraka (Tablica 7). Započinje denaturacijom, odnosno razdvajanjem dvolančane DNA u dva jednolančana lanca na 95°C kroz 2 minute. Zatim se ciklički ponavljaju koraci 40x, na temperaturi od 90°C kroz 5 sekundi i na temperaturi od 60°C kroz 30 sekundi. Dolazi do hibridizacije, odnosno sparivanja početnica koje se vežu na komplementarne slijedove baza na odvojenim lancima. Početnice omeđuju ciljni odsječak DNA koji se umnaža PCR-om. Posljednji korak je produživanje lanca DNA pomoću enzima *Taq*-polimeraze koji će se vezati na slobodne dNTP-ove iz PCR smjese i stvara se novi lanac koji je komplementaran lancu čija je on kopija.

Tablica 7. Opis i trajanje PCR ciklusa

PCR ciklus	Vrijeme	Temperatura	Reakcija
Aktivacija enzima polimeraze	2 min	95 °C	Prva aktivacija enzima polimeraze
Denaturacija DNA	5 sek	95 °C (40x)	Denaturacija dvolančane DNA u dva jednolančana lanca; nastanak novog lanaca koji je komplementaran lancu čija je on kopija; produživanje novonastalih lanaca
Hibridizacija	30 sek	60 °C	

RealTime PCR reakcija temelji se na praćenju i kvantifikaciji umnoženog dijela DNA na računalu, odnosno praćenjem reakcije na programu *Software Version Roto-Gene 2. 1. 0. 9*. Novonastali DNA proizvod fluorescira, pozitivan uzorak vidljiv je kao amplifikacijska krivulja zelene i žute boje, dok negativni uzorak fluorescira samo u žutoj boji. Fluorescencija koju pratimo na računalnom programu razmjerna je količini PCR produkta. Za analizu uzoraka koriste se točke križanja, *Ct (cycle threshold)* – vrijednost koja određuje ciklus prilikom kojeg linija amplifikacije prelazi prag detekcije, koje je u slučaju analize uzoraka bubrega divljih mačaka iznosila $Ct_{PK1} = 19,85$ i $Ct_{PK2} = 19,36$; a analizom uzoraka bubrega domaćih mačaka iznosila je $Ct_{PK1} = 13,36$ i $Ct_{PK2} = 10,59$.

Za sve izdvojene uzorke izmjerena je koncentracija i čistoća DNA pomoću spektrofotometra *Nanodrop* na uređaju *BioDrop μLITE spectrophotometer*. Koncentracija se uz navedeni spektrofotometar mjerila i na fluorometru *Qubit*; uređaju *Invitrogen™ Qubit™ 4 Fluorometer*. U odnosu na *Nanodrop*, *Qubit* fluorometar daje pouzdanije rezultate koncentracije DNA zbog svoje osjetljivosti. Uređaj pouzdano mjeri vrlo niske koncentracije i specifičniji te se veže za prethodno izolirani DNA. Upravo zbog svoje sposobnosti vezanja na DNA, različiti bakterijski kontaminanti neće utjecati na rezultat. Svi uzorci čiji su dobiveni rezultati prelazili koncentraciju su iznad 110 ng/uL (mjereni *Qubitom*) nisu mogli biti izmjereni zbog vrlo visoke koncentracije. U tom slučaju, izolirane DNA bile su diluirane kako bi dobili relevantne rezultate. Prema rezultatima koncentracije i čistoće DNA navedenim u tablici, kod

mjerenja u većine uzoraka izmjerena je vrlo dobra, čak i visoka koncentraciju DNA, osobito kod DNA izolirane iz bubrega domaćih mačaka.

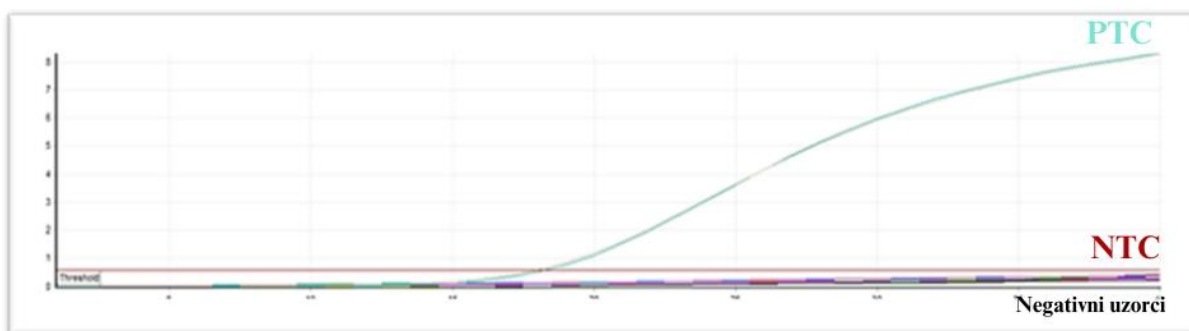
Čistoća DNA izmjerena je pomoću A260/A280 omjera na *Nanodrop*-u pri čemu se rezultati od otprilike 1,8 smatraju zadovoljavajućom čistoćom za DNA.

4. REZULTATI

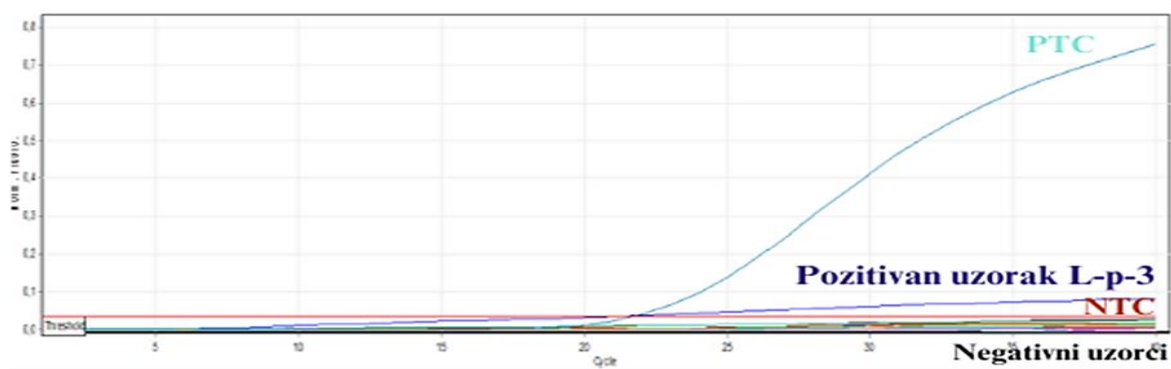
Ovo istraživanje provedeno je na ukupno četrdeset uzoraka bubrega domaćih i divljih mačaka, 18 bubrega divljih i 22 bubrega domaćih mačaka, pohranjenih u zamrzivaču Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na -20°C. Obrada uzoraka, izoliranje pojedine DNA i PCR analiza uzoraka započela je 13. rujna 2023. i završila zaključno s 2. travnjem 2024.

U provedenom istraživanju dobiveno je trideset i devet negativnih PCR reakcija, odnosno u trideset i devet uzoraka nije došlo do umnažanja DNA u uzorku (Slika 8, Tablica 9). Samo je jedan uzorak bio pozitivan (L-p-3) koji je izoliran iz bubrega domaće mačke (Slika 9, Tablica 10).

Na slikama 8 i 9, koje prikazuju rezultate istraživanja provedenog na uzorcima bubrega divljih i domaćih mačaka, vidljiva je krivulja koja označuje pozitivnu kontrolu (PTC) i negativnu kontrolu (NTC). Porast amplifikacijske krivulje PCR produkta (Ct=18,93) prikazuje pozitivan uzorak (Slika 9). Ispod *Threshold* linije nalaze se svi negativni uzorci bubrega divljih i domaćih mačaka.



Slika 8. Prikaz metode očitavanja rezultata lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu na uzorcima bubrega divljih mačaka, autorska slika.



Slika 9. Prikaz metode očitavanja rezultata lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu na uzorcima bubrega domaćih mačaka, autorska slika.

Tablica 9. Rezultati renokulture i PCR analize provedene na uzorcima divljih mačaka

VRSTA ŽIVOTINJE	LEPTO broj	ORGAN	MJESTO POHRANE	DATUM I VRIJEME IZDVAJANJA	RENOKULTURA	REZULTAT PCR ANALIZE
Divlja mačka	WC23	Bubreg	Zamrzivač Klinika	14.9.2023	negativna	negativan
Divlja mačka	WC24	Bubreg	Zamrzivač Klinika	22.9.2023	negativna	negativan
Divlja mačka	WC25	Bubreg	Zamrzivač Klinika	14.9.2023	negativna	negativan
Divlja mačka	WC26	Bubreg	Zamrzivač Klinika	15.9.2023	nema podataka	negativan
Divlja mačka	WC27	Bubreg	Zamrzivač Klinika	20.9.2023	nema podataka	negativan
Divlja mačka	WC29	Bubreg	Zamrzivač Klinika	15.9.2023	nema podataka	negativan
Divlja mačka	WC30	Bubreg	Zamrzivač Klinika	22.9.2023	nema podataka	negativan
Divlja mačka	WC31	Bubreg	Zamrzivač Klinika	22.9.2023	nema podataka	negativan
Divlja mačka	WC33	Bubreg	Zamrzivač Klinika	20.9.2023	nema podataka	negativan
Divlja mačka	WC35	Bubreg	Zamrzivač Klinika	22.9.2023	nema podataka	negativan
Divlja mačka	WC37	Bubreg	Zamrzivač Klinika	22.9.2023	nema podataka	negativan
Divlja mačka	WC38	Bubreg	Zamrzivač Klinika	22.9.2023	nema podataka	negativan
Divlja mačka	WC39	Bubreg	Zamrzivač Klinika	22.9.2023	nema podataka	negativan
Divlja mačka	WC40	Bubreg	Zamrzivač Klinika	20.9.2023	nema podataka	negativan
Divlja mačka	WC41	Bubreg	Zamrzivač Klinika	22.9.2023	nema podataka	negativan
Divlja mačka	WC42	Bubreg	Zamrzivač Klinika	22.9.2023	nema podataka	negativan
Divlja mačka	DNA-1	Bubreg	Zamrzivač Klinika	20.9.2023	nema podataka	negativan

Tablica 10. Rezultati renokulture i PCR analize provedene na uzorcima domaćih mačaka

VRSTA ŽIVOTINJE	LEPTO broj	ORGAN	MJESTO POHRANE	DATUM I VRIJEME IZDVAJANJA	RENOKULTURA	REZULTAT PCR ANALIZE
Domaća mačka	L-p-1	Bubreg	Zamrzivač Zavod	6.3.2024	negativna	negativan
Domaća mačka	L-p-2	Bubreg	Zamrzivač Zavod	6.3.2024	negativna	negativan
Domaća mačka	L-p-3	Bubreg	Zamrzivač Zavod	22.2.2024	nema podataka	pozitivan
Domaća mačka	L-p-4	Bubreg	Zamrzivač Zavod	22.2.2024	negativna	negativan
Domaća mačka	L-p-5	Bubreg	Zamrzivač Zavod	22.2.2024	nema podataka	negativan
Domaća mačka	L-p-6	Bubreg	Zamrzivač Zavod	22.2.2024	negativna	negativan
Domaća mačka	L-p-7	Bubreg	Zamrzivač Zavod	1.3.2024	negativna	negativan
Domaća mačka	L-p-8	Bubreg	Zamrzivač Zavod	1.3.2024	negativna	negativan
Domaća mačka	L-p-9	Bubreg	Zamrzivač Zavod	1.3.2024	negativna	negativan
Domaća mačka	L-p-10	Bubreg	Zamrzivač Zavod	1.3.2024	nema podataka	negativan
Domaća mačka	L-p-11	Bubreg	Zamrzivač Zavod	6.3.2024	nema podataka	negativan
Domaća mačka	L-p-12	Bubreg	Zamrzivač Zavod	6.3.2024	nema podataka	negativan
Domaća mačka	L-p-13	Bubreg	Zamrzivač Zavod	6.3.2024	nema podataka	negativan
Domaća mačka	L-p-14	Bubreg	Zamrzivač Zavod	29.2.2024	negativna	negativan
Domaća mačka	L-p-15	Bubreg	Zamrzivač Zavod	29.2.2024	nema podataka	negativan
Domaća mačka	L-p-16	Bubreg	Zamrzivač Zavod	29.2.2024	negativna	negativan
Domaća mačka	L-p-17	Bubreg	Zamrzivač Zavod	28.2.2024	negativna	negativan
Domaća mačka	L-p-18	Bubreg	Zamrzivač Zavod	28.2.2024	negativna	negativan
Domaća mačka	L-p-19	Bubreg	Zamrzivač Zavod	29.2.2024	negativna	negativan
Domaća mačka	L-p-20	Bubreg	Zamrzivač Zavod	6.3.2024	negativna	negativan
Domaća mačka	L-p-21	Bubreg	Zamrzivač Zavod	6.3.2024	nema podataka	negativan
Domaća mačka	L-P-22	Bubreg	Zamrzivač Zavod	6.3. 2024	nema podataka	negativan

5. RASPRAVA

U ovom radu pokušali smo potvrditi hipotezu da domaće i divlje mačka mogu u određenim uvjetima imati potencijal rezervoara bakterija *Leptospira* spp., odnosno da mogu imati stanovitu ulogu u prijenosu leptospiroze na druge životinje i ljude. Korištene metode uključivale su izolaciju DNA iz kliničkog materijala, u našem slučaju bubrega mačaka, pomoću *NucleoSpin® Tissue* metode te lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu.

Prema dosad objavljenim podacima mačka se ne smatra životinjom koja ima osobit značaj u epidemio/epizootiološkom lancu leptospiroze, prvenstveno radi evolucijske prilagodbe na *Leptospira* spp. koja je posljedica prevladavajućeg načina hranidbe mišolikim glodavcima koji predstavljaju glavne rezervoare *Leptospira* spp.. U Hrvatskoj, leptospiroza u mačke sustavno je istraživana od 1974. godine. Najprije su ustanovljena protutijela za leptospire u serumu 112 mačaka u okolici Zagreba, a iz bubrega jedne izdvojen je serovar Australis. U mačaka pokusno inficiranim leptospirama serovara Australis, Pomona ili Icterohaemorrhagiae ustanovljena je blaga klinička reakcija i blage patološko-anatomske promjene u jetri, plućima i bubrezima, a u serumu protutijela za infektivni serovar, uz uobičajenu koaglutinaciju (MODRIĆ, 1978.). Iz bubrega mačaka u Baranji izdvojena su još četiri soja i to serovari Bataviae, Pomona (dva) i Icterohemorrhagiae (MODRIĆ i sur., 1981.).

Nakon provedene izolacije DNA i obrade uzoraka molekularnom metodom *RealTime* PCR, utvrđeno je kako je samo jedan uzorak domaće mačke bio pozitivan na infekciju *Leptospira* spp., a ostali su se pokazali negativnima. Prilikom očitovanja rezultata, zbog uzdignuća PTC krivulje, odnosno pozitivne kontrole u uzorcima, možemo sa velikom sigurnošću tvrditi kako su uzorci bili pravilno pohranjeni i pripremljeni, a DNA izolirana pridržavajući se uputstava bez dodatnih kontaminacija uzoraka i na kraju analizirana *Rotor-Gene Q* PCR uređajem. Molekularne metode u današnje vrijeme odlikuje visoka osjetljivost i specifičnost te je korištena metoda *RealTime* PCR-a u ovom istraživanju predstavljala optimalnu metodu detekcije leptospira u istraživanom materijalu. U prilog tomu idu prethodno napravljene negativne renokulture svih uzoraka divljih mačaka, čiji se rezultati temelje na uzgoju materijala na tekućim hranidbenim podlogama u svrhu izdvajanja bakterije *Leptospira* spp. U svakom slučaju potvrdili smo da je *RealTime* PCR metoda izbora i u sljedećim istraživanjima, ne samo kao metoda detekcije leptospira u istraživanim tkivima organa, već je smatramo jednako dobrom i kod pretrage krvi i ostalih tkivnih tekućina kao i kod pretrage urina radi dokazivanja leptospiroze.

Prema sličnom istraživanju provedenom u Salvadoru, Brazilu iz 2021. godine, autori koji su istraživali titar protutijela za *Leptospira* spp. u serumu domaćih mačaka potvrdili su prethodne pretpostavke i provedena istraživanja u kojima su uspjeli izolirati DNA ili bakterijske izolate *Leptospire* spp. u uzorcima urina ili kliničkih materijala, najčešće bubrega domaćih mačaka s niskim ili negativnim MAT titrom. Dokazano je i da mačke koje prema MAT-u ne pokazuju titar protutijela i dalje mogu izlučivati bakterije urinom, čime urin postaje sekundarni izvor infekcije za životinje i ljude. Provedenim istraživanjem je ustanovljeno da domaće mačke mogu djelovati kao kronični prijenosnici leptospiroze, čak i ako epidemiološka važnost domaćih mačaka u lancu bakterijske transmisije leptospiroze ostaje djelomično nepoznata (PAZ i sur., 2021.).

Iako to ovim istraživanjem nije potvrđeno na temelju samo jednog pozitivnog uzorka, a što je vjerojatno i posljedica manjeg broja uzoraka, nije isključeno kako domaće i divlje mačke i dalje ostaju mogući rezervoari leptospiroze. Negativni aspekt našeg istraživanja je što nismo bili u mogućnosti detektirati i moguću leptospiruriju živih mačaka. Također, bubrezi divljih, ali i domaćih mačaka su izuzeti tijekom razudbe i vjerojatno je stanoviti broj bubrega bio i izvrnut inicijanoj postmortalnoj autolizi, a time je postojala i stanovita mogućnost i raspada *Leptospira* spp. u istraživanom materijalu. Nadalje, uz istraživanje provedeno na mačjoj populaciji, smatra se kako je određivanje sposobnosti kliconoštva i brojnosti populacije mišolikih glodavaca važan čimbenik prilikom procjenjivanja leptospiroze kao bolesti prirodnih žarišta. Ostaje otvoreno pitanje mogu li u slučajevima nekih kroničnih infekcija, kao što su infekcije virusom leukemije mačaka (FeLV) te virusom imunodeficijencije mačaka (FIV), ili pak u slučajevima kroničnih bolesti bubrega druge etiologije, mačke ostati kliconoše leptospira duže vrijeme.

U narednim istraživanjima potreban je multidisciplinarni pristup praćenja bolesti i provođenje mjera veterinarske kontrole, kao i suzbijanja leptospiroze u različitim vrsta životinja kao potencijalnih izvora infekcije (TURK i sur., 2003.). Zbog svoje kompleksne epizootologije, leptospiroza ima mnogobrojne čimbenike koji utječu na njezino širenje i održavanje bolesti u ekosustavu – tlo, prekrivenost površine šumama, vodom, prisutnost rezervoara, ali i ostalim čimbenicima koje ne možemo isključiti, a nisu još dovoljno istraženi.

6. ZAKLJUČCI

- Kod domaćih mačaka ustanovljen je jedan pozitivan uzorak i time i potencijal rezervoara ovih životinja za bakteriju *Leptospira* spp., dok kod divljih mačaka to nije bio slučaj. Dobiveni rezultati ne isključuju divlje mačke kao čimbenike rizika u prijenosu i održavanju leptospiroze
- Domaće su mačke zbog svog načina života, imunokompromitiranosti i asociranih komorbiditeta osjetljivije od divljih mačaka kao mogući nositelji leptospira, a smatramo da su i prijemljivije manifestnom obliku kliničke slike leptospiroze
- Za vjerodostojnije rezultate potrebno je uzeti u obzir veću populaciju domaćih i divljih mačaka i pritom nastojati detektirati i moguću leptospiruriju u domaćih mačaka te imati informacije i o prevalenciji leptospiroze dominantnih serovara u populaciji mišolikih glodavaca istoga područja
- Korištena molekularna metoda *RealTime* PCR-a pokazala se izvrsnim izborom u detekciji leptospira u istraživanom kliničkom materijalu i smatramo je pogodnom i za buduća šira istraživanja uloga različitih životinja u epidemio/epizootiološkom ciklusu leptospiroze

7. LITERATURA

1. ADLER, B., A. DE LA PENA MOCTEZUMA (2010): *Leptospira* and leptospirosis. Vet Microbiol.140, 287-96.
doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.012.
2. ANDRÉ-FONTAINE, G. (2006): Canine leptospirosis-do we have a problem? Vet Microbiol.117,19-24.
doi: 10.1016/j.vetmic.2006.04.005.
3. ANTUNOVIĆ-MIKAČIĆ, S. (1935): O prvom slučaju Weilove bolesti na našem Primorju. (The first case of Weil's disease on our coastal region). Liječ. vjesn. 1935; 57-377.
4. ARBOUR, J., M. C. BLAIS, L. CARIOTO, D. SYLVESTRE (2012): Clinical leptospirosis in three cats (2001-2009). J Am Anim Hosp Assoc. 48:256-60.
doi: 10.5326/JAAHA-MS-5748.
5. BABIĆ, I. (1927): Typhus canum u Zagrebu (Typhus canum in Zagreb). Jug. vet. glas. 7, 21.
6. BALEN TOPIĆ, M., J. HABUŠ, Z. MILAS, E. CELJUSKA TOŠEV, Z. ŠTRITOF, N. TURK (2010): Human leptospirosis in Croatia: current status of epidemiology and clinical characteristics. Trans R Soc Trop Med Hyg.104, 202-6.
doi: 10.1016/j.trstmh.2009.05.018.
7. BEUGIN, M. P., O. SALVADOR, G. LEBLANC, G. QUENEY, E. NATOLI, D. PONTIER (2019.): Hybridization between *Felis silvestris silvestris* and *Felis silvestris catus* in two contrasted environments in France. Ecology and Evolution.10, 263–276.
doi: 10.1002/ece3.5892.
8. CHOU, L. F., H. Y. YANG, C. C. HUNG, Y. C. TIAN, S. H. HSU, C. W. YANG (2023): Leptospirosis kidney disease: Evolution from acute to chronic kidney disease. Biomed J. 46,100595.
doi: 10.1016/j.bj.2023.100595.
9. FAINE, S., B. ADLER, C. BOLIN, P. PÉROLAT (1999):“Leptospira“ and leptospirosis Second Edition. MedSci, Melbourne, Vic. Australia. Melbourne, Australia, str. 272.
10. HAAKE, D. A., P. N. LEVETT (2015): Leptospirosis in humans. Curr Top Microbiol Immunol.387, 65-97.
doi: 10.1007/978-3-662-45059-8_5.

11. HAAKE, D. A., G. CHAO, R. L. ZUERNER, J. K. BARNETT, D. BARNETT, M. MAZEL, J. MATSUNAGA, P. N. LEVETT, C. A. BOLIN (2000): The leptospiral major outer membrane protein *LipL32* is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun.*68, 2276-85.
doi: 10.1128/IAI.68.4.2276-2285.2000.
12. HARTMAN, E. G., T. S. G. A. M. VAN DEN INGH, J. ROTHUIZEN (2020): Clinical, pathological and serological features of spontaneous canine leptospirosis. An evaluation of the IgM- and IgG-specific ELISA. *Vet Immunol Immunopathol.*13, 261-271.
doi: 10.1016/0165-2427(86)90078-4.
13. INADA, R., Y. IDO (1915): Eine zusammenfassende mitteilung über die Entdeckung des Erregers (eine neue Spezies Spirochaeta) der Weilschen Krankheit. Tokyo. *Ijishinski.* Nr. 1808, (Citirano iz GSELL, O. (1952): *Leptospirosen.* Medicinischer Verlag Hans Huber, Bern).
14. MARKOVICH, J. E., L. ROSS, E. MCCOBB (2012): The prevalence of leptospiral antibodies in free roaming cats in Worcester County, Massachusetts, *Vet Intern Med.*3, 688-9.
doi: 10.1111/j.1939-1676.2012.00900.x.
15. MAZZOTA, E., L. BELLINATI, C. BERTASIO, M. B. BONIOTTI, L. LUCCHESI, L. CEGLIE, F. MARTIGNAGO, S. LEOPARDI, A. NATALE (2023): Synanthropic and Wild Animals as Sentinels of Zoonotic Agents: A Study of *Leptospira* Genotypes Circulating in Northeastern Italy. *Int J Environ Res Public Health.* 20, 3783.
doi: 10.3390/ijerph20053783.
16. MODRIĆ, Z. (1978): Prirodna i eksperimentalna leptospiroza u mačke. *Vet. arhiv.* 48, 147- 156.
17. MODRIĆ, Z., S. BAMBIR, R. SABOČANEC (1981): Leptospiroza u domaće mačke (*Felis domestica* *Briss.*) u Baranji. *Vet. arhiv.* 51, 167-173
18. MODRIĆ, Z., B. KATALINIĆ, N. KNEŽEVIĆ, K. MATANOVIĆ (2010): Istraživanja leptospiroze u domaće mačke (*Felis domestica* *Briss.*) u Hrvatskoj. *Veterinarska stanica* 6, 563-566.

19. MURILLO, A., R. CUENCA, E. SERRANO, G. MARGA, A. AHMED, S. CERVANTES, C. CAPARROS, V. VIEITEZ, A. LADINA, J. PASTOR (2020): *Leptospira* Detection in Cats in Spain by Serology and Molecular Techniques. *Int J Environ Res Public Health*.17,1600.
doi: 10.3390/ijerph17051600.
20. PAZ, L. N., C. HAMOND, M. H. PINNA (2021): Detection of *Leptospira interrogans* DNA in Urine of a Captive Ocelot (*Leopardus pardalis*). *Int J Environ Res Public Health*.18, 793.
doi: 10.3390/ijerph18020793.
21. REIS, R. B., G. S. RIBEIRO, R. D. M. FELZEMBURGH, F. S. SANTANA, S. MOHR, A. X. T. O. MELENDEZ, A. C. SANTOS, R. R. RAVINES, W. S. TASSINARI, M. S. CARVALHO, M. G. REIS, A. I. KO (2008): Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. *PLoS Negl Trop Dis*.2, 228.
doi: 10.1371/journal.pntd.0000228.
22. RISTOW, P., P. BOURHY, S. KERNEIS, C. SCHMITT, M. C. PREVOST, W. LILENBAUM, M. PICARDEAU (2008): Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology (Reading)*. 154(Pt 5),1309-1317.
doi: 10.1099/mic.0.2007/014746-0.
23. RODRIGUEZ, J., M. C. BLAIS, C. LAPOINTE, J. ARSENAULT, L. CARIOTO, J. HAREL (2014): Serologic and urinary PCR survey of leptospirosis in healthy cats and in cats with kidney disease, *J Vet Intern Med*.2, 284-93.
doi: 10.1111/jvim.12287.
24. SCHULLER, S., T. FRANCEY, K. HARTMANN, M. HUGONNARD, B. KOHN, J. E. NALLY, J. SYKES (2015): European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *J Small Anim Pract*.56,159-79.
doi: 10.1111/jsap.12328.
25. SPRIßLER, F., P. JONGWATTANAPISAN, S. LUENGYOSLUECHAKUL, R. PUSOONTHORNTHUM, N. PRAPASARAKUL, A. KURILUNG, M. GORIS, A. AHMED, S. REESE, M. BERGMANN, R. DORSCH, H. L. B. M. KLAASEN, K. HARTMANN (2019): *Leptospira* infection and shedding in cats in Thailand. *Transbound Emerg Dis*.2, 948-956.
doi: 10.1111/tbed.13110.

26. STODDARD, R. A., J. E. GEE, P. P. WILKINS, K. MCCAUSTLAND, A. R. HOFFMASTER (2009): Detection of pathogenic *Leptospira spp.* through TaqMan polymerase chain reaction targeting the *LipL32* gene. *Diagn Microbiol Infect Dis.*64, 247-255.
doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014.
27. SYKES, J. E., T. FRANCEY, S. SCHULLER, R. A. STODDARD, L. D. COWGILL, G. E. MOORE (2023): Updated ACVIM consensus statement on leptospirosis in dogs. *J Vet Intern Med.*37,1966-1982.
doi: 10.1111/jvim.16903.
28. TURK, N., Z. MILAS, J. MARGALETIĆ, V. STAREŠINA, A. SLAVICA, N. RIQUELME-SERTOUR, E. BELLENGER, G. BARANTON, D. POSTIĆ (2003): Molecular characterization of *Leptospira spp.* strains isolated from small rodents in Croatia. *Epidemiol. Infect.*130, 159–166.
doi: 10.1017/S0950268802008026.
29. UHLENHUTH, P., W. FROMME (1915): Weitere experimentelle Untersuchungen über die sog. Weilsche Krankheit. *Med. Klin.* 11, 1264 (Citirano iz FAINE, S., B. ADLER, C. BOLIN, P. PÉROLAT (1999): *Leptospira* and Leptospirosis, Second Edition, MediSci, Melbourne, Australia).
30. WANG, S., M. A. STOBART GALLAGHER, N. DUNN (2022): Leptospirosis. Bookshelf ID: NBK441858PMID: 28722888.
31. WEIL, A. (1886): Über eigentümliche, mit Milztumor, Ikterus und Nephritis einhergehende acute Infektionskrankheit. *Dtsch. Arch. Klin. Med.*39, 209. (Citirano iz FAINE, S., B. ADLER, C. BOLIN, P. PEROLAT (1999): *Leptospira* and Leptospirosis, Second Edition, MediSci, Melbourne, Australia).
32. 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. *J Feline Med Surg.*4, 470-476.
doi: 10.1177/1098612X16634389.
33. YAMAGUCHI, N., C. A. DRISCOLL, A. C. KITCHENER, J. M. WARD, D. MACDONALD (2004): Craniological differentiation between European wildcats (*Felis silvestris silvestris*), African wildcats (*F. s. lybica*) and Asian wildcats (*F. s. ornata*): Implications for their evolution and conservation. *Biological Journal of the Linnean Society* 83, 47–63.

doi: 10.1111/j.1095-8312.2004.00372.x.

34. ZAHARIJA, I., J. FALIŠEVAC, B. BORČIĆ, Z. MODRIĆ (1982): Leptospiroze: 30-godišnje istraživanje i izučavanje u SR Hrvatskoj. Zagreb: JUMENA.

8. SAŽETAK

Potencijal domaće i divlje mačke kao rezervoara bakterije *Leptospira* spp.

Leonarda Čagljević

Leptospiroza je najraširenija zoonoza u svijetu i bolest prirodnih žarišta, čiji su do sad jedini utvrđeni rezervoari glodavci. Leptospiroza je u pravilu akutna septikemijska bolest domaćih i divljih životinja ali i ljudi uzrokovana patogenim bakterijama *Leptospira* spp. Zbog svoje kompleksne epizootologije i nedovoljno zabilježenih podataka o domaćim i divljim mačkama kao potencijalnim rezervoarima leptospiroze, provedeno je istraživanje u koje je uključeno ukupno četrdeset uzoraka bubrega, od toga osamnaest uzoraka bubrega divljih mačaka i dvadeset i dva uzorka bubrega domaćih mačaka. Uz neotkriveno pitanje konačnog broja vrsta životinja kao rezervoara leptospiroze, ovu bolest odlikuje rekonvalescentno kliconoštvo, velike divergencije kliničke slike i dugotrajno održavanje bakterija u tlu, vegetaciji i vodi, što predstavlja dodatni problem u dijagnosticiranju bolesti i prikupljanju svih potrebnih podataka o rezervoarima. Prikupljeni uzorci bubrega su u istraživačkom radu u sedmomjesečnom periodu homogenizirani, iz njih je izolirana DNA *NucleoSpin® Tissue* metodom te je nakon izrade glavne smjese potrebne za provođenje lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (*RealTime* PCR), pojedini uzorak izolirane DNA bio pomiješan s pripremljenom smjesom i kao takav bio spreman za analizu u *Rotor-Gene Q* PCR uređaju. Nakon provedene izolacije DNA i obrade uzoraka molekularnom metodom *RealTime* PCR, utvrđeno je kako niti jedan uzorak bubrega divljih mačaka nije bio pozitivan na infekciju *Leptospira* spp., dok je u domaćih mačaka dokazan jedan pozitivan uzorak na infekciju *Leptospira* spp. Iako dobiveni negativni rezultati opovrgavaju činjenicu da bi divlje mačke potencijalno uz glodavce, zbog svojih životnih i predatorskih tendencija, mogle biti rezervoari bakterije *Leptospira* spp., ovu hipotezu potrebno je dodatno istražiti, uzimajući u obzir veće uzorke populacije i širu geografsku rasprostranjenost potencijalnih rezervoara. Dokaz *Leptospira* spp. u uzorku bubrega domaće mačke implicira na njihov potencijal rezervoara ove bolesti, iako to ovim istraživanjem nije potvrđeno na temelju samo jednog pozitivnog uzorka.

Ključne riječi: *Leptospira* spp., leptospiroza, domaća mačka, divlja mačka, rezervoari, PCR

9. SUMMARY

Potential of domestic and wild cats as reservoirs of *Leptospira* spp.

Leonarda Čagljević

Leptospirosis is a zoonosis occurring worldwide, caused by pathogenic spirochaetes *Leptospira* spp. The only known reservoirs for this disease so far are rodents. In most recorded cases, leptospirosis is an acute septicemic disease of domestic and wild animals, as well as humans. Due to its complex epizootiology and insufficient recorded data on domestic and wild cats as potential reservoirs of leptospirosis, a study was conducted that included a total of forty kidney samples, of which eighteen kidney samples were of wild cats and twenty-two kidney samples were of domestic cats. In addition to the undiscovered finite number of animal species as reservoirs of leptospirosis, this disease is characterized by convalescent carrier-state, large divergences of the clinical symptoms and long-term maintenance of bacteria in the soil, vegetation and water, which represents an additional problem in the diagnosis of the disease and the collection of all necessary data on the reservoirs. The collected kidney samples were homogenized during the seven-month research period, their DNA was isolated using the *NucleoSpin® Tissue* method, and after the preparation of the main mixture required for conducting real-time polymerase chain reaction (*RealTime* PCR), every single sample of the isolated DNA was mixed with the prepared mixture, and as such was ready for analysis in the *Rotor-Gene Q* PCR machine. After DNA isolation and sample processing using the *RealTime* PCR molecular method, it was determined that not a single sample of the wild cat kidney was positive, meaning no *Leptospira* spp. was discovered in samples. Only one domestic cat kidney sample was tested positive. Although the obtained negative results refute the fact that wild cats could potentially, in addition to rodents, due to their lifestyle and predatory tendencies, to be reservoirs of *Leptospira* spp., this hypothesis needs to be further investigated, taking into account larger population samples and a wider geographical distribution of potential reservoirs. The evidence of *Leptospira* spp. in a kidney sample of a domestic cat implies that they could be the potential reservoir of this disease, although it was not confirmed by this research based on only one positive sample.

Key words: *Leptospira* spp., leptospirosis, domestic cat, wild cat, reservoir, PCR

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu, 7. lipnja 1999. godine, gdje sam i odrasla. Pohađala sam Osnovnu školu Sesvetska Sela i 2014. godine upisala opću Gimnaziju Tituša Brezovačkog. Nakon završetka srednje škole s odličnim uspjehom, upisala sam integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom fakultetskog obrazovanja bila sam volonter na Klinici za unutarnje bolesti i radila kao demonstrator na više različitih kolegija.