

# Serološka i molekularna tipizacija sojeva leptospira izdvojenih iz mišolikh glodavaca

---

Crnjac, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:178:702194>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-01**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom

Luka Crnjac

Serološka i molekularna tipizacija  
sojeva leptospira izdvojenih iz  
mišolikih glodavaca

Diplomski rad

Zagreb, 2020.



Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za leptospire, Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Predstojnik: prof. dr. sc. Zoran Milas

Mentorica: Doc. dr. sc. Josipa Habuš

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Zoran Milas
2. Izv. prof. dr. sc. Zrinka Štritof
3. Doc. dr. sc. Josipa Habuš
4. Izv. prof. dr. sc. Suzana Hađina (zamjena)

*Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Josipi Habuš na znanstvenom i stručnom vodstvu,  
te podršci i izdvojenom vremenu tijekom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujem se dr. sc. Vesni Mojčec Perko, Branki Križanić i Maji Štrkalj, kao i ostalim  
djelatnicima Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom na ugodnom radnom  
okruženju i stručnoj pomoći prilikom izvođenja praktičnog dijela rada.*

*Zahvaljujem se svojoj obitelji na neizmjerljivoj potpori i financijskoj podršci tijekom studiranja,  
kao i djevojci na ljubavi i razumijevanju.*

*Veliko hvala mom starijem bratu Marku koji je bio sa mnom tijekom najljepših  
i najtežih etapa studija.*

**PRILOZI**

## POPIS KRATICA

5' i 3' - nekodirajući krajevi molekule DNK

A - adenin

adk - gen koji kodira adenilat kinazu

bp - bazni par

C - citozin

CAAT - unakrižna aglutinacija i adsorpcija (engl. Cross-agglutination absorption test)

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

dNTP - deoksinukleotid trifosfati

EB - etidijev bromid

EDTA - etil-diamin-tetra-aminooctena kiselina

ELISA - imunoenzimski apsorpcijski test (engl. Enzyme linked immunosorbent assay)

G - gvanin

icdA - gen koji kodira izocitrat dehidrogenazu

KIT - Koninklijk Instituut voor de Tropen, Amsterdam, Nizozemska

LipL32 - gen koji kodira lipoprotein vanjske ovojnice LipL32

LipL41 - gen koji kodira lipoprotein vanjske ovojnice LipL41

LPHS - leptospirozni plućni hemoragijski sindrom

LPS - lipopolisaharid (engl. Lipopolysaccharide)

MAT - mikroskopska aglutinacija

MLST - tipiziranje na osnovi multilokusnih sekvenci (engl. Multilocus sequence typing)

NaCl - natrijev klorid

PBS - fosfatni pufer (eng. phosphate buffer saline)

PCR - lančana reakcija polimerazom (engl. Polymerase chain reaction)

PFGE - gel elektroforeza u pulsirajućem polju (engl. Pulsed field gel electrophoresis)

PU/PD - sindrom poliurije/polidipsije

RH - Republika Hrvatska

RNK - ribonukleinska kiselina

rpm – broj okretaja u minuti (engl. Revolutions per minute)

rrs2 - ribosomski gen za 16S

secY - gen koji kodira preproteinsku translokazu secY

T - timin

VNTR - polimorfizam broja uzastopno ponovljenih sekvenci (engl. Variable number of tandem repeats)

WHO - Svjetska zdravstvena organizacija (engl. World Health Organization)



## POPIS SLIKA

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Slika 1.</b>  | Bakterija roda <i>Leptospira</i> . Slikano elektronskim mikroskopom. ....   | 7  |
| <b>Slika 2.</b>  | Epizootiološki ciklus leptospire. (FAISAL i sur., 2012.) .....  | 8  |
| <b>Slika 3.</b>  | Izgled leptospira pod mikroskopom s tamnim vidnim poljem.....   | 16 |
| <b>Slika 4.</b>  | Mikrotitracijska plitica sa V dnom na kojoj je naznačeno najveće razrjeđenje seruma.....  | 28 |
| <b>Slika 5.</b>  | Snimak gela nakon elektroforeze.....  | 37 |
| <b>Slika 6.</b>  | Zastupljenost vrsta glodavaca iz kojih su izdvojeni izolati u ukupnim izolatima korištenim tijekom ovog istraživanja. ....  | 48 |
| <b>Slika 7.</b>  | Zastupljenost izdvojenih izolata iz pojedinih lokaliteta korištenih u ovom istraživanju. ....   | 49 |
| <b>Slika 8.</b>  | Odnos spolova domaćina iz kojih su izdvojeni izolati koji su korišteni u ovom istraživanju. ....  | 49 |
| <b>Slika 9.</b>  | Zastupljenost seroloških skupina u svim izolatima korištenim u ovom istraživanju. ....  | 53 |
| <b>Slika 10.</b> | Zastupljenost pojedinih seroloških skupina u izolatima izdvojenim iz prugastog poljskog miša tijekom ovog istraživanja. ....  | 54 |
| <b>Slika 11.</b> | Zastupljenost pojedinih seroloških skupina u izolatima izdvojenim iz običnog šumskog miša tijekom ovog istraživanja. ....   | 54 |
| <b>Slika 12.</b> | Zastupljenost pojedinih seroloških skupina u izolatima izdvojenim iz žutogrih miševa tijekom ovog istraživanja. ....  | 55 |
| <b>Slika 13.</b> |   |    |
|                  | <b>A.</b> Zastupljenost pojedinih seroloških skupina u izolatima izdvojenim iz šumskih voluharica tijekom ovog istraživanja. ....                                   | 55 |
|                  | <b>B.</b> Zastupljenost pojedinih seroloških skupina u izolatima izdvojenim iz običnih voluharica tijekom ovog istraživanja. ....                                   | 55 |
| <b>Slika 14.</b> | Zastupljenost pojedinih seroloških skupina kod izolata pretraženih tijekom ovog istraživanja na lokalitetu Lipovljani. ....   | 56 |
| <b>Slika 15.</b> | Zastupljenost pojedinih seroloških skupina kod izolata pretraženih tijekom ovog istraživanja na lokalitetu Novoselec, Žutica. ....                                  | 56 |
| <b>Slika 16.</b> | Filogenijsko stablo dobiveno analizom odsječka <i>SecY</i> gena veličine 245 bp pretražvanih izolata, referentnih sojeva i već determiniranih lokalnih sojeva. .... | 58 |

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Slika 17.</b> | Odnos genomskih vrsta izolata pretraženih u ovom istraživanju pomoću filogenijske analize 245 bp secY gena. ....  | 59 |
| <b>Slika 18.</b> |   |    |
|                  | <b>A.</b> Serološke skupine ustanovljene unutar genomske skupine <i>L. kirschneri</i> u izolata izdvojenih iz mišolikih glodavaca na području Republike Hrvatske (n=33).....  | 60 |
|                  | <b>B.</b> Serološke skupine ustanovljene unutar genomske skupine <i>L. interrogans</i> u izolata izdvojenih iz mišolikih glodavaca na području Republike Hrvatske (n=33).....   | 60 |
| <b>Slika 19.</b> | Filogenijsko stablo prema analizi pretraženih izolata, prethodno tipiziranih Lokalnih sojeva i referentnih sojeva, dobiveno pomoću Neighbour joining algoritma i „Tamura-Nei“ modela uz „Gamma“ distribuciju i 1000 „Bootstrap“ poduzorkovanja. S naknadno označenim pripadnostima istraživanih izolata određenim serološkim skupinama. ....            | 61 |
| <b>Slika 20.</b> | Filogenijsko stablo prema analizi pretraženih izolata, prethodno tipiziranih lokalnih sojeva i referentnih sojeva koji pripadaju serološkoj skupini Australis. Dobiveno pomoću Neighbour joining algoritma i Tamura 3 parametra uz „Gamma“ distribuciju s 1000 „Bootstrap“ poduzorkovanja. Skala na dnu slike označava evolucijsku udaljenost. ....     | 62 |
| <b>Slika 21.</b> | Filogenijsko stablo prema analizi pretraženih izolata, prethodno tipiziranih lokalnih sojeva i referentnih sojeva koji pripadaju serološkoj skupini Pomona. Dobiveno pomoću Neighbour joining algoritma i Tamura 3 parametra uz „Gamma“ distribuciju s 1000 „Bootstrap“ poduzorkovanja.....   | 63 |
| <b>Slika 22.</b> | Filogenijsko stablo prema analizi pretraženih izolata, prethodno tipiziranih Lokalnih sojeva i referentnih sojeva koji pripadaju serološkoj skupini Grippotyphosa. Dobiveno pomoću Neighbour joining algoritma i Tamura 3 parametra uz „Gamma“ distribuciju s 1000 „Bootstrap“ poduzorkovanja. Skala na dnu slike označava evolucijsku udaljenost. .... | 64 |
| <b>Slika 23.</b> | Filogenijsko stablo prema analizi pretraženih izolata, prethodno tipiziranih lokalnih sojeva i referentnih sojeva koji pripadaju serološkoj skupini Bataviae. Dobiveno pomoću Neighbour joining algoritma i Tamura 3 parametra uz „Gamma“ distribuciju s 1000 „Bootstrap“ poduzorkovanja. Skala na dnu slike označava evolucijsku udaljenost.....       | 65 |

## POPIS TABLICA

|                    |   |    |
|--------------------|---|----|
| <b>Tablica 1.</b>  | Genomska klasifikacija leptospira.....  | 6  |
| <b>Tablica 2.</b>  | Odnos serovara sa rezervoarima/evolucijskim domaćinima leptospire. ....   | 9  |
| <b>Tablica 3.</b>  | Svi izolati Arhive Laboratorija za leptospire Veterinarskog fakulteta porijekom od mišolikih glodavaca. ....                                      | 23 |
| <b>Tablica 4.</b>  | Sastojci za proizvodnju Korthofove tekuće hranjive podloge. ....  | 26 |
| <b>Tablica 5.</b>  | Referentni sojevi leptospira čiji su hiperimuni serumi rabljeni za određivanje serološke skupine izdvojenih izolata leptospira.....               | 29 |
| <b>Tablica 6.</b>  | Izolati odabrani za genotipizaciju.....   | 31 |
| <b>Tablica 7.</b>  | Referentni sojevi leptospira korišteni u procesu genotipizacije.....  | 39 |
| <b>Tablica 8.</b>  | Sekvence preuzete iz doktorskog rada Habuš, 2014: „Genetska sljedivost patogenih bakterija roda leptospira u prirodnom žarištu leptospiroze“..... | 40 |
| <b>Tablica 9.</b>  | Odabrani uzorci za tipiziranje multilokusnim sekvencama. ....   | 41 |
| <b>Tablica 10.</b> | MLST: ciljni geni, početnice i očekivane veličine umnoženih proizvoda. ....   | 42 |
| <b>Tablica 11.</b> | MLST: geni i temperature spajanja. ....   | 44 |
| <b>Tablica 12.</b> | Referentni sojevi leptospira rabljeni u filogenijskim analizama (MLST). ....  | 46 |
| <b>Tablica 13.</b> | Prikaz pretraženih izolata, njihovog porijekla i rezultati pretraživanja hiperimunim serumima. ....   | 50 |

# SADRŽAJ:

|  |          |
|--|----------|
| <b>1. UVOD.....</b>  | <b>1</b> |
| <b>2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....</b> | <b>4</b> |
| 2.1. LEPTOSPIROZA.....                                     | 5        |
| 2.1.1. ETIOLOGIJA LEPTOSPIROZE .....                       | 5        |
| 2.1.1.1. Morfologija i uzgojna svojstva .....              | 7        |
| 2.1.2. EPIZOOTIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA LEPTOSPIROZE ..... | 8        |
| 2.1.2.1. Leptospiroza u svijetu .....                      | 11       |
| 2.1.2.2. Leptospiroza u Republici Hrvatskoj .....          | 11       |
| 2.1.3. PATOGENEZA.....                                     | 12       |
| 2.1.4. KLINIČKA SLIKA .....                                | 13       |
| 2.1.4.1. Leptospiroza u domaćih životinja .....            | 13       |
| 2.1.4.1.1. Psi.....  | 13       |
| 2.1.4.1.2. Mačke.....                                      | 14       |
| 2.1.4.1.3. Konji.....                                      | 14       |
| 2.1.4.1.4. Goveda.....                                     | 14       |
| 2.1.4.1.5. Koze i ovce .....                               | 14       |
| 2.1.4.1.6. Svinje.....                                     | 14       |
| 2.1.4.2. Leptospiroza u čovjeka .....                      | 15       |
| 2.1.5. DIJAGNOSTIKA .....                                  | 15       |
| 2.1.5.1. Dokazivanje uzročnika.....                        | 15       |
| 2.1.5.1.1. Izravni dokaz leptospira .....                  | 16       |
| 2.1.5.1.2. Izdvajanje uzročnika .....                      | 16       |
| 2.1.5.3. Molekularne metode .....                          | 17       |
| 2.1.5.4. Serološke metode.....                             | 17       |
| 2.1.5.4.1. Mikroskopska aglutinacija (MAT) .....           | 18       |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.1.6. LIJEČENJE I PREVENCIJA.....   | 18        |
| 2.2. TAKSONOMIJA I FILOGENIJSKI ODNOSI UNUTAR RODA LEPTOSPIRA.....   | 19        |
| 2.2.1. TAKSONOMIJA LEPTOSPIRA.....   | 19        |
| <b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>  | <b>21</b> |
| 3.1. SEROLOŠKA TIPIZACIJA.....   | 22        |
| 3.1.1. ODABIR IZOLATA ZA SEROLOŠKU DETERMINACIJU.....  | 22        |
| 3.1.2. UZGOJ LEPTOSPIRA.....   | 26        |
| 3.1.3. POHRANA IZOLATA.....  | 27        |
| 3.1.4. ODREĐIVANJE SEROLOŠKE SKUPINE.....  | 27        |
| 3.2. MOLEKULARNA TIPIZACIJA.....   | 30        |
| 3.2.1. ODABIR IZOLATA ZA GENOTIPIZACIJU.....   | 30        |
| 3.2.2. IZDVAJANJE DNK IZ KULTURE LEPTOSPIRA.....   | 32        |
| 3.2.3. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM (PCR).....   | 33        |
| 3.2.3.1. PCR pozitivne kontrole.....   | 35        |
| 3.2.4. ELEKTROFOREZA U GELU.....   | 36        |
| 3.2.5. RAČUNALNA OBRADA ELEKTROFEROGRAMA I FILOGENIJSKA<br>ANALIZA.....  | 38        |
| 3.3. METODA TIPIZIRANJA NA OSNOVI MULTILOKUSNIH SEKVENCI (MLST).....   | 41        |
| 3.3.1. ODABIR IZOLATA PRETRAŽIVANIH METODOM TIPIZIRANJA NA<br>OSNOVI MULTILOKUSNIH SEKVENCI (MLST).....        | 41        |
| 3.3.2. METODA TIPIZIRANJA NA OSNOVI MULTILOKUSNIH SEKVENCI<br>(MLST).....                                      | 42        |
| <b>4. REZULTATI.....</b>   | <b>47</b> |
| 4.1. ANALIZA PODATAKA O PRIKUPLJENIM IZOLATIMA.....  | 48        |
| 4.2. ODREĐIVANJE SEROLOŠKE SKUPINE.....  | 50        |
| 4.3. ODREĐIVANJE GENOMSKE VRSTE IZOLATA UMNAŽANJEM I<br>FILOGENIJSKOM ANALIZOM 245 BP ODSJEČAKA secY GENA..... | 57        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.4. TIPIZIRANJE NA OSNOVI MULTILOKUSNIH SEKVENCI (MLST)..... | 60        |
| <b>5. RASPRAVA.....</b>                                       | <b>66</b> |
| <b>6. ZAKLJUČCI .....</b>                                     | <b>70</b> |
| <b>7. LITERATURA .....</b>                                    | <b>72</b> |
| <b>8. SAŽETAK .....</b>                                       | <b>83</b> |
| <b>9. SUMMARY.....</b>  | <b>85</b> |
| <b>10. ŽIVOTOPIS .....</b>                                    | <b>87</b> |

# **1. UVOD**

Leptospiroza je (re)emergentna zoonoza uzrokovana heterogenom skupinom patogenih bakterija svrstanih u rod *Leptospira*. Uzročnici bolesti su bakterije spiralnog oblika koje se prenose izravno ili neizravno, a u organizam ulaze kroz sluznice, oštećenja na koži, ali i kroz neoštećenu, vodom omekšanu kožu (REIS i sur., 2008.). Glavni izvor leptospira predstavljaju glodavci (rezervoari leptospiroze) te pojedine domaće životinje (evolucijski domaćini) kod kojih nakon infekcije dolazi do vremenski ograničenog ili trajnog naseljavanja leptospira unutar proksimalnih bubrežnih kanalića (FAINE i sur., 1999.).

S obzirom na međudnos s leptospirama, životinje se dijele na rezervoare, evolucijske i slučajne domaćine. Većina serovara patogenih leptospira prilagodila se infekciji pojedine životinjske vrste koja joj služi kao rezervoar, a ovisno o tome koje vrste životinja održavaju patogene leptospire na određenom području razlikujemo arhaična (mišoliki glodavci), sinatotropna (štakori) i antropourgična (domaće životinje) prirodna žarišta. Za razliku od životinja koje mogu biti rezervoari ili pak slučajni domaćini, ljudi su uvijek slučajni domaćini koji se inficiraju jednim od serovara koji kruže u njihovom okolišu.

Klinička slika leptospiroze je vrlo raznolika, a ovisi o infektivnoj dozi te virulenciji serovara ili soja leptospire koji je uzrokovao bolest, kao i o prijemljivosti inficirane vrste, te njezinom imunosnom statusu, (LEVETT, 2001.). U svih vrsta domaćih i divljih životinja, te ljudi moguće su inaparentne infekcije ili blagi slučajevi leptospiroze sa nespecifičnim simptomima, kao i teški oblici bolesti.

Zbog izrazite heterogenosti roda *Leptospira*, kompleksne epizootologije i raznolike kliničke slike dijagnostika leptospiroze nije jednostavna. Za dijagnostiku i tipizaciju leptospira tako se koriste serološke i molekularne metode koje imaju različite prednosti i mane (LEVETT, 2001., LEVETT, 2004.; SCHREIER i sur., 2013.). Serološke metode su bitne za određivanja serovara o kojem ovisi određivanje i suzbijanje izvora infekcije, a dijelom i predviđanje kliničke pojavnosti, te proizvodnja odgovarajućih vakcina (FAINE i sur., 1999.). S druge strane, molekularnim metodama određuje se pripadnost leptospira genomskoj vrsti, što pruža uvid u stvarne filogenijske odnose leptospira (CERQUEIRA i PICARDEAU, 2009.), ali, s druge strane, one nam ne koriste u razumijevanju epizootologije.



Leptospiroza se smatra jednom od globalno najrasprostranjenijih zaraznih bolesti, koja se javlja u više vrsta životinja i ljudi. U Republici Hrvatskoj postoje određene specifičnosti vezane uz ovu zoonozu. Primjerice, Hrvatska se rangira na prvo mjesto u Europi i 13. mjesto na svijetu po brojnosti slučajeva leptospiroze u ljudi (PAPPAS i sur., 2008.; VIJAYACHARI i sur., 2008.). Također, postoje razlike i u vjerojatno infektivnim serološkim skupinama; u Europi najčešći uzročnici leptospiroze u ljudi su serovari iz seroloških skupinina Icterohaemorrhagiae i Grippotyphosa, dok u Republici Hrvatskoj infekcije ljudi većinom uzrokuju serovari koji spadaju u serološku skupinu Australis i Sejroe (BALAN TOPIĆ i sur., 2010.; BARANTON i POSTIC, 2006.; CICERONI i sur., 2000.; HABUŠ i sur. 2017.; JANSEN i sur., 2005.; OBIEGALA i sur., 2016.). Dosadašnja istraživanja pokazuju da navedene serološke skupine u našem području održavaju mišoliki glodavci unutar arhaičnih prirodnih žarišta. Za potpuno razumijevanje epizootologije i epidemiologije leptospiroze na našem geografskom području nužno je utvrditi koje serovare tih seroloških skupina održavaju koje vrste mišolikih glodavaca.

U vezi s navedenim, cilj ovog istraživanja je serološki i molekularno tipizirati sojeve leptospira izdvojene iz mišolikih glodavaca, te utvrditi povezanost određenih vrsta mišolikih glodavaca i pojedinih serovara *Leptospira* na teritoriju kontinentalne Hrvatske.

## **2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA**

## 2.1. LEPTOSPIROZA

### 2.1.1. ETIOLOGIJA LEPTOSPIROZE

Rod *Leptospira* je evolucijski i strukturno jedinstvena skupina bakterija koja taksonomski pripada porodici *Leptospiraceae* i redu *Spirochaetales*. Rod *Leptospira* čine saprofitske, intermedijarne i patogene vrste koje neko vrijeme mogu preživjeti u vlažnom tlu ili vodi u sklopu svog epizotološkog ciklusa. Saprofitske i intermedijarne vrste uglavnom neprestano žive u vodi ili vlažnom tlu, dok patogene u takvom okolišu preživljavaju jedno kraće ili duže vrijeme (RISTOW i sur., 2008.).

Smatra se da gotovo jedna trećina genoma saprofitske vrste *L. biflexa* izostaje u patogenim leptospirama. Fizička ograničenja koja su nametnuta visokom genskom gustoćom i ograničenom prisutnošću prenosivih elemenata razlog su minimalnog preslagivanja genomske DNK saprofitskih leptospira. Suprotno tome, u genomu patogenih vrsta leptospira preslagivanja su česta, a uključuju rekombinaciju i skraćivanje genoma (PICARDEAU i sur., 2008.). Navedeno je kroz vrijeme stvorilo izrazitu serološku heterogenost jer su se leptospire stalno prilagođavale raznim biotičkim, klimatskim i geografskim uvjetima. Iz toga razloga danas nalazimo jako raznoliku skupinu bakterija koje se na temelju antigenskih obilježja dijele na 320 serovara od kojih je 60 saprofitskih i intermedijarnih, a 260 patogenih. Sve one su svrstane u 29 seroloških skupina (DIKKEN i KMETY, 1978. ; KMETY i DIKKEN, 1993.). Valja napomenuti da je broj utvrđenih serovara u konstantnom porastu zbog stalnog mijenjanja površinskih antigena leptospira posebice lipopolisaharida vanjske ovojnice (HARTSKEERL i sur., 2006.). Prema genomskoj klasifikaciji, prikazanoj u Tablici 1, razlikujemo 22 genomske vrste koje su podijeljene u 10 patogenih, 5 intermedijarnih i 7 saprofitskih vrsta (PICARDEAU, 2017.).

Najveći napredak u razumijevanju genoma i filogenijskih odnosa bakterija iz roda *Leptospira* postignut je sekvencioniranjem i usporedbom genoma vrsta *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* i *L. biflexa* (BULACH i sur., 2006.; PICARDEAU i sur., 2008.; REN i sur., 2003.). U životnim ciklusima navedenih genomskih vrsta vidljive su velike razlike.

*L. biflexa* je najprimitivniji oblik koji živi kao saprofit u površinskim vodama ili vlažnom tlu, dok su *L. interrogans* i *L. borgpetersenii* patogene vrste, među kojima također postoje značajne razlike. Tako se može primijetiti da *L. interrogans* može preživjeti mnogo duže vrijeme u okolišu, naspram *L. borgpetersenii* (BULACH i sur., 2006.; XUE i sur., 2009.). Navedeno se objašnjava manjom veličinom genoma patogenih leptospira u odnosu na saprofitske, kao i znatno većim genomom *L. interrogans* u odnosu na *L. borgpetersenii*. Vjeruje se da *L. borgpetersenii* prolazi kroz proces smanjenja svog genoma što će dovesti do povećane ovisnosti o određenom rezervoaru (BULACH i sur., 2006.; HABUŠ, 2013.; XUE i sur., 2009.).

Potrebna je daljnja usporedba sekvenci genoma saprofitskih i patogenih sojeva leptospira, kako bi se odredili čimbenici virulencije uključeni u bolest, što će značajno pomoći u boljem razumijevanju bolesti (KO i sur., 2009.). Odnosno, vjeruje se da će identifikacija gena zajedničkih za dvije patogene vrste, *L. borgpetersenii* i *L. interrogans*, no odsutnih u saprofitskoj *L. biflexa*, pojasniti ulogu tih gena u patogenezi. (PICARDEAU i sur., 2008.). Jedni od takvih gena su i oni koji kodiraju LipL32; sastavni dio vanjske membrane leptospira koji se pojavljuje u isključivo patogenih sojeva, a smatra se da je najdominantnije izražen na stanici tokom infekcije (ADLER, 2014.; GREENE, 2012.; HAAKE i sur., 2000.).

**Tablica 1.** Genomska klasifikacija leptospira.

| Patogene vrste leptospira               | Intermedijarne vrste leptospira | Saprofitske vrste leptospira             |
|---|---------------------------------|--|
| <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><br>(genomospecies 3) |
| <i>L. noguchii</i>                      | <i>L. licerasiae</i>            | <i>L. vanthieli</i><br>(genomospecies 4) |
| <i>L. weilii</i>                        |                                 | <i>L. yanagawae</i><br>(genomospecies 5) |
| <i>L. alexanderi</i>                    |                                 | <i>L. vanthielli</i>                     |
| <i>L. alstonii</i><br>(genomospecies 1) |                                 |  |
| <i>L. kmetyi</i>                        |                                 |  |
| <i>L. mayottensis</i>                   |                                 |  |

### 2.1.1.1. Morfologija i uzgojna svojstva

Leptospire su obligatno aerobne, vrlo pokretljive bakterije spiralne građe. Optimalni uvjeti uzgoja patogenih leptospira su temperatura od 28 do 30 °C i pH od 7,2 do 7,6. Strukturno se sastoje od dva aksijalna filamenta oko kojih se uvija protoplazmatski cilindar, a završavaju sa kukicama na oba kraja (Slika 1). Duljine su od 6 do 20 µm, a širine od 0,1 do 0,2 µm. Po uzgojnim svojstvima može se reći da su leptospire izuzetno zahtjevne, sporo rastuće bakterije (KO i sur., 2009.). Za umnažanje leptospira, potrebne su tekuće i polutekuće hranidbene podloge obogaćene amonijevim solima, masnim kiselinama dugih lanaca, te vitaminima B1 i B12. Leptospire kao izvor dušika koriste amonijak, dok energiju i ugljik dobivaju beta-oksidacijom masnih kiselina dugih lanaca (HENNEBERRY i COX, 1970.). Za uzgoj leptospira, najčešće su korištene hranjive podloge sa dodatkom kunićjeg seruma koji služi kao dodatni izvor piruvata. To su hranidbene podloge prema Korthofu, Fletcheru i Stuartu (ELLINGHAUSEN i McCULLOUGH, 1965.; JOHNSON i HARRIS, 1967.). Prilikom primarnih izdvajanja mogu se dodati i antimikrobne tvari koje inhibiraju rast ostalih bakterija, od kojih se najčešće koristi 5-fluorouracil.



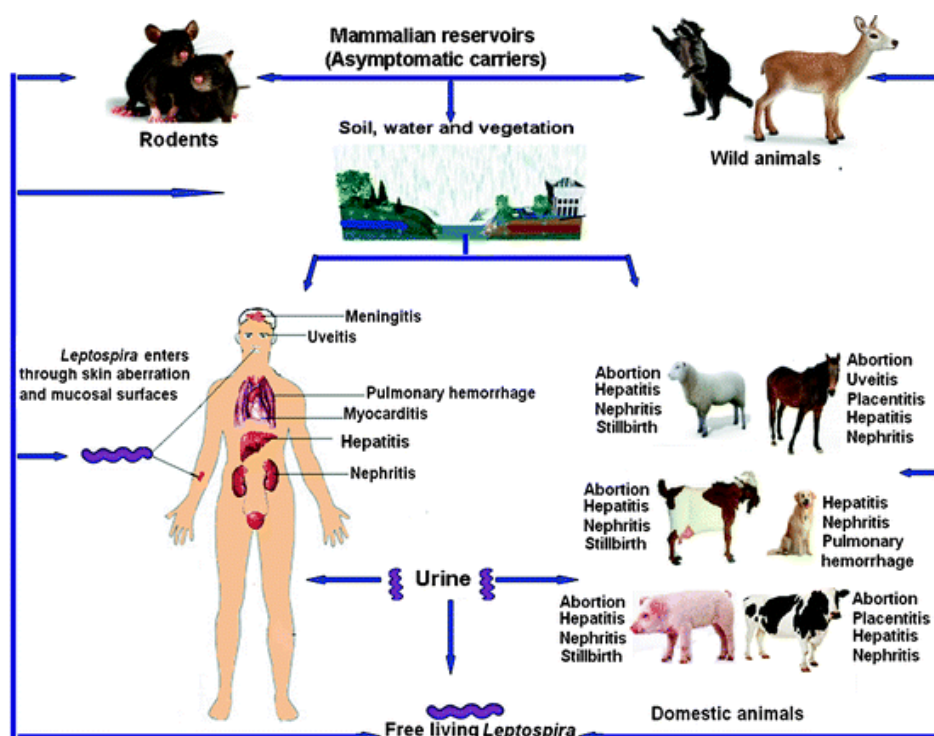
**Slika 1.** Bakterija roda *Leptospira*. Slikano elektronskim mikroskopom.

(Izvor: dr. Annabella Chang, Department of Microbiology, Monash University, Australia)

([https://www.researchgate.net/figure/Electron-microscopic-illustration-of-the-Leptospira-bacteria-Image-by-courtesy-of\\_fig1\\_36221519](https://www.researchgate.net/figure/Electron-microscopic-illustration-of-the-Leptospira-bacteria-Image-by-courtesy-of_fig1_36221519)).

## 2.1.2. EPIZOOTIOLOGIJA I EPIDEMIOLOGIJA LEPTOSPIROZE

Vjeruje se da patogeni serovari leptospire mogu inficirati ljude, različite životinje, uključujući morske i kopnene sisavce, te neke vrste vodozemaca i gmazova (BISCOLA i sur., 2011.; ROE i sur., 2010.). Do infekcije životinja ili ljudi dolazi putem izravnog kontakta sa infektivnim urinom ili neizravnim kontaktom preko kontaminirane vode ili tla (FAINE i sur., 1999.). Važno je napomenuti da mogućnost infekcije ovisi o virulentnosti uzročnika, kao i vrsti životinje, te njenom imunom stanju (LEVETT, 2001.). Ulazna vrata za leptospiru su rane nastale na koži ili rjeđe sluznicama, tipa oguljotina ili posjekotina (Slika 2). U nekim slučajevima neoštećena, vodom omekšana koža može biti ulazno mjesto uzročnika. Opisan je i vertikalni prijenos, međutim on je nije toliko značajan (REIS i sur., 2008.). Primarni izvor infekcije su leptospire naseljene u proksimalnim bubrežnim kanalčićima koje se povremeno ili stalno izlučuju u okoliš. Leptospire se na navedeni način mogu naseliti trajno ili vremenski ograničeno, ovisno o vrsti i prijemljivosti jedinke, te evolucijskoj prilagodbi vrste na bakterije iz porodice *Leptospiraceae* (HABUŠ, 2013.).



**Slika 2.** Epizootiološki ciklus leptospiroze (FAISAL i sur., 2012.)

([https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-5404-5\\_8](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-5404-5_8)).

S obzirom na međuodnos domaćina i leptospira, domaćini se mogu podijeliti na rezervoare, evolucijske i slučajne domaćine. Rezervoar je vrsta životinje koja se evolucijski u potpunosti prilagodila infekciji određenog serovara patogene leptospire (Tablica 2). Smatra se da se u rezervoara nakon infekcije ne dolazi do kliničkog očitovanja bolesti, već se uzročnik trajno naseljava u proksimalnim bubrežnim kanalićima, a domaćin postaje doživotni kliconoša.

Za leptospirozu, rezervoari su mišoliki glodavci, radi čega imaju posebno značenje u znanstvenim i kliničkim istraživanjima bolesti. Iako je do sad potvrđena jedino veza između pojedinih serovara i određenih životinjskih vrsta, neka novija istraživanja proučavaju i povezanost između pojedinih vrsta mišolikih glodavaca i genomskih vrsta *Leptospira*. Jedno od takvih istraživanja opisuje povezanost nekih genomskih vrsta (*L. borgpetersenii*) uz određenog domaćina (*Apodemus* spp.), dok navodi da su druge genomske vrste (*L. kirschneri*) dobro prilagođene širokoj grupi malih glodavaca (*M. glareolus*, *M. arvalis*, *A. flavicollis*, *A. agrarius*), sugerirajući da pojedine genomske vrste *Leptospira* imaju različit raspon domaćina (OBIEGALA i sur., 2016).

**Tablica 2.** Odnos serovara sa rezervoarima/evolucijskim domaćinima leptospire. (HABUŠ, 2013.)

(<https://www.bib.irb.hr/636540>)

| Rezervoari / evolucijski domaćini | Serovar                          |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| Štakor                            | Icterohaemorrhagiae, Copenhageni |
| Kućni miš                         | Saxkoebing                       |
| Poljska voluharica                | Grippotyphosa                    |
| Poljski miš                       | Pomona                           |
| Žutogrli miš                      | Bratislava                       |
| Svinja                            | Pomona, Tarassovi                |
| Govedo                            | Hardjo-bovis                     |
| Konji                             | Bratislava                       |
| Psi                               | Canicola                         |

Kod ostalih životinja evolucijski proces prilagodbe na određeni serovar leptospire počeo je davno kroz povijest, no još nije završio pa i dalje dolazi do kliničkog očitovanja bolesti i vremenski ograničenog kliconoštva. Kliničko očitovanje najčešće prate blagi i kratkotrajni simptomi, a praćeno je duljim ili kraćim kliconoštvom.

Slučajni domaćini baš kao što i njihovo ime govori su slučajno uključeni u epizootiološki/epidemiološki ciklus kruženja ovog patogena. Kod slučajnih domaćina proces prilagodbe još nije dovoljno napredovao, pa se očituju različiti i nerijetko teški klinički simptomi, nakon čega slijedi kratkotrajno izlučivanje uzročnika (rekonvalescentni kliconoše). U ovu skupinu spadaju i ljudi.

Smatra se da je rizik od oboljevanja životinja i ljudi u izravnoj vezi s brojnošću populacije rezervoara, odnosno glodavaca. Navedeno je osobito izraženo na gospodarstvima gdje se ne provode mjere deratizacije tijekom takozvanih “mišjih godina”, kada broj mišolikih glodavaca višestruko poraste (MARGALETIĆ i sur. , 2008.). Smatra se da je urod bukvice bitan faktor porasta populacije sitnih glodavaca (BJEDOV, 2015.). Osim izvora hrane, gustoća populacije rezervoara ovisiti će o meteorološkim uvjetima, staništu, prirodnim neprijateljima i bolestima kao i o fiziološkom stanju populacije (KORPIMAKI i KREBS, 1996.).

Kao što su se pojedine životinje više ili manje prilagodile infekcijama bakterija roda *Leptospira*, tako su se i pojedine leptospire prilagodile infekciji određenih domaćina, što čini leptospirozu zoonozom prirodno-žarišnog tipa, kod koje su se osnove biocenoze stvorile tijekom povijesti (ZAHARIJA i sur., 1982.). U zadnje vrijeme, biotočki čimbenici koji su utjecali na širenje leptospiroze se mijenjaju zbog promjene staništa ili uvođenja novih životinjskih vrsta. Tako su pojedine životinjske vrste počele živjeti u blizini ljudi (veliki gradovi), kao na primjer crni štakor ili kućni miš, dok su druga žarišta nastala intenzivnijim uzgojem domaćih životinja (VASYLIEVA i sur., 2017.). Žarišta vezana s uvođenjem domaćih životinja se nazivaju antropourgična, dok su ona vezana za suživot ljudi i štakora sinantropna. Primjer suživota su velika, gusto nastanjena naselja s lošim sanitarno-higijenskim uvjetima u kojima je česta infekcija ljudi sa serovarom *Icterohaemorrhagiae* (BALAN TOPIĆ i sur., 2010.; BARANTON i POSTIC, 2006.; CICERONI i sur., 2000.; HABUŠ i sur. 2017.; JANSEN i sur., 2005.). Uzmu li se pritom u obzir odgovarajući klimatski uvjeti i poplave, može se objasniti visoka incidencija leptospiroze praćena pojavom epidemija u zemljama tropskog pojasa ili siromašnim državama svijeta.



U posljednjim desetljećima takve su povećane incidencije i epidemije zabilježene u Brazilu, Tajlandu, Gvajani, Nikaragvi, itd. (DECHET i sur., 2012.; HABUŠ, 2017.; KO i sur., 1999.; LARAS i sur., 2002.). S druge strane u kontinentalnoj Hrvatskoj izgleda i dalje postoje arhaična prirodna žarišta u kojima su rezervoari leptospira razne vrste mišolikih glodavaca. Prijašnja istraživanja tako pokazuju da su najvažniji uzročnici leptospiroze kod ljudi u Hrvatskoj serovari koji spadaju u serološku skupinu Australis i Sejroe, za razliku od serovara seroloških skupina Icterohaemorrhagiae i Grippotyphosa u ostatku Europe (BALAN TOPIĆ i sur., 2010.; BARANTON i POSTIC, 2006.; CICERONI i sur., 2000.; HABUŠ i sur. 2017.; JANSEN i sur., 2005.; OBIEGALA i sur., 2016.). Navedeno se objašnjava postojanjem starih arhaičnih žarišta u Republici Hrvatskoj, nasuprot postojanju sinantropnih žarišta u drugim Europskim zemljama. Plavna područja uz rijeke Savu i Dravu su idealna za održavanje i širenje zaraze između jedinki, odnosno takvi prostori svojim klimatskim i hidrološkim uvjetima imaju jak utjecaj na pojavnost leptospiroze u Hrvatskoj (ČORDAŠ, 2019.; HABUŠ, 2013.; ŠTRITOF MAJETIĆ, 2010.; TURK i sur., 2009.; ZAHARIJA i sur., 1982.).

#### **2.1.2.1. Leptospiroza u svijetu**

Leptospiroza se smatra geografski najrasprostranjenijom zoonotskom bolešću u svijetu, zbog koje se godišnje prijavi više od pola milijuna slučajeva (KO i sur., 2009.; VIJAYACHARI i sur., 2008.). Iako se u prošlosti leptospiroza smatrala profesionalnom bolesti rudara, veterinaru i poljoprivrednika, u današnje vrijeme češće je povezana s rekreativnim aktivnostima na otvorenom, poput vodenih sportova i avanturističkih putovanja (JANSEN i sur., 2005.; MAYER-SCHOLL i sur., 2014.). U budućnosti se pak vjeruje, da će kućni ljubimci uz aktivnosti na otvorenom biti najznačajniji rizični faktori u prenošenju bolesti na ljude (MORI i sur., 2017.).

#### **2.1.2.2. Leptospiroza u Republici Hrvatskoj**

Od kad je leptospiroza u Hrvatskoj prvi put dokazana u psa 1926. godine (BABIĆ, 1927.), odnosno u ljudi 1935. godine (ANTUNOVIĆ-MIKAČIĆ, 1935.), bolest se pokazala značajnim problemom u državi. Danas se Republika Hrvatska ističe po najvećem broju slučajeva leptospiroze u ljudi u Europskoj Uniji, te kao trinaesta država po broju slučajeva u ljudi globalno (PAPPAS i sur., 2008.). Procjenjuje se da godišnje između od 100 do 300 ljudi obolijeva od leptospiroze, od čega prosječno jedan slučaj završava smrću (MARŠIĆ, 2017.).

### 2.1.3. PATOGENEZA

Patogeneza leptospiroze još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Uzrok tome može se, bar dijelom, pripisati podatku da i dalje nije poznata uloga većine gena u genomu leptospire (CULLEN i sur., 2002.). Čimbenici virulencije i dalje nisu potpuno objašnjeni, no može se zaključiti da je pokretljivost leptospira izuzetno bitna za ulazak i širenje kroz organizam (REN i sur., 2003.).

Uzročnici leptospiroze se prenose putem zaražene mokraće, kontaminirane vode ili tla kroz rane nastale na koži ili rjeđe sluznicama, tipa oguljotina ili posjekotina. U nekim slučajevima neoštećena, vodom omekšana koža može biti ulazno mjesto uzročnika (REIS i sur., 2008.). Većina bakterija iz reda *Spirochaetales* se najčešće kreće međustaničnim prostorom, no novija istraživanja pokazuju mogućnost prolaska leptospira kroz samu stanicu. Taj mehanizam najvjerojatnije služi leptospirama, kako bi izbjegli imunosni odgovor domaćina (BAROCCHI i sur., 2002.). Nakon infekcije dolazi do širenja bakterije kroz krvotok (bakterijemije), a uzročnika u tom periodu možemo dokazati u skoro svim parenhimskim organima.

Nastanak prvih kliničkih simptoma prati pojava aglutinirajućih protutijela u krvotoku (FAINE i sur., 1999.). Sedam do deset dana nakon infekcije leptospire se više ne mogu dokazati u krvotoku, već ih nalazimo skupljene u amorfnu strukturu nalik biofilmu u proksimalnim bubrežnim kanalićima (RISTOW i sur., 2008.). Iz bubrega leptospire se povremeno izlučuju urinom i kontaminiraju okoliš, što zatvara epizootiološki/epidemiološki krug.

Primarne lezije leptospiroze su sitna oštećenja endotela, koja dovode do ishemije pojedinih tkiva i organa. Na navedeni način nastaju lakša do teška, reverzibilna i ireverzibilna oštećenja tkiva (ADLER i DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010.). Osim primarnih lezija, vjeruje se da leptospire uzrokuju oštećenja tkiva putem upalnih citokina, hemolize, sfingomijelize, itd. (DIAMENT i sur., 2002.; LEE i sur., 2002.). Poznato je da i leptospire sadrže nekoliko proteina homolognih životinjskim proteinima, pa tako mogu samostalno aktivirati koagulacijsku kaskadu i izazvati diseminiranu intravaskularnu koagulaciju ili pak rekurentni uveitis (mjesečnu sljepoću) kod konja (HABUŠ, 2013.).

#### **2.1.4. KLINIČKA SLIKA**

Klinička slika leptospiroze je vrlo raznolika, a ovisna je o infektivnoj dozi te virulenciji serovara ili soja leptospire koji je uzrokovao bolest, kao i o prijemljivosti inficirane vrste, te njezinom imunostom statusu (LEVETT, 2001.). Vrijeme inkubacije obično traje 5 do 15 dana. U svih vrsta domaćih i divljih životinja, te ljudi moguće su subkliničke infekcije sa blagim i nespecifičnim simptomima koji brzo prolaze i najčešće ne ostavljaju nikakve posljedice. Takve infekcije se većinom ne dijagnosticiraju ili se krivo dijagnosticiraju, radi čega se leptospiroza smatra puno raširenijom bolesti (pogotovo u siromašnim zemljama i zemljama tropskog pojasa) nego što to pokazuju dosadašnja istraživanja. Simptomi koji se najčešće primijete u takvim slučajevima su: povišena temperatura, bolovi u mišićima, konjunktivalni podljevi, a kod ljudi se često javlja glavobolja. Takvi slučajevi se većinom vežu uz infekcije životinje serovarom na koji se ista evolucijski prilagodila (evolucijski domaćin). S druge strane, leptospiroza se češće dijagnosticira pri pojavi teških, ikteričnih oblika bolesti praćenih hepato-renalnim sindromom, leukocitozom i pobačajem (ADLER i DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010.; LEVETT, 2001.). U iznimno teškim slučajevima plućno krvarenje je prepoznato kao glavna, često smrtonosna manifestacija leptospiroze (BHARTI i sur., 2003.; MILAS, 2012.). Ovi oblici se najčešće javljaju prilikom infekcije sa serovarom koji nije dio uobičajnog epizotološkog/epidemiološkog ciklusa (slučajni domaćin).

##### **2.1.4.1. Leptospiroza u domaćih životinja**

###### **2.1.4.1.1. Psi**

Kod pasa su česte subkliničke infekcije i blaži oblici bolesti. Praćene su blagim, nespecifičnim simptomima s dugotrajnim izlučivanjem leptospira urinom. S druge strane, mogući su i teži klinički oblici bolesti koji počinju depresijom, povraćanjem i anoreksijom. Uočavamo i dehidraciju, povišenu tjelesnu temperaturu, slabost, žuticu, nevoljkost za kretanjem, proljev, sindrom poliurije/polidipsije (PU/PD), te napet i bolan abdomen. Takvi oblici najčešće su vezani uz oštećenje jetre i/ili zatajenje bubrega s posljedičnom uremijom.

U zadnje vrijeme, u ljudi i pasa, prilikom infekcije sve češće se javlja izrazito smrtonosni leptospirozni plućni hemoragijski sindrom (LPHS) (FAINE i sur., 1999.; GOLDSTEIN, 2010.).

Psi su evolucijski domaćini serovara Canicola.

#### **2.1.4.1.2. Mačke**

Mačke su slabo prijemljive na infekciju, pa su klinički simptomi jako rijetki. Međutim moguće je dokazati specifična protutijela, te uzročnika u bubregu inficiranih jedinki (FAINE i sur., 1999.). Uloga mačke u epizootiološkom lancu i dalje nije razjašnjena.

#### **2.1.4.1.3. Konji**

Premda su infekcije kod konja najčešće bez izraženih simptoma, moguće su pojave pobačaja, septikemije i rekurentnog iridociklitisa, odnosno mjesečne sljepoće (BRUDNJAK i sur., 1956.; NIEDERMAIER i sur., 2006.). Konji se smatraju evolucijskim domaćinima serovara Bratislava.

#### **2.1.4.1.4. Goveda**

U goveda se najčešće primijete reproduktivni problemi uz koje su vezani gospodarski gubitci. Teži klinički oblici se javljaju rijetko, većinom u teladi i junadi u tovu (FAINE i sur., 1999.). Evolucijski su domaćini serovara Hardjo-bovis.

#### **2.1.4.1.5. Koze i ovce**

U koza i ovaca bolest najčešće prolazi asimptomatski ili sa smetnjama u reprodukciji (FAINE i sur., 1999.).

#### **2.1.4.1.6. Svinje**

U svinja leptospiroza najčešće prolazi inaparentno, no mogu se javiti poremećaji u reprodukciji. Rijetko se javljaju teži oblici kod tovljenika i prasadi (HABUŠ i sur, 2008.; MODRIĆ i sur, 2006). Svinje se smatraju evolucijskim domaćinom serovara Pomona i Tarassovi.

#### **2.1.4.2. Leptospiroza u čovjeka**

Ljudi su u epizootiološki/epidemiološki ciklus uključeni kao slučajni domaćini. Kod ljudi bolest se javlja asimptomatski ili se očituje blagom kliničkom slikom vrućice, bolovima u mišićima, glavoboljom, te konjuktivalnim podljevom. Navedeni oblik najčešće prolazi spontano nakon tjedan dana, no može se razviti i teški klinički oblik. Teški klinički oblik se naziva Weilova bolest, a očituje se: zatajenjem bubrega, vrućicom, krvarenjem, žuticom zbog oštećenja jetre i letalnim ishodom u 5 - 15% slučajeva bolesti (LEVETT, 2001.). Pojavom plućnog hemoragijskog sindroma smrtnost dostiže i do 50% (HELMERHORST i sur., 2012.).

#### **2.1.5. DIJAGNOSTIKA**

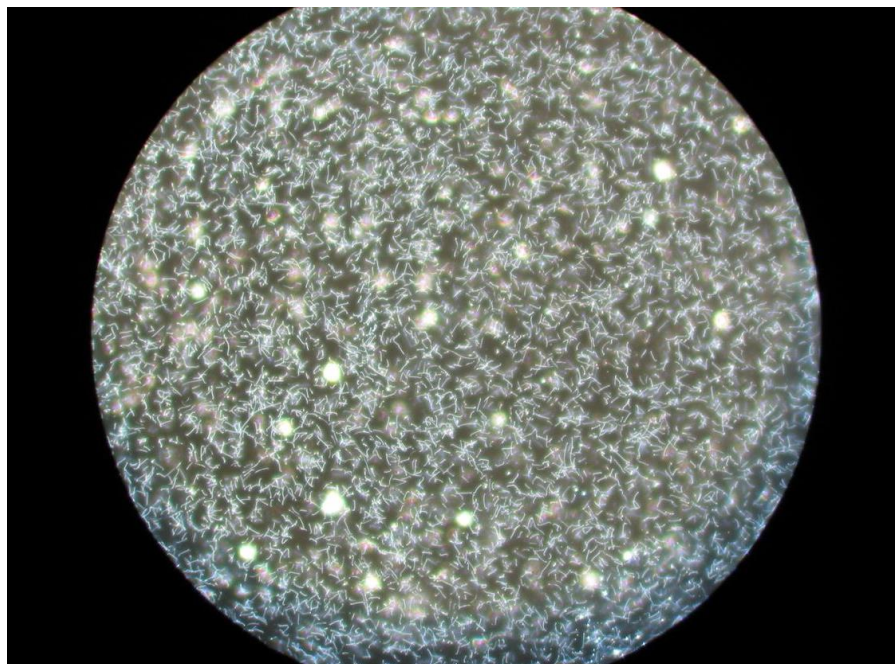
Za pravovremeno postavljanje sumnje na leptospirozu, anamnestički podaci su izuzetno bitni te stoga i nezaobilazni dijelovi pravilnog dijagnostičkog puta. Kontakt sa glodavcima, boravak u šumi ili područjima s vodama stajaćicama i rijekama, predstavljaju znakoviti rizik za širenje ove bolesti. S druge strane klinički simptomi su raznoliki i nedovoljno specifični za postavljanje dijagnoze, međutim određeni često potiču sumnju i usmjeruju daljnju dijagnostiku (pobačaj krava, krmača i kobilica, te hepato-renalni sindrom). Ipak, za postavljanje objektivne dijagnoze potrebno je dokazati uzročnika (*Leptospira spp.*) mikrobiološkim ili molekularnim metodama, ili pak dokazati specifična protutijela serološkim dijagnostičkim metodama.

##### **2.1.5.1. Dokazivanje uzročnika**

Za dokazivanje živog uzročnika u nekom tkivu ili organu, presudno je pravodobno i pravilno uzimanje uzoraka. Kao što je prethodno opisano u poglavlju 2.1.3. Patogeneza, prva pojava po infekciji je širenje uzročnika krvlju, nakon čega dolazi do pojave protutijela koja aglutiniraju uzročnika. Tada se javlja kratkotrajno do doživotno naseljavanje proksimalnih kanalića bubrega, odakle se iste mogu dalje izlučivati mokraćom (ADLER i DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010.). Iz navedenog je vidljivo, da se uzročnik u krvi može dokazati prvih desetak dana, nakon čega se može dokazati u uzorcima bubrega i sporadično urinu.

### 2.1.5.1.1. Izravni dokaz leptospira

Izravna detekcija uzročnika u tjelesnim tekućinama ili tkivu pod mikroskopom s tamnim vidnim poljem je moguća (Slika 3), no izuzetno nepouzdana metoda. Za navedeno je potrebna velika gustoća uzročnika, a nerijetko su potrebna posebna bojanja na bazi srebra ili imunohistokemijske metode.



**Slika 3.** Izgled leptospira pod mikroskopom s tamnim vidnim poljem

(Izvor: <https://leptospira.amc.nl/leptospirosis-reference-centre/>).

### 2.1.5.2. Izdvajanje uzročnika

Izdvajanje uzročnika je jako složen i dugotrajan postupak koji nema izravnu dijagnostičku svrhu, no i dalje je iznimno važna metoda za znanstvenike i epidemiologe. Naime, to je jedina metoda kojom se dobivaju izolati koji se kasnije mogu serološki determinirati. Kao uzorci za ovu metodu mogu se koristiti krv (prije davanja antibiotika), urin (nakon sedmog dana), cerebrospinalni likvor, uzorci renokulture itd. Izdvajanje je najbolje obaviti odmah po uzimanju uzorka, no ako isto nije moguće uzorak se uzima u epruvetu sa natrij oksalatom ili heparinom i dostavlja u laboratorij u roku od 24h (WOLF, 1954.).

Ukoliko se rabi kiseli urin (mesojeda), uzorak se treba centrifugirati, nakon čega se sediment razrjeđuje sa puferom i nasadi na hranjivu podlogu sa dodatkom 5-fluorouracila koji sprječava rast drugih bakterija. Uzorci se nasađuju na tekuću hranjivu podlogu pod odgovarajućim uvjetima, nakon čega se rezultati jednom tjedno provjeravaju pomoću mikroskopa s tamnim vidnim poljem, tokom četiri mjeseca.

#### **2.1.5.3. Molekularne metode**

Izuzetno korisne metode izravnog i objektivnog dokazivanja uzročnika u materijalu. Navedeni materijali mogu biti krv, urin, uzorci tkiva, cerebrospinalni likvor i drugi (BROWN i sur., 1995.; MÉRIEN i sur., 1995.). Kako bi dokazali uzročnika, koriste se metode umnožavanja DNK leptospire pomoću lančane reakcije polimerazom (engl. Polymerase chain reaction, PCR) i lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. Real Time - PCR). Prednosti korištenja molekularnih metoda su dostupnost u skoro svim dijagnostičkim laboratorijima, brzina izvođenja, velika specifičnost i osjetljivost, te mogućnost dokazivanja leptospiroze, čak i nakon primjene antibiotika. Smatra se da je jedini nedostatak navedenih metoda dijagnostike nemogućnost utvrđivanja infektivnog serovara, što ima veliko javnozdravstveno značenje (LEVETT, 2004.).

#### **2.1.5.4. Serološke metode**

Za dokazivanje specifičnih protutijela u serumu, koristimo se serološkim metodama tipa mikroskopske aglutinacije koja predstavlja zlatni standard u dijagnostici leptospiroze, te makroskopske ili lateks-aglutinacije koja dokazuje IgM i IgG protutijela, međutim sa njom se ne može utvrditi serovar (SMITS i sur., 2000.). Primjenjuje se i ELISA metoda u obliku komercijalnog kita koji detektira IgM protutijela (SMITS i sur., 1999.). Od ostalih metoda rabe se reakcija vezanja komplemenata, neizravna inhibicija hemaglutinacije i druge.

#### **2.1.5.4.1. Mikroskopska aglutinacija (MAT)**

Ovo je referentna serološka metoda za dijagnostiku leptospiroze. Princip reakcije se zasniva na mogućnosti IgM i IgG protutijela da aglutiniraju živi antigen. Reakcija se promatra pod mikroskopom s tamnim vidnim poljem, a pozitivna reakcija se očitava kad je 50 % leptospira aglutiniralo.

Ovo je kvalitativna, ali i kvantitativna metoda, što znači da se uz potvrdu postojanja protutijela možemo odrediti i njihov titar. Visoki titar u prvom serumu (vrlo često propisan pravilnikom) dokaz je akutne infekcije, no kao i u većine akutnih infekcija za dijagnostiku je ponekad potrebno uzrokovati parne serume. Pozitivnom reakcijom smatra se četverostruki porast titra u drugom serumu, nakon što je u prvom rezultat bila negativna reakcija ili reakcija sa vrlo niskim titrom. Zbog velikog broja serovara patogenih leptospira i nedostatka unakrižnih reakcija između seroloških skupina prilikom izvođenja MAT-a, koristimo se panelima antigena. Panel antigena je niz referentnih sojeva različitih serovara živih leptospira, jednog ili više predstavnika različitih seroloških skupina (Slika 2). Panel antigena ovisan je o epizootiološkom i epidemiološkom stanju u državi, te je shodno tome podložan promjenama u smislu broja i strukture antigena koje sadržava, a prilagođen je pojedinoj vrsti životinje ili ljudima (DIKKEN i KMETY, 1978.). Nedostatci ove metode su manja osjetljivost, kompleksnost izvođenja, subjektivnost čitanja rezultata itd. Unatoč svemu, ova metoda i dalje ima izrazit značaj u dijagnostici, kako kliničarima tako i znanstvenicima i epidemiolozima.

#### **2.1.6. LIJEČENJE I PREVENCIJA**

Istraživanja pokazuju da su leptospire osjetljive na velik broj kemoterapeutika tipa penicilina, tetracilina, kinolona, aminoglikozida itd. Međutim, protokoli na bazi streptomicina i doksiciklina su jedini uspješni sprječavanju kliconoštva (FAINE i sur., 1999.). Osim primjene lijekova važnu ulogu ima i potporna terapija.

Najvažnije preventivne mjere u suzbijanju leptospiroze su kontrola brojnosti populacije glodavaca, sprječavanje kontakta istih s ljudima, higijensko-sanitarne mjere, cijepljenje i liječenje kliconoštva. Nažalost navedene mjere su do sada imale samo djelomičan uspjeh.



Cjepiva protiv leptospiroze ne primjenjuju se rutinski u humanoj medicini, dok se za imunoprofilaksu životinja rabe razna komercijalna cjepiva koja stvaraju kratkotrajnu i djelomičnu imunost ograničenu izostankom unakrižne zaštite između različitih serovara. Smatra se da je imunost kod leptospiroze posljedica humoralnog i staničnog odgovora organizma (NAIMAN i sur., 2002.; SONRIER i sur., 2000.).

Jedna od mogućih preventivnih mjera jeste primjena manjih doza doksiciklina, mada je ova metoda prevencije primjenjivija kod ljudi nego kod životinja. Smatra se da su situacije u kojim je opravdano preventivno korištenje antibiotika: sportska natjecanja (triatlon), rizik od epidemije zbog poplave, vojne misije i druge (BHARADWAJ i sur., 2002.; KO i sur., 1999.). Ipak, opravdanost ovog načina prevencije treba razmotriti u svjetlu problema uzrokovanih antimikrobnom rezistencijom, radi čega se navedena metoda uzima s rezervom.

## **2.2. TAKSONOMIJA I FILOGENIJSKI ODNOSI UNUTAR RODA LEPTOSPIRA**

### **2.2.1. TAKSONOMIJA LEPTOSPIRA**

Pododbor za taksonomiju bakterija iz roda *Leptospira* 2011. godine odlučio je da svi izolati leptospire trebaju biti tipizirani serološkim i molekularnim metodama (International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospiraceae*, 2012.). Razlog navedene odluke leži u činjenici da postoje dva različita klasifikacijska sustava; serološki i molekularni kojima se rod rasčlanjuje na serovare i genomske vrste – taksone koji se međusobno ne preklapaju. Navedena odredba čini taksonomiju leptospira vrlo kompliciranom, no nužna je jer ni jedan od ponuđenih sustava zasebno ne nudi dovoljno odgovora za pravilno i potpuno razumijevanje uzročnika. Molekularni klasifikacijski sustav ne udovoljava zahtjevima epizootioloških i epidemioloških istraživanja. S druge strane određivanje serovara ne pruža informacije o taksonomskom statusu i filogenijskim odnosima tipiziranih spojeva.

Postoje različite metode koje se trude povezati dva navedena sustava, međutim zbog mnogobrojnih problema ni jedan od navedenih nije doživio širu primjenu. Neke od metoda su: metoda temeljena na restrikciji genomske DNK i elektroforezi u pulsirajućem polju, odnosno PFGE; metoda temeljena na restrikciji genomske DNK i polimorfizmu broja uzastopno ponovljenih sekvenci VNTR; te analiza polimorfizma broja uzastopno ponovljenih sekvenci MLVA, metoda tipiziranja na osnovi multilokusnih sekvenci (MLST) (CICERONI i sur., 2002.; GALLOWAY i LEVETT, 2008.; HERRMANN i sur., 1991.; NALAM i sur., 2010.; POSTIC i sur., 2000.).

Iako je PFGE metoda i dalje smatra zlatnim standardom, od navedenih metoda danas se najviše koristi metoda tipiziranja na osnovi multilokusnih sekvenci (MLST) kojom se pokušava istražiti filogenija genomskih vrsta s ciljem određivanja taksonomskog statusa i slijeda gena. Njena velika prednost je ta što postoji i internetska MLST baza pomoću koje se mogu uspoređivati dobiveni MLST tipovi (<https://pubmlst.org/leptospira/>).

Glavni nedostatak je činjenica da je do danas opisano nekoliko načina (shema) izvođenja MLST metode, koje se razlikuju u odabranim genima, te načinu obrade i tumačenja rezultata (AHMED i sur., 2004; NALAM i sur., 2010.; VARNI i sur., 2014.). Tako i navedena internetska stranica sadrži tri sheme koje uključuju različite gene, sa posebnim načinima obrade i tumačenja rezultata. Također postoje radovi koji istražuju kompatibilnost različitih MLST shema, te utvrđuju njihove prednosti i mane. U jednoj od takvih, opsežnijih studija zaključeno je da iako su dvije najučestalije sheme koje uključuju šest odnosno sedam različitih gena (AHMED i sur., 2004; NALAM i sur., 2010.) međusobno usporedive, odnosno metoda koja uključuje šest gena ipak ima veću razlučivost. Ova metoda nudi uvid u pripadnost izolata genomskoj skupini i djelomično serološkom statusu, a temelji se na identifikaciji DNK sekvence dobro evolucijski očuvanih (eng. housekeeping) gena (adk, icdA, rrs2 i secY) i promjenjivih gena vanjske ovojnice (LipL32 i LipL41) (AHMED i sur., 2004.). Ovom metodom ispitani su i neki hrvatski izolati kod kojih se uspješno uspjelo tipizirati leptospire do razine serološke skupine, odnosno serovara (HABUŠ, 2013.). Navedenim ispitivanjem utvrđeno je da je od šest odabranih gena, njih tri (adk, icdA i secY) bilo značajno promjenjivo, dok su geni koji kodiraju lipoproteine vanjske membrane LipL32 i LipL41, te rrs2 gen bili umjereno promjenjivi.

### **3. MATERIJA I METODE**

Ovo istraživanje obuhvaćalo je odabir i umnažanje 101 izolata izdvojenih iz mišolikih glodavaca, pretraživanje 77 nedeterminiranih izolata hiperimunim serumima s ciljem određivanja pripadnosti tih izolata određenim serološkim skupinama. Nakon serološke determinacije odabran je manji uzorak od 33 izolata kojima je sekvenciranjem i filogenijskom analizom određena genomska vrsta, te na kraju njih 11 koji su pretraženi metodom tipiziranja na osnovi multilokusnih sekvenci (MLST). Način odabira i metode pretraživanja opisane su zasebno za svaki od navedenih koraka.

### **3.1. SEROLOŠKA TIPIZACIJA**

#### **3.1.1. ODABIR IZOLATA ZA SEROLOŠKU DETERMINACIJU**

Materijal za ovo istraživanje dio je arhive izolata patogenih leptospira Laboratorija za leptospire, Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Iz navedene arhive odabrani su svi dostupni izolati koji su tijekom godina izdvajani iz bubrega mišolikih glodavaca izlovljenih s područja prirodnih žarišta kontinentalnog dijela Republike Hrvatske (n=101). Za sve odabrane izolate prikupljeni su i obrađeni podatci o vrsti glodavaca, vremenu i mjestu izlova. Tijekom prijašnjih istraživanja serološki su tipizirana ukupno dvadeset četiri (23,8%) izolata. Preostalih sedamdeset sedam (76,2%) izolata kojima prethodno nije određena serološka skupina pretraženi su hiperimunim serumima tijekom ovog istraživanja. Detaljan prikaz svih uzoraka izdvojenih iz mišolikih glodavaca nalazi se u Tablici 3.

**Tablica 3.** Svi izolati Arhive Laboratorija za leptospire Veterinarskog fakulteta porijekom od mišolikih glodavaca.

| <b>Rb.</b> | <b>Oznaka izolata</b> | <b>Porijeklo izolata</b>    | <b>Lokalitet</b>   | <b>Datum izdavanja</b> |
|------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------|------------------------|
| 1          | M-615*                | <i>Apodemus agrarius</i>    | Mikanovci          | 21.10.2005.            |
| 2          | M-619*                | <i>Apodemus agrarius</i>    | Mikanovci          | 21.10.2005.            |
| 3          | M-621*                | <i>Apodemus agrarius</i>    | Mikanovci          | 21.10.2005.            |
| 4          | M-631                 | <i>Microtus arvalis</i>     | Mikanovci          | 21.10.2005.            |
| 5          | M-634*                | <i>Apodemus agrarius</i>    | Mikanovci          | 21.10.2005.            |
| 6          | M-641*                | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Ilok               | 26.10.2005.            |
| 7          | M-644*                | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Ilok               | 26.10.2005.            |
| 8          | M-656*                | <i>Apodemus agrarius</i>    | Cerna              | 26.10.2005.            |
| 9          | M-742*                | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Novoselec, Žutica  | 09.11.2007.            |
| 10         | M-745*                | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Novoselec, Žutica  | 09.11.2007.            |
| 11         | M-747*                | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Novoselec, Žutica  | 09.11.2007.            |
| 12         | M-751*                | <i>Apodemus flavicollis</i> | Novoselec, Žutica  | 09.11.2007.            |
| 13         | M-753*                | <i>Apodemus flavicollis</i> | Novoselec, Žutica  | 09.11.2007.            |
| 14         | M-754*                | <i>Apodemus flavicollis</i> | Novoselec, Žutica  | 09.11.2007.            |
| 15         | M-758*                | <i>Apodemus flavicollis</i> | Novoselec, Žutica  | 09.11.2007.            |
| 16         | M-764                 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Novoselec, Žutica  | 09.11.2007.            |
| 17         | M-789*                | <i>Apodemus flavicollis</i> | Novoselec, Žutica  | 10.11.2007.            |
| 18         | M-790*                | <i>Apodemus flavicollis</i> | Novoselec, Žutica  | 10.11.2007.            |
| 19         | M-792*                | <i>Apodemus flavicollis</i> | Novoselec, Žutica  | 10.11.2007.            |
| 20         | M-795*                | <i>Apodemus flavicollis</i> | Novoselec, Žutica  | 10.11.2007.            |
| 21         | M-812*                | <i>Apodemus agrarius</i>    | Novoselec, Žutica  | 30.11.2007.            |
| 22         | M-814*                | <i>Apodemus flavicollis</i> | Novoselec, Žutica  | 30.11.2007.            |
| 23         | M-832*                | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Novoselec, Žutica  | 30.11.2007.            |
| 24         | M-833*                | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Novoselec, Žutica  | 30.11.2007.            |
| 25         | M-837*                | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Novoselec, Žutica  | 30.11.2007.            |
| 26         | M-841*                | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Novoselec, Žutica  | 30.11.2007.            |
| 27         | M-845                 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Draganić           | 05.02.2008.            |
| 28         | M-864                 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Sušica 1a,         | 08.04.2008.            |
| 29         | M-943                 | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Sušica 34a, Gerovo | 06.05.2008.            |
| 30         | M-1019                | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani AA1     | 30.10.2009.            |
| 31         | M-1078                | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani 1 175a  | 11.11.2011.            |
| 32         | M-1084                | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Lipovljani         | 16.12.2011.            |

|    |        |                             |              |             |
|----|--------|-----------------------------|--------------|-------------|
| 33 | M-1086 | <i>Myodes glareolus</i>     | Lipovljani   | 16.12.2011. |
| 34 | M-1087 | <i>Myodes glareolus</i>     | Lipovljani   | 16.12.2011. |
| 35 | M-1088 | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Lipovljani   | 16.12.2011. |
| 36 | M-1089 | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Lipovljani   | 16.12.2011. |
| 37 | M-1090 | <i>Myodes glareolus</i>     | Lipovljani   | 16.12.2011. |
| 38 | M-1117 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani 1 | 18.01.2012. |
| 39 | M-1118 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani 1 | 18.01.2012. |
| 40 | M-1166 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 27.03.2012. |
| 41 | M-1167 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 27.03.2012. |
| 42 | M-1172 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 27.03.2012. |
| 43 | M-1205 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 03.04.2012. |
| 44 | M-1216 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 03.04.2012. |
| 45 | M-1217 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 03.04.2012. |
| 46 | M-1384 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Plitvice     | 27.06.2013. |
| 47 | M-1391 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Sljeme       | 17.07.2013. |
| 48 | M-1709 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 14.10.2014. |
| 49 | M-1711 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 14.10.2014. |
| 50 | M-1712 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 14.10.2014. |
| 51 | M-1713 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 14.10.2014. |
| 52 | M-1718 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 14.10.2014. |
| 53 | M-1719 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 14.10.2014. |
| 54 | M-1723 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 14.10.2014. |
| 55 | M-1725 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 15.10.2014. |
| 56 | M-1726 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 15.10.2014. |
| 57 | M-1729 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 15.10.2014. |
| 58 | M-1735 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 15.10.2014. |
| 59 | M-1739 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 15.10.2014. |
| 60 | M-1740 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 15.10.2014. |
| 61 | M-1743 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 15.10.2014. |
| 62 | M-1744 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 15.10.2014. |
| 63 | M-1745 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 15.10.2014. |
| 64 | M-1746 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 15.10.2014. |
| 65 | M-1747 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 15.10.2014. |
| 66 | M-1749 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 15.10.2014. |
| 67 | M-1750 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 15.10.2014. |
| 68 | M-1751 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 15.10.2014. |
| 69 | M-1752 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani   | 15.10.2014. |

|     |        |                             |                                      |             |
|-----|--------|-----------------------------|--------------------------------------|-------------|
| 70  | M-1755 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani                           | 15.10.2014. |
| 71  | M-1759 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani                           | 15.10.2014. |
| 72  | M-1760 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani                           | 15.10.2014. |
| 73  | M-1761 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani                           | 15.10.2014. |
| 74  | M-1762 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani                           | 15.10.2014. |
| 75  | M-1766 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani                           | 15.10.2014. |
| 76  | M-1769 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani                           | 15.10.2014. |
| 77  | M-1771 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani                           | 15.10.2014. |
| 78  | M-1773 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Lipovljani                           | 15.10.2014. |
| 79  | M-1776 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani                           | 15.10.2014. |
| 80  | M-1780 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Nova Subocka                         | 24.04.2015. |
| 81  | M-1781 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Nova Subocka                         | 24.04.2015. |
| 82  | M-1782 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Nova Subocka                         | 24.04.2015. |
| 83  | M-1784 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Županja                              | 29.04.2015. |
| 84  | M-1785 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Županja                              | 29.04.2015. |
| 85  | M-1789 | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Županja K1                           | 15.07.2015. |
| 86  | M-1798 | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Županja K4                           | 15.07.2015. |
| 87  | M-1802 | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Županja                              | 28.10.2015. |
| 88  | M-1805 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Županja                              | 28.10.2015. |
| 89  | M-1812 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Županja                              | 28.10.2015. |
| 90  | M-1817 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Županja                              | 29.10.2015. |
| 91  | M-1990 | <i>Microtus arvalis</i>     | Čakovec                              | 07.10.2016. |
| 92  | M-1994 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Čakovec                              | 07.10.2016. |
| 93  | M-2012 | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Velika Gorica,<br>Turopoljski lug 7a | 02.06.2017. |
| 94  | M-2128 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Lekenik 37B                          | 19.10.2017. |
| 95  | M-2139 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Lekenik 51A                          | 19.10.2017. |
| 96  | M-2141 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Lekenik 51A                          | 19.10.2017. |
| 97  | M-2179 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Turopoljski lug                      | 27.10.2017. |
| 98  | M-2182 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Šiljakovačka dubrava                 | 27.10.2017. |
| 99  | M-2183 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Šiljakovačka dubrava                 | 27.10.2017. |
| 100 | M-2230 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Bjelovar                             | 29.05.2018. |
| 101 | M-2234 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Valpovačke nizinske<br>šume 47b      | 14.06.2018. |

\* - Uzorci nisu pretraženi hiperimunim serumima tijekom ovog istraživanja, obzirom da je njihova serološka tipizacija obavljena tijekom prijašnjih istraživanja.

### 3.1.2. UZGOJ LEPTOSPIRA

Odabrani izolati uzgojeni su u Korthof-ovoj tekućoj podlozi (BABUDIERI, 1961.) na temperaturi od 28 °C, u periodu od najmanje 7 dana. Tekuća hranjiva podloga po Korthofu proizvedena je otapanjem sastojaka u 1 litri destilirane vode. Svi sastojci (Tablica 4) su otapani navedenim redoslijedom i u navedenoj količini. Dobivena otopina je autoklavirana na temperaturi od 121 °C, tijekom 1 sata. Prije upotrebe još je potrebno inaktivirati kunićji serum na temperaturi od 56 °C kroz 30 minuta. Nakon hlađenja otopine na sobnoj temperaturi dodaje joj se navedeni kunićji serum, te se otopina nakon toga filtrira kroz Seitzov filter, nakon čega se otopina u sterilnim uvjetima raspoređuje u sterilne epruvete s čepom. Navedene epruvete se na kraju pravilno označe nazivom hranjive podloge i datumom. Do uporabe, hranidbene podloge pohranjuju se u hladnjak na temperaturi od 4 °C.

**Tablica 4.** Sastojci za proizvodnju Korthofove tekuće hranjive podloge.

| Sastojci                         | Masa   |
|----------------------------------|--------|
| Pepton                           | 0,8 g  |
| NaCl                             | 1,4 g  |
| NaHCO <sub>3</sub>               | 0,02 g |
| KCl                              | 0,04 g |
| CaCl <sub>2</sub>                | 0,04 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0,18 g |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0,96 g |

Gustoća leptospira unutar Korthofove hranjive podloge ispitivana je subjektivnom metodom ocjenjivanja uz pomoć mikroskopa s tamnim vidnim poljem. Jedna kap izvađena laboratorijskom ezom pregledavana je na predmetnom stakalcu. Mala do jedva vidljiva količina slabo pokretnih ili nepokretnih leptospira označavala se s jednim križem (+), veća količina označena je s dva križa (++), dok su velike količine dobro pokretnih leptospira bile ocjenjene s tri križa (+++). Četiri križa (++++) imale su izuzetno guste otopine s jako velikim brojem dobro pokretnih leptospira. Pretpostavlja se da su izolati s četiri križa imali gustoću rasta od oko  $2-4 \times 10^8$  bakterija u mililitru, što ih čini prikladnima za izvođenje seroloških i molekularnih metoda identificiranja. (HABUŠ, 2013.)



### **3.1.3. POHRANA IZOLATA**

Izolati leptospira prethodno umnoženi do gustoće rasta od oko  $2-4 \times 10^8$  bakterija u mililitru su potom pohranjeni na nekoliko načina kako bi se omogućilo njihovo dugoročno preživljavanje. Po 0,5 mililitara izolata je presađeno u sterilnim uvjetima uz pomoć mikrobiološke zaštitne komore u dvije epruvete s Korthofovom tekućom hranjivom podlogom i jednu epruvetu s tekućom hranjivom podlogom po Fletcheru. Pesađivanje na hranjivu podlogu po Fletcheru trebalo je omogućiti preživljavanje izolata unutar uvjeta sobne temperature tijekom 6 mjeseci. Na jednak način presađeno je 1,5 mililitara izolata u Eppendorf epruvete u svrhu pohranjivanja izolata na temperaturi od  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Navedeni postupak omogućio je gotovo neograničeno čuvanje izolata budući da su leptospire preživljavale postupak zaleđivanja i odleđivanja.

### **3.1.4. ODREĐIVANJE SEROLOŠKE SKUPINE**

Svi izolati leptospira kojima prethodno nije određena serološka skupina pretraženi su hiperimunim serumima. Materijali potrebni za izvođenje metode su nabrojani ispod.

#### Materijal, pribor, oprema i reagensi

- 1 % Fosfatni pufer (PBS)
- Mikrotitracijske plitice s V dnom (Ratiolab GmbH, Dreieich, Njemačka)
- Mikropipete (jednokanalna pipeta 1 - 10  $\mu\text{l}$ , multikanalna pipeta 30 – 300  $\mu\text{l}$ , dispenzer pipeta) i odgovarajući nastavci
- 12 otopljenih hiperimunih seruma proizvedenih na kunićima
- Sterilne staklene bočice za antigen
- Ispitujući antigen (101 pretraživani izolat leptospira)
- Mikroskop s tamnim vidnim poljem – Zeiss Axioskop 40
- Obrasci za upis rezultata

U sve jažice prethodno označene mikrotitracijske plitice sa V dnom je stavljeno 50  $\mu$ l 1 % fosfatnog pufera (1% PBS) pomoću multikanalne pipete. Zatim je u jažice drugog stupca (iza linije) dodano još 50  $\mu$ l PBS-a i 4,2  $\mu$ l određenog hiperimunog seruma (prethodno označenog na mikrotitracijskoj ploči uz pripadajuće redove plitica i u obrascu za upis). Multikanalnom pipetom je promiješan sadržaj drugog stupca (uvlačenjem sadržaja unutra – van 3 puta), te je 50  $\mu$ l prebačeno u naredni treći stupac. Tada je sadržaj ponovo promiješan na isti način, pa prebačen u naredni stupac. Iz zadnjeg stupca uklonjeno je 50  $\mu$ l prethodno promiješanog sadržaja. Ovim korakom su stvorena dvostruka serijska razrjeđenja, s početnim razrjeđenjem 1:25 (unutar 2. stupca). Dispenser pipetom je tada u sve jažice dodano 50  $\mu$ l ispitujućeg antigena, prilikom čega je početno razrjeđenje povećano na 1:50 (u 2. stupcu). U ovom trenutku mikrotitracijska ploča je stavljena u termostat na temperaturu 28 °C na inkubaciju od 2 sata. Nakon inkubacije ezom je iz pojedinih mikrotitracijskih plitica prenesena kap pod mikroskop sa tamnim vidnim poljem. Najvećim titrom smatralo se razrjeđenje seruma u kojem je prisutno najmanje 50% aglutiniranih leptospira. Ova jažica označila se na mikrotitracijskoj plitici okomitom linijom (Slika 4).



**Slika 4.** Mikrotitracijska plitica sa V dnom na kojoj je naznačeno najveće razrjeđenje seruma (Izvor: privatna fotografija).

Rezultati istraživanih izolata potom su upisani u obrazac za serološku determinaciju hiperimunim serumima.

Smatralo se da istraživani izolat pripada serološkoj skupini soja s čijim je hiperimunim serumom aglutinacija bila vidljiva u najvećem titru. U Tablici 5, navedeni su hiperimuni serumi pomoću kojih su testirani odabrani izolati.

**Tablica 5.** Referentni sojevi leptospira čiji su hiperimuni serumi rabljeni za određivanje serološke skupine izdvojenih izolata leptospira.

| Serološka skupina   | Serovar             |
|---------------------|---------------------|
| Grippotyphosa       | Grippotyphosa       |
| Australis           | Australis           |
| Pomona              | Pomona              |
| Canicola            | Canicola            |
| Icterohaemorrhagiae | Icterohaemorrhagiae |
| Tarassovi           | Tarassovi           |
| Sejroe              | Saxkoebing          |
| Ballum              | Ballum              |
| Bataviae            | Bataviae            |
| Javanica            | Poi                 |
| Autumnalis          | Rachmati            |
| Hebdomadis          | Hebdomadis          |

## 3.2. MOLEKULARNA TIPIZACIJA

### 3.2.1. ODABIR IZOLATA ZA GENOTIPIZACIJU

Za genotipizaciju su odabrana 33 od ukupno 101 serološki determiniranih uzorka (Tablica 6). Odabir se temeljio na rezultatima serološke pretrage hiperimunim serumima odnosno pripadnosti određenoj serološkoj skupini, vrsti domaćina iz kojeg je izdvojen navedeni uzorak, te lokalitetu na kojem je ulovljen domaćin. Tako je od odabranih trideset tri uzorka, serološkom metodom jedanaest klasificirano kao serološka skupina Australis, četiri uzorka su klasificirana kao Grippytyphosa, jedan uzorak je klasificiran kao Bataviae, dok je preostalih sedamnaest uzoraka pripadalo u serološku skupinu Pomona.

Uzimajući u obzir vrstu domaćina iz kojih su izdvojeni uzorci, odabrano je četrnaest uzoraka izdvojeno iz prugastog poljskog miša (*A. agrarius*), šest iz običnog šumskog miša (*A. sylvaticus*), dva iz šumske voluharice (*C. glareolus*), deset iz žutogrlog miša (*A. flavicollis*) i jedan iz obične voluharice (*M. arvalis*). S obzirom na lokalitet na kojem su glodavci ulovljeni, odabrana su dva uzorka iz Sušice, trinaest uzoraka iz Lipovljana, pet iz Županje, po dva iz Čakovca, Turopoljskog luga i Lekenika, kao i po jedan iz Plitvica, Sljemena, Nove Subocke, Šiljakovačke dubrave, Bjelovara, Valpovačkih nizinskih šuma i Draganića. Smatra se da su 33 uzoraka odabrana za genotipizaciju reprezentativan uzorak svih izolata na kojima je rađena serološka determinacija, s obzirom na nabrojane kategorije.

**Tablica 6.** Izolati odabrani za genotipizaciju.

| Oznaka izolata | Vrsta životinje       | Lokalitet                            | Serološka skupina |
|----------------|-----------------------|--------------------------------------|-------------------|
| M-845          | <i>A. agrarius</i>    | Draganić                             | Bataviae          |
| M-864          | <i>A. flavicollis</i> | Sušica 1a,                           | Australis         |
| M-943          | <i>A. sylvaticus</i>  | Sušica 34a, Gerovo                   | Australis         |
| M-1019         | <i>A. agrarius</i>    | Lipovljani AA1                       | Pomona            |
| M-1078         | <i>A. agrarius</i>    | Lipovljani 1 175a                    | Pomona            |
| M-1084         | <i>A. sylvaticus</i>  | Lipovljani                           | Pomona            |
| M-1086         | <i>C. glareolus</i>   | Lipovljani                           | Pomona            |
| M-1087         | <i>C. glareolus</i>   | Lipovljani                           | Pomona            |
| M-1088         | <i>A. sylvaticus</i>  | Lipovljani                           | Pomona            |
| M-1118         | <i>A. agrarius</i>    | Lipovljani 1                         | Pomona            |
| M-1205         | <i>A. agrarius</i>    | Lipovljani                           | Australis         |
| M-1384         | <i>A. flavicollis</i> | Plitvice                             | Australis         |
| M-1391         | <i>A. flavicollis</i> | Sljeme                               | Pomona            |
| M-1709         | <i>A. agrarius</i>    | Lipovljani                           | Pomona            |
| M-1719         | <i>A. agrarius</i>    | Lipovljani                           | Pomona            |
| M-1729         | <i>A. agrarius</i>    | Lipovljani                           | Pomona            |
| M-1740         | <i>A. agrarius</i>    | Lipovljani                           | Grippotyphosa     |
| M-1773         | <i>A. flavicollis</i> | Lipovljani                           | Pomona            |
| M-1781         | <i>A. agrarius</i>    | Nova Subocka                         | Pomona            |
| M-1784         | <i>A. agrarius</i>    | Županja                              | Australis         |
| M-1798         | <i>A. sylvaticus</i>  | Županja K4                           | Pomona            |
| M-1802         | <i>A. sylvaticus</i>  | Županja                              | Australis         |
| M-1812         | <i>A. flavicollis</i> | Županja                              | Grippotyphosa     |
| M-1817         | <i>A. agrarius</i>    | Županja                              | Pomona            |
| M-1990         | <i>M. arvalis</i>     | Čakovec                              | Grippotyphosa     |
| M-1994         | <i>A. agrarius</i>    | Čakovec                              | Pomona            |
| M-2012         | <i>A. sylvaticus</i>  | Velika Gorica,<br>Turopoljski lug 7a | Australis         |
| M-2139         | <i>A. flavicollis</i> | Lekenik 51A                          | Australis         |
| M-2141         | <i>A. flavicollis</i> | Lekenik 51A                          | Grippotyphosa     |
| M-2179         | <i>A. flavicollis</i> | Turopoljski lug                      | Australis         |
| M-2182         | <i>A. flavicollis</i> | Šiljakovačka dubrava                 | Australis         |
| M-2230         | <i>A. agrarius</i>    | Bjelovar                             | Pomona            |
| M-2234         | <i>A. flavicollis</i> | Valpovačke nizinske šume 47b         | Australis         |

### 3.2.2. IZDVAJANJE DNK IZ KULTURE LEPTOSPIRA

Za izdvajanje DNK iz kulture leptospira korišteni su slijedeći materijali, pribor i oprema:

#### Materijal, pribor i oprema

- 33 odabrana izolata leptospira
- Mikropipete 0,5 - 10, 10 – 100, 100 – 1000 µl i odgovarajući nastavci
- Eppendorf epruvete od 2 ml i Eppendorf epruvete sa silikagelnom membranom
- Sakupljačice („Collection tube“)
- Komercijalni kit za izdvajanje DNK (NucleoSpin Tissue kit, Macherey Negel) s etanolom, pripadajućim reagensima i puferkim otopinama: proteinaza K, te T1, B3, BW, B5 i BE puferi.
- Mikrocentrifuga Eppendorf
- Laboratorijska tresilica (Vortex)
- Termomješalica BioSan

Postupak izdvajanja DNK iz kulture izolata leptospira, počinje odvajanjem 1,5 ml izolata u Eppendorf epruvetu, nakon čega je ista centrifugirana na najvećem broju okretaja (14 500 rpm) u toku 45 minuta. Tada je odliven supernatant, a talogu dodano 180 µl pufera T1, pa 25 µl proteinaze K. Dobivena mješavina je homogenizirana u laboratorijskoj tresilici tijekom 25 sekundi, pa ponovo centrifugirana kroz 25 sekundi na 11 000 rcf. Navedeni uzorak je ostavljen u termomješalici preko noći na 56 °C (300 rpm).

Idućeg dana uzorci su izvađeni iz termomješalice nakon čega su stavljeni u laboratorijsku tresilicu na 25 sekundi, pa na centrifugu jednaku količinu vremena (11 000 rcf). Potom je dodano 200 µl pufera B3 u sve uzorke, nakon čega su iznova homogenizirani u termomješalici, pa centrifugirani u toku 25 sekundi (11 000 rcf). Tada su uzorci ostavljeni u termomješalici na 10 minuta (70 °C, 300 rpm), nakon čega su uzorci iznova homogenizirani u laboratorijskoj tresilici u toku 25 sekundi, pa centrifugirani tijekom 25 sekundi (12 800 rpm = 11 000 rcf). Za to vrijeme izvađene su sakupljačice („Collection tube“) i u njih su stavljene Eppendorf-ove epruvete sa silikagelnom membranom (privremeno označene brojem na stijenci epruvete i čepu iste).

Sljedeći korak bilo je dodati 210 µl etanola unutar svakog uzorka, zatim su uzorci stavljani u laboratorijsku tresilicu, pa u centrifugu na 25 sekundi (11 000 rcf). Nakon toga označeni su svi uzorci odgovarajućim privremenim brojevima koji odgovaraju onima na Eppendorf-ovim epruvetama koje se nalaze u sakupljačicama. Naknadno, uzorak (650 µl) je prenesen u sakupljačice s Eppendorf-ovim epruvetama koje sadrže silikagelne membrane. Svi uzorci su centrifugirani jednu minutu (11 000 rcf). Za to vrijeme su izvađene i poslagane nove sakupljačice, unutar kojih su nakon centrifuge stavljene Eppendorf-ove epruvete sa silikagelnom membranom, dok su stare sakupljačice bile bačene. Tada je dodano 500 µl pufera BW u Eppendorf-ove epruvete sa novim sakupljačicama, te su iste ponovo centrifugirane u toku jedne minute na brzini 11 000 rcf. Za to vrijeme su izvađene i poslagane nove sakupljačice. Nakon centrifuge stare sakupljačice su bačene, a Eppendorf-ove epruvete sa silikagelnom membranom su stavljene u nove sakupljačice. U ovom trenutku je dodano 600 µl pufera B5 u Eppendorf-ove epruvete sa trećim sakupljačicama. Iste su centrifugirane dva puta po jednu minutu (11 000 rcf), a za to vrijeme su izvađene nove Eppendorf-ove epruvete (na kojima su napisani stvarni brojevi uzoraka). Nakon centrifuge stare sakupljačice su bačene, a Eppendorf-ove epruvete sa silikagelnom membranom su prebačene i stavljene unutar novih pravilno označenih Eppendorf-ovih epruveta. Tada je dodano 100 µl pufera BE u Eppendorf-ove epruvete sa membranom koje su stavljene u Eppendorf-ove epruvete sa stvarnim brojem uzoraka. Za kraj uzorci su ostavljeni na uvjetima sobne temperature jednu minutu, nakon čega su centrifugirani 1 minutu na brzini od 11 000 rcf. Nakon centrifugiranja, bačene su Eppendorf-ove epruvete sa silikagelnom membranom, a Eppendorf-ove epruvete sa stvarnim brojem uzoraka u kojima se nalazi izdvojena DNK su zatvorene i pohranjene na -20 °C do upotrebe.

### **3.2.3. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM (PCR)**

Izdvojeni DNK izolati pretraženi su lančanom reakcijom polimeraze koristeći početnice SecY F (5'-ATGCCGATCATTTTTGCTTC-3') i SecY PPR2 (5'-CCTTCCTTTAATTTTAGACTTTTTC-3') koje umnažaju 245 bp SecY gena. Za izvođenje navedene metode, potrebni su sljedeći materijali, reagensi, pribor i oprema:

### Materijal, reagensi, pribor i oprema

- 33 odabrana izdvojena DNK izolata leptospira
- Mikropipete i odgovarajući nastavci
- Eppendorfove epruvete zapremine 2ml
- Epruvete za PCR reakciju zapremine 200  $\mu$ l
- Mikrobiološka biozaštitna komora
- PCR uređaj
- Taqara Taq HC Polymerase (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD)
- Pufer polimeraze 10X PCR Buffer s  $MgCl_2$  (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD)
- dNTP otopina
- Odgovarajuće DNK pozitivne kontrole
- PCR čista voda (molekularno čista voda)
- Odgovarajuće početnice sintetizirane i dostavljene od strane tvrtke Bio Basic, Ontario, Kanada

Unutar mikrobiološke biozaštitne komore pripremljeno je 22,5  $\mu$ l Master Mix mješavine pomoću reagensa, prethodno razrijeđenih početnica (10  $\mu$ M) i Taqara Taq HC polimeraze. U epruvete za PCR reakciju dodana je mješavina prethodno pripremljena prema slijedećem protokolu:

| PCR MIX                          | za 1 uzorak ( $\mu$ l) |
|----------------------------------|------------------------|
| 10X PCR buffer                   | 2.5                    |
| dNTP                             | 2                      |
| Početnica SecY F (10 $\mu$ M)    | 0.625                  |
| Početnica SecY PPR2 (10 $\mu$ M) | 0.625                  |
| PCR voda                         | 16.625                 |
| Taqara Taq HC                    | 0.125                  |



U epruvete za PCR reakciju unutar kojih se nalazila Master Mix mješavina, dodano je još 2,5 µl DNK leptospira (uzorka). Osim 33 DNK uzorka, korištene su još 3 pozitivne kontrole kojima je dodano 2,5 µl DNK referentnih izolata umjesto ispitujućih. Kao negativna kontrola korištena je mješavina reagensa kojima je umjesto DNK (uzoraka ili referentnih) dodano 2,5 µl PCR vode (molekularno čiste vode). Na ovaj način pripremljeni uzorci su inkubirani u PCR uređaju prema sljedećem protokolu vremena i temperature:

#### Program PCR ciklusa

|       |          |      |
|-------|----------|------|
| 95 °C | 5 min    | } 34 |
| 94 °C | 1 min    |      |
| 54 °C | 0,30 min |      |
| 72 °C | 1 min    |      |
| 72 °C | 7 min    |      |
| 4 °C  | ∞        |      |

#### **3.2.3.1. PCR pozitivne kontrole**

U metodi lančane reakcije polimerazom korištene su 3 pozitivne kontrole koje su predstavljale DNK izdvojene iz referentnih izolata, a ne ispitujućih. U nastavku su navedena ta tri referentna izolata korištena tijekom ovog istraživanja.

|                  |               |               |
|------------------|---------------|---------------|
| Sejroe           | Mozdok        | Grippotyphosa |
| L. Borgpeterenii | L. Kirschneri | L. Kirschneri |
| M 84             | 5621          | Moskva V      |

### 3.2.4. ELEKTROFOREZA U GELU

Kako bi se provjerila uspješnost umnažanja 549 bp secY gena u pretraživanim izolatima, PCR proizvodi su provjereni metodom elektroforeze u gelu. Za navedenu metodu bili su potrebni naredni materijali, reagensi, te pribor i oprema:

#### Materijal, reagensi, pribor i oprema

- Proizvodi lančane reakcije polimerazom – PCR proizvodi
- Mikropipete i odgovarajući nastavci
- Erlenmayerova tikvica zapremnine 300 ml
- Mikrovalna pećnica
- Parafinski film
- Kalup, kadica, češalj i izvor električne struje (CS-300V, Cleaver Scientific, Warwickshire, UK)
- Komora za snimanje gelova (Gel Doc 200, Bio Rad, Richmond, SAD)
- Agarosa (Agarose for routine use, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)
- Boja za DNK (Diamond, Nucleic Acid Dye, Promega, USA)
- Otopina za nanošenje uzoraka u gel tj. bromfenol–plave boje (DNA Loading Buffer, 6x, Lonza, USA)
- Molekulski DNK biljeg (100bp DNA Ladder, Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD)
- TAE pufer 50X, sastav pufera:

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| Tris baza                    | 242 g  |
| Ledena octena kiselina       | 57,1 g |
| EDTA                         | 100 ml |
| Destilirana H <sub>2</sub> O | do 1L  |

Gel za elektroforezu je pripremljen miješanjem agaroze sa TAE puferom u omjeru 1:100, odnosno 0,5 g agaroze sa 50 ml TAE pufera ili 1 g agaroze sa 100 ml TAE pufera. Tako je dobiven 1 % agarozni gel. Navedena mješavina, spravljena je unutar Erlenmayerove tikvice i zagrijana uz pomoć mikrovalne pećnice do otapanja agaroze.

Tikvica je nakon toga hlađena na sobnoj temperaturi, a ohlađenoj, no još uvijek tekućoj agarozu dodano je 3  $\mu$ l boje za DNK (Diamond, Nucleic Acid Dye, Promega, USA). Nakon miješanja sadržaj tikvice je pažljivo izliven u prethodno sastavljen kalup, čija veličina je ovisila o količini agaroze. Zatim je u još tekuću agarozu stavljen odgovarajući češalj za elektroforezu, te je ista ostavljena u tamnom prostoru da se stvrdne u gel. Poslije stvrdnjavanja agaroze, izvađen je češalj čime su stvorene jažice u gelu, a postolje sa gelom je stavljeno u kadicu za elektroforezu ispunjenu TAE puferom. U idućem koraku na parafinski film je nakapano 1  $\mu$ l otopine za nanošenje uzorka u gel, tj. bromfenol–plave boje (DNA Loading Buffer, 6x, Lonza, USA), pa je na istu dodano 5  $\mu$ l PCR produkta, dok je molekularni marker bio umješan u omjeru 1:1 (1  $\mu$ l otopine + 1  $\mu$ l markera razrjeđenja 1:10). Navedene kapi su dobro promiješane, te su stavljene u prethodno pripremljene jažice u gelu. Kadica je potom poklopljena, te je puštena električna struja napona 100 V i jakosti 80 mA tijekom 50 min. Nakon završene elektroforeze gel je snimljen u komori za snimanje gelova (Gel Doc 200, Bio Rad, Richmond, SAD) (Slika 5). Nakon utvrđivanja ispravnosti uzorka pomoću pozitivnih i negativnih kontrola, pripremljeni uzorci DNK poslani su u tvrtku za sekvencioniranje (Macrogen Europe Laboratory, Amsterdam, Nizozemska). Rezultat istog je bio slijed nukleotidnih baza pretraživanih izolata u obliku teksta i elektroferograma.



**Slika 5.** Snimak gela nakon elektroforeze

(Izvor: privatna fotografija).

### 3.2.5. RAČUNALNA OBRADA ELEKTROFEROGRAMA I FILOGENIJSKA ANALIZA

Za vizualizaciju i obradu sekvenci, kao i izradu filogenijskog stabla korišteni su slijedeći računalni programi:

- Chromas Lite 2.1 (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Australija)
- BioEdit
- ClustalX2
- MEGA 7.0 (DNASTAR, Madison, Wisconsin, SAD)

U prvom koraku nukleotidni sljedovi (sekvence) su pregledane u programu Chromas Lite 2.1, prilikom čega su obrisani početni dijelovi koje odgovaraju početnicama i završni koji su bili greškom očitani, jer je ispitivano 1000 bp, dok je gen od interesa velik tek 549 bp. Bitno je naglasiti da su pregledavana oba smjera sekvence (F i R), budući da su moguće greške pri očitovanju samo jednog smjera. Nakon što je u Chromas Lite 2.1 programu uređena sekvenca, ista je uređena u BioEdit programu, na način da su izbrisani krivo očitani dijelovi sekvence. U tom programu su dvije odgovarajuće (komplementarne) sekvence raspoređene jedna ispod druge, te su R sljedovi prebačeni u reverzni komplement kako bi ih usporedili sa F sekvencama. Poslije ovog koraka sekvence su otvorene u ClustalX2 programu prilikom čega su dvije prethodno raspoređene sekvence poravnate, te su iste spremljene u fasta formatu. U slijedećem koraku sekvence su iznova otvarane BioEdit programom te su ispravljane greške u sravnjivanju dvaju komplementarnih sekvenci. Greške su ispravljane nakon ponovnog pregleda sekvenci u Chromas Lite 2.1 programu.

Na kraju je BioEdit program rezultirao oblikovanjem jedne (eng. Consensus) sekvence, nakon čega su sve 33 sekvence otvorene i raspoređene jedna ispod druge. Tim sekvencama su dodane sekvence referentnih sojeva preuzete iz banke gena – NCBI - GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) (Tablica 7) i doktorskog rada Habuš, 2013: „Genetska sljedivost patogenih bakterija roda leptospira u prirodnom žarištu leptospiroze“ (Tablica 8). Rezultat su sekvence koje su još jednom poravnate pomoću programa ClustalX2, pa su navedeni nukleotidni sljedovi otvoreni u programu MEGA 7.0 prilikom čega su filogenijski analizirani.

Filogenijsko stablo temeljilo se na proračunima izvorne udaljenosti „Maximum likelihood method“ algoritmom. Evolucijske udaljenosti procijenjene su „Tamura 3-parametar“ modelom, dok je za procjenu vjernosti reprodukcije specifičnih svojstava filogenijskih stabala rabljena Bootstrap metoda sa 1000 poduzorkovanja.

**Tablica 7.** Referentni sojevi leptospira korišteni u procesu genotipizacije.

| <b>Genomska vrsta</b> | <b>Serovar</b> | <b>Soj</b> |
|-----------------------|----------------|------------|
| <i>L. interrogans</i> | Australis      | MG-392     |
| <i>L. interrogans</i> | Grippotyphosa  | Moskva Y   |
| <i>L. interrogans</i> | Lora           | 2366       |
| <i>L. interrogans</i> | Saxkoebing     | MG-73      |
| <i>L. interrogans</i> | Australis      | K9H        |
| <i>L. interrogans</i> | Canicola       | L14        |
| <i>L. interrogans</i> | Australis      | ballico    |
| <i>L. interrogans</i> | Ramisi         | MG-347     |
| <i>L. interrogans</i> | Pomona         | Pomona     |
| <i>L. interrogans</i> | Saxkoebing     | Mus24      |
| <i>L. interrogans</i> | Kenniwicki     | LT1026     |
| <i>L. noguchii</i>    | Panama         | CZ214k     |
| <i>L. kirschneri</i>  | Grippotyphosa  | Moskva V   |
| <i>L. kirschneri</i>  | Mozdok         | 5621       |
| <i>L. kirschneri</i>  | Tsaratsovo     | B 81/7     |
| <i>L. santarosai</i>  | Brasiliensis   | An 776     |

**Tablica 8.** Sekvence preuzete iz doktorskog rada Habuš, 2013: „Genetska sljedivost patogenih bakterija roda leptospira u prirodnom žarištu leptospiroze“.

| Naziv izolata       | Serovar             | Serološka skupina   | Genomska vrsta           | Porijeklo             |
|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|-----------------------|
| TORMAN              | Poi                 | Javanica            | <i>L. borgpetersenii</i> | čovjek                |
| ŽIVKOVIĆ            | Poi                 | Javanica            | <i>L. borgpetersenii</i> | čovjek                |
| GUDLEK              | Sejroe / Saxkoebing | Sejroe              | <i>L. borgpetersenii</i> | čovjek                |
| CAR                 | Saxkoebing          | Sejroe              | <i>L. borgpetersenii</i> | čovjek                |
| RAUŽAN              | Saxkoebing          | Sejroe              | <i>L. borgpetersenii</i> | čovjek                |
| M-664               | Saxkoebing          | Sejroe              | <i>L. borgpetersenii</i> | miš                   |
| PRPIĆ               | Icterohaemorrhagiae | Icterohaemorrhagiae | <i>L. interrogans</i>    | čovjek                |
| TAR                 | Icterohaemorrhagiae | Icterohaemorrhagiae | <i>L. interrogans</i>    | pas                   |
| HRASTOVIĆ           | Pomona              | Pomona              | <i>L. interrogans</i>    | čovjek                |
| VARDARAC            |                     |                     |                          |                       |
| M5                  | Pomona              | Pomona              | <i>L. interrogans</i>    | mačka                 |
| ŠTENE               |                     |                     |                          |                       |
| GOLDI               | Mozdok              | Pomona              | <i>L. kirschneri</i>     | pas                   |
| C-502               | Pomona              | Pomona              | <i>L. interrogans</i>    | svinja                |
| R 25/75             | Kenewicki           | Pomona              | <i>L. interrogans</i>    | zec                   |
| M-635               | Mozdok              | Pomona              | <i>L. kirschneri</i>     | miš                   |
| PERŠUN              | Bataviae            | Bataviae            | <i>L. interrogans</i>    | čovjek                |
| ČEMINAC             |                     |                     |                          |                       |
| M-1                 | Bataviae            | Bataviae            | <i>L. interrogans</i>    | mačka                 |
| D-67                | Bataviae            | Bataviae            | <i>L. interrogans</i>    | svinja                |
| M-640               | Bataviae            | Bataviae            | <i>L. kirschneri</i>     | miš                   |
| MAHNET              | Grippotyphosa       | Grippotyphosa       | <i>L. kirschneri</i>     | čovjek                |
| LEGRAD 36<br>(LG36) | Grippotyphosa       | Grippotyphosa       | <i>L. kirschneri</i>     | <i>M. arvalis</i>     |
| M-764               | Dadas               | Grippotyphosa       | <i>L. kirschneri</i>     | <i>A. flavicollis</i> |
| M-753               | Bratislava          | Australis           | <i>L. interrogans</i>    | <i>A. flavicollis</i> |
| M-758               | Bratislava          | Australis           | <i>L. interrogans</i>    | <i>A. flavicollis</i> |
| M-792               | Bratislava          | Australis           | <i>L. interrogans</i>    | <i>A. flavicollis</i> |

### 3.3. METODA TIPIZIRANJA NA OSNOVI MULTILOKUSNIH SEKVENCI (MLST)

#### 3.3.1. ODABIR IZOLATA PRETRAŽIVANIH METODOM TIPIZIRANJA NA OSNOVI MULTILOKUSNIH SEKVENCI (MLST)

Za izvođenje MLST metode odabrano je 11 uzoraka za koje je smatrano da su reprezentativan uzorak od 33 uzorka za genotipizaciju, odnosno od 101 uzorka sa kojim je urađena serološka pretraga. Odabrani uzorci su navedeni u Tablici 9. Uzorci su odabrani po genomskoj vrsti, serovaru, vrsti životinje iz koje su izdvojeni i lokaciji pronalaska domaćina. Može se primijetiti da je odabrano osam uzoraka koji su pripadali genomskoj vrsti *Leptospira kirschneri* i tri koje su pripadali genomskoj vrsti *Leptospira interrogans*. Što se tiče pripadnosti serološkoj skupini, četiri uzorka su svrstani u serološku skupinu Pomona, tri uzorka u serološku skupinu Grippotyphosa, tri u serološku skupinu Australis i jedan u serološku skupinu Bataviae. S obzirom na vrstu životinja može se primijetiti da su četiri uzorka izdvojena iz vrste *A. agrarius*, tri uzorka su izdvojena iz vrste *A. flavicollis*, dva uzorka su izdvojena iz vrste *A. sylvaticus*, a po jedan iz vrsta *C. glareolus* i *M. arvalis*. S obzirom na lokalitet, može se zaključiti da je pet uzorka iz Lipovljana, a po jedan iz Draganića, Gerova, Plitvica, Sljemena, Županje i Čakovca.

**Tablica 9.** Odabrani uzorci za tipiziranje multilokusnim sekvencama.

| DNA uzorak | Vrsta životinje       | Lokalitet          | Serološka skupina | Genomska vrsta        |
|------------|-----------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|
| M-845      | <i>A. agrarius</i>    | Draganić           | Bataviae          | <i>L. kirschneri</i>  |
| M-943      | <i>A. sylvaticus</i>  | Sušica 34a, Gerovo | Australis         | <i>L. interrogans</i> |
| M-1084     | <i>A. sylvaticus</i>  | Lipovljani         | Pomona            | <i>L. kirschneri</i>  |
| M-1087     | <i>C. glareolus</i>   | Lipovljani         | Pomona            | <i>L. kirschneri</i>  |
| M-1118     | <i>A. agrarius</i>    | Lipovljani 1       | Pomona            | <i>L. kirschneri</i>  |
| M-1205     | <i>A. agrarius</i>    | Lipovljani         | Australis         | <i>L. interrogans</i> |
| M-1384     | <i>A. flavicollis</i> | Plitvice           | Australis         | <i>L. interrogans</i> |
| M-1391     | <i>A. flavicollis</i> | Sljeme             | Pomona            | <i>L. kirschneri</i>  |
| M-1740     | <i>A. agrarius</i>    | Lipovljani         | Grippotyphosa     | <i>L. kirschneri</i>  |
| M-1812     | <i>A. flavicollis</i> | Županja            | Grippotyphosa     | <i>L. kirschneri</i>  |
| M-1990     | <i>M. arvalis</i>     | Čakovec            | Grippotyphosa     | <i>L. kirschneri</i>  |

### 3.3.2. METODA TIPIZIRANJA NA OSNOVI MULTILOKUSNIH SEKVENCI (MLST)

Od nekoliko poznatih MLST shema za ovo istraživanje odabrano je ono koje se temelji na umnažanju šest gena; od kojih je četiri (adk, icdA, rrs2, secY) dobro evolucijski očuvano (engl. housekeeping), dok su dva promjenjiva i kodiraju lipoproteine vanjske ovojnice (LipL32, LipL41). Od šest odabranih gena, smatra se da su geni adk, icdA i secY značajno promjenjivi, dok su geni koji kodiraju lipoproteine vanjske membrane LipL32 i LipL41, te rrs2 gen bili umjereno promjenjivi. (AHMED i sur., 2004.).

U svrhu tipiziranja od odabranih 11 izolata umnoženo i sekvencirano je šest lokusa (dijelova gena) i dobiveno po šest uređenih nukleotidnih sljedova koji su zatim spojeni u jednu divovsku sekvencu, koja predstavlja tzv. mega-lokus. Redoslijed spajanja gena u nukleotidnom slijedu mega-lokusa bio je slijedeći: adk, icdA, LipL32, LipL41, rrs2 i na kraju secY (Tablica 10).

**Tablica 10.** MLST: ciljni geni, početnice i očekivane veličine umnoženih proizvoda.

| Naziv gena | Funkcija gena                       | Nukleotidni slijed početnica                          | Veličina umnoženog proizvoda (bp) |
|------------|-------------------------------------|---|-----------------------------------|
| adk        | Adenilat kinaza                     | F-GGGCTGGAAAAGGTACACAA<br>R-ACGCAAGCTCCTTTTGAATC      | 531                               |
| icdA       | Izocitrat dehidrogenaza             | F-GGGACGAGATGACCAGGAT<br>R-TTTTTTGGAGATCCGCAGCTTT     | 674                               |
| LipL32     | Lipoprotein vanjske membrane LipL32 | F-ATCTCCGTTGCACTCTTTGC<br>R-ACCATCATCATCATCGTCCA      | 474                               |
| LipL41     | Lipoprotein vanjske membrane LipL41 | F-TAGGAAATTGCGCAGCTACA<br>R-GCATCGAGAGGAATTAACATCA    | 518                               |
| rrs2       | 16S ribosomalna RNK                 | F-CATGCAAGTCAAGCGGAGTA<br>R-AGTTGAGCCCGCAGTTTT        | 452                               |
| secY       | Preproteinska translokaza secY      | F-ATGCCGATCATTTTTGCTTC<br>R-CCGTCCCTTAATTTTAGACTTCTTC | 549                               |



Mješavina reagensa i odgovarajućih početnica zvana Master mix pripremljena je po slijedećim protokolima:

Protokol reakcije za adk, icdA, LipL32, LipL41 i rrs2 gene

| PCR MIX                  | za 1 uzorak ( $\mu$ l) |
|--------------------------|------------------------|
| Emerald PCR mix, 2x      | 12                     |
| Početnica F (10 $\mu$ M) | 0.5                    |
| Početnica R (10 $\mu$ M) | 0.5                    |
| PCR voda                 | 10.75                  |

Protokol reakcije za secY gen

| PCR MIX                          | za 1 uzorak ( $\mu$ l) |
|----------------------------------|------------------------|
| 10X PCR buffer                   | 2.5                    |
| dNTP                             | 2                      |
| Početnica SecY F (10 $\mu$ M)    | 0.625                  |
| Početnica SecY PPR2 (10 $\mu$ M) | 0.625                  |
| PCR voda                         | 16.625                 |
| Taqara Taq HC                    | 0.125                  |

U epruvete za PCR raspodijeljeno je po 23,75  $\mu$ l Master Mix mješavine i dodano 1,25  $\mu$ l istraživane DNK uzorka. Kao negativna kontrola služila je Master Mix mješavina kojoj je umjesto izdvojene DNK uzoraka, dodano 1,25  $\mu$ l PCR vode (molekularno čiste vode). Na ovaj način pripremljeni uzorci su inkubirani u PCR uređaju pod slijedećim uvjetima temperature i vremena:

Program umnažanja adk, icdA, LipL32, LipL41, rrs2 i secY gena

Program PCR ciklusa

|        |          |      |
|--------|----------|------|
| 95 °C  | 5 min    | } 34 |
| 94 °C  | 1 min    |      |
| TS* °C | 0,30 min |      |
| 72 °C  | 1 min    |      |
| 72 °C  | 7 min    |      |
| 4 °C   | ∞        |      |

TS\* - temperature spajanja navedene su za svaki par početnica u Tablici 11

**Tablica 11.** MLST: geni i temperature spajanja.

| Naziv gena | Temperature spajanja (°C) |
|------------|---------------------------|
| adk        | 52                        |
| icdA       | 54                        |
| LipL32     | 54                        |
| LipL41     | 54                        |
| rrs2       | 54                        |
| secY       | 54                        |

Svi dobiveni PCR produkti nakon umnažanja u PCR uređaju provjereni su pomoću elektroforeze. Navedeni postupak detaljno je opisan u poglavlju 3.2.4. Elektroforeza u gelu.

Na ovaj način pripremljeni i provjereni uzorci DNK poslani su u tvrtku za sekvenciniranje (Macrogen Europe Laboratory, Amsterdam, Nizozemska). Rezultat sekvencioniranja je bio slijed nukleotidnih baza pretraživanih izolata u obliku teksta i elektroferograma. Obrada računalnim programima dobivenih nukleotidnih sljedova izvođena je na jednak način opisan u poglavlju 3.2.5. Računalna obrada elektroferograma i filogenijska analiza. S razlikom da je za svaki odabrani uzorak dobiveno po 6 uređenih nukleotidnih sekvenci koje su zatim spojene u jednu divovsku „megasekvencu“. Redoslijed spajanja gena u nukleotidnom slijedu mega-lokusa bio je; *adk*, *icdA*, *LipL32*, *LipL41*, *rrs2* i na kraju *secY*.

Tako dobivene uređene i poravnate megasekvence unešene su u MEGA 7.0 računalni program. Dobiveni podatci uspoređeni su međusobno, kao i sa sekvencama referentnih sojeva preuzetih iz banke gena – NCBI - GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)), te megasekvencama dobivenim iz doktorskog rada Habuš, 2013: „Genetska sljedivost patogenih bakterija roda leptospira u prirodnom žarištu leptospiroze“ (Tablica 8). Iz banke gena odabrani su dostupni referentni sojevi koji predstavljaju sve pretraživane serološke skupine i genomske vrste (Tablica 12). Prije izrade filogenijskog stabla, megasekvence su otvorene u ClustalX2 programu prilikom čega su poravnate. Filogenijska analiza temeljila se na proračunima izvorne udaljenosti Neighbor Joining algoritma. Evolucijske udaljenosti procijenjene su „Tamura-Nei“ modelom s „Gamma“ distribucijom, dok su za procjenu vjernosti reprodukcije specifičnih svojstava filogenijskih stabala korištena Bootstrap metoda sa 1000 poduzorkovanja.

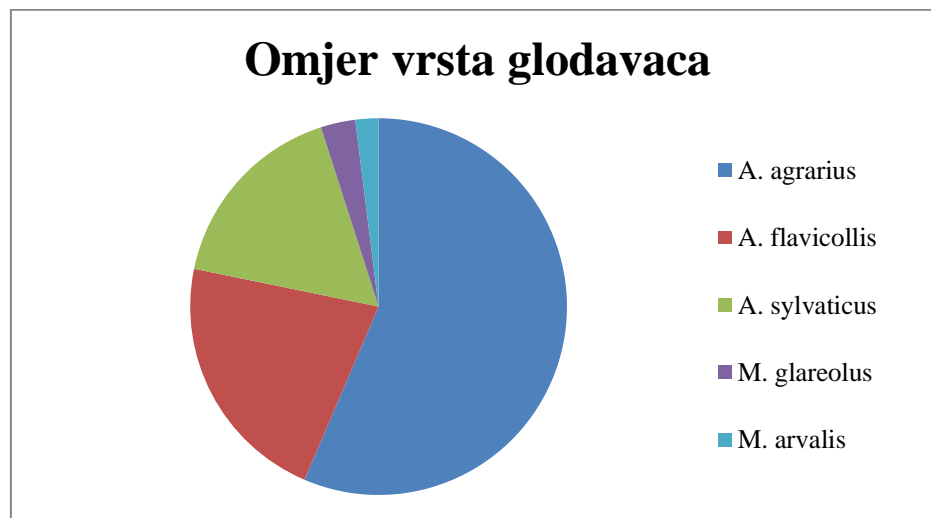
**Tablica 12.** Referentni sojevi leptospira rabljeni u filogenijskim analizama (MLST).

| <b>Soj</b> | <b>Serovar</b> | <b>Serološka skupina</b> | <b>Genomska vrsta</b> |
|------------|----------------|--------------------------|-----------------------|
| Lora       | Lora           | Australis                | <i>L. interrogans</i> |
| Ballico    | Australis      | Australis                | <i>L. interrogans</i> |
| Brem 137   | Bratislava     | Australis                | <i>L. interrogans</i> |
| C90        | Muenchen       | Australis                | <i>L. interrogans</i> |
| 33         | Fudge          | Australis                | <i>L. interrogans</i> |
| 2008720116 | Jalna          | Australis                | <i>L. interrogans</i> |
| T62-68     | Hawain         | Australis                | <i>L. interrogans</i> |
| Pomona     | Pomona         | Pomona                   | <i>L. interrogans</i> |
| Kennewicky | Pomona         | Pomona                   | <i>L. interrogans</i> |
| 5621       | Mozdok         | Pomona                   | <i>L. kirschneri</i>  |
| B 81/7     | Tsaratsovo     | Pomona                   | <i>L. kirschneri</i>  |
| Moskva V   | Grippotyphosa  | Grippotyphosa            | <i>L. interrogans</i> |
| Wumalasena | Ratnapura      | Grippotyphosa            | <i>L. kirschneri</i>  |
| Kipod 179  | Vanderhoedeni  | Grippotyphosa            | <i>L. kirschneri</i>  |
| RM2        | Muelleri       | Grippotyphosa            | <i>L. interrogans</i> |
| Valbuzzi   | Valbuzzi       | Grippotyphosa            | <i>L. interrogans</i> |
| 129        | Bataviae       | Bataviae                 | <i>L. kirschneri</i>  |
| LT101-69   | Losbanos       | Bataviae                 | <i>L. interrogans</i> |
| 55         | Paidjan        | Bataviae                 | <i>L. interrogans</i> |
| Swart      | Bataviae       | Bataviae                 | <i>L. interrogans</i> |

## **4. REZULTATI**

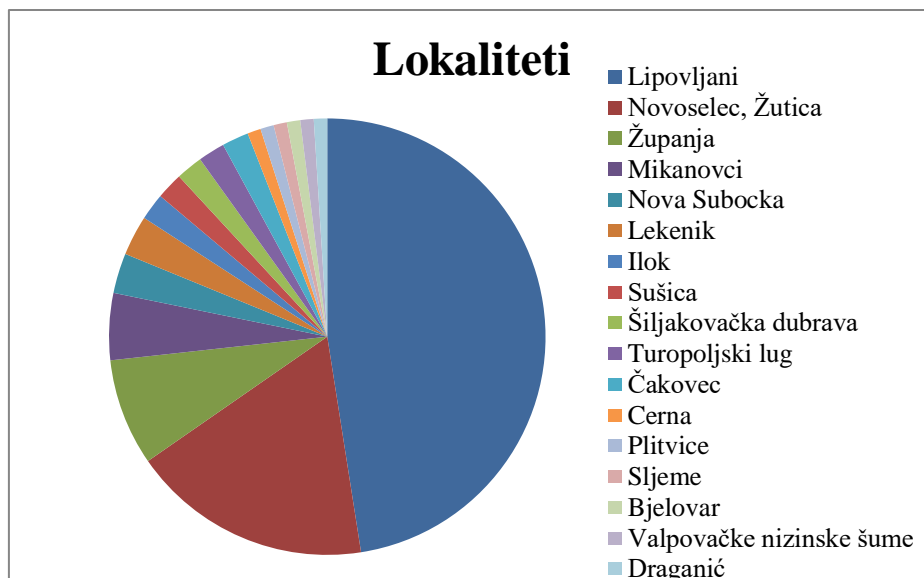
#### 4.1. ANALIZA PODATAKA O PRIKUPLJENIM IZOLATIMA

Tijekom ovog istraživanja rabljen je sto jedan izolat prikupljen iz mišolikih glodavaca na područjima prirodnih žarišta Hrvatske. Uzimajući u obzir vrstu domaćina iz kojih su izdvojeni izolati, pedeset sedam izolata (56,4%) izdvojeno je iz prugastog poljskog miša (*A. agrarius*), dvadeset i dva (21,8%) iz žutogrlog miša (*A. flavicollis*), sedamnaest (16,8%) iz običnog šumskog miša (*A. sylvaticus*), tri (3%) iz šumske voluharice (*M. glareolus*) i dva (2%) iz obične voluharice (*M. arvalis*) (Slika 6).



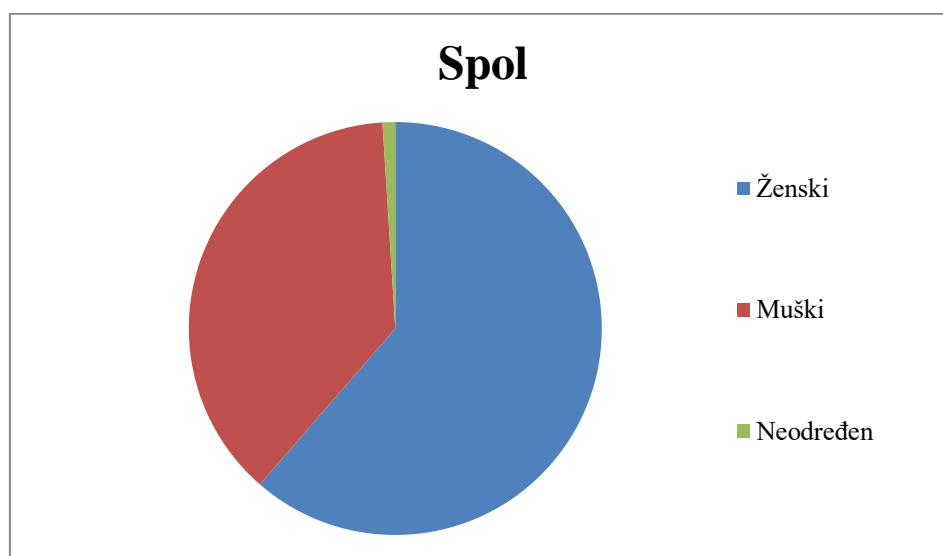
**Slika 6.** Zastupljenost vrsta glodavaca iz kojih su izdvojeni izolati u ukupnim izolatima korištenim tijekom ovog istraživanja.

S obzirom na lokalitet na kojem su glodavci ulovljeni, četrdeset i osam izolata (47,5%) je iz Lipovljana, osamnaest (17,8%) je iz Novoselca, osam (7,9%) iz Županje, pet (5%) izolata je iz Mikanovca, po tri (3%) su iz Nove Subocke i Lekenika, dok su po dva (2%) izolata iz Iloka, Sušice, Šiljakovačke dubrave, Turopoljskog luga i Čakovca, te po jedan (1%) iz Cerne, Plitvica, Sljemena, Bjelovara, Valpovačkih nizinskih šuma i Draganića (Slika 7).



**Slika 7.** Zastupljenost izdvojenih izolata iz pojedinih lokaliteta korištenih u ovom istraživanju.

Na Slici 8. može se vidjeti spol glodavaca iz kojih su izdvojeni izolati rabljeni u ovom istraživanju. Od svih pregledanih glodavaca, 38 ih je bilo muškog spola (37,6 %), 62 glodavaca bila su ženskog spola (61,4%), dok se za jednog glodavca nisu uspjeli pronaći podatci o spolu (1%).



**Slika 8.** Odnos spolova domaćina iz kojih su izdvojeni izolati koji su korišteni u ovom istraživanju.

## 4.2. ODREĐIVANJE SEROLOŠKE SKUPINE

Za 77, do sad nedeterminiranih izolata pripadnost serološkoj skupini određena je mikroskopskom aglutinacijom uz pomoć 12 hiperimunih seruma koji su predstavljali serovare prisutne na području Republike Hrvatske. Smatrano je da istraživani izolati pripadaju serološkoj skupini soja s čijim je hiperimunim serumom aglutinacija bila vidljiva u najvećem titru. Utvrđni titar izolata bio je u rasponu od 1:400 do 1:3200 (Tablica 13).

**Tablica 13.** Prikaz pretraženih izolata, njihovog porijekla i rezultati pretraživanja hiperimunim serumima.

| Oznaka izolata | Porijeklo izolata           | Lokalitet         | Determinacija kultura hiperimunim serumom | Serološka skupina |
|----------------|-----------------------------|-------------------|---|-------------------|
| M-615          | <i>Apodemus agrarius</i>    | Mikanovci         | Pomona *                                  | Pomona            |
| M-619          | <i>Apodemus agrarius</i>    | Mikanovci         | Pomona *                                  | Pomona            |
| M-621          | <i>Apodemus agrarius</i>    | Mikanovci         | Pomona *                                  | Pomona            |
| M-631          | <i>Microtus arvalis</i>     | Mikanovci         | Grippyphosa 1:3200                        | Grippyphosa       |
| M-634          | <i>Apodemus agrarius</i>    | Mikanovci         | Pomona *                                  | Pomona            |
| M-641          | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Ilok              | Australis *                               | Australis         |
| M-644          | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Ilok              | Australis *                               | Australis         |
| M-656          | <i>Apodemus agrarius</i>    | Cerna             | Pomona *                                  | Pomona            |
| M-742          | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Novoselec, Žutica | Australis *                               | Australis         |
| M-745          | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Novoselec, Žutica | Australis *                               | Australis         |
| M-747          | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Novoselec, Žutica | Australis *                               | Australis         |
| M-751          | <i>Apodemus flavicollis</i> | Novoselec, Žutica | Australis *                               | Australis         |
| M-753          | <i>Apodemus flavicollis</i> | Novoselec, Žutica | Australis *                               | Australis         |
| M-754          | <i>Apodemus flavicollis</i> | Novoselec, Žutica | Australis *                               | Australis         |
| M-758          | <i>Apodemus flavicollis</i> | Novoselec, Žutica | Australis *                               | Australis         |
| M-764          | <i>Apodemus flavicollis</i> | Novoselec, Žutica | Grippyphosa 1:1600                        | Grippyphosa       |
| M-789          | <i>Apodemus flavicollis</i> | Novoselec, Žutica | Australis *                               | Australis         |
| M-790          | <i>Apodemus flavicollis</i> | Novoselec, Žutica | Australis *                               | Australis         |
| M-792          | <i>Apodemus flavicollis</i> | Novoselec, Žutica | Australis *                               | Australis         |
| M-795          | <i>Apodemus flavicollis</i> | Novoselec, Žutica | Pomona *                                  | Pomona            |
| M-812          | <i>Apodemus agrarius</i>    | Novoselec, Žutica | Pomona *                                  | Pomona            |
| M-814          | <i>Apodemus flavicollis</i> | Novoselec, Žutica | Pomona *                                  | Pomona            |
| M-832          | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Novoselec, Žutica | Australis *                               | Australis         |
| M-833          | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Novoselec, Žutica | Pomona *                                  | Pomona            |
| M-837          | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Novoselec, Žutica | Australis *                               | Australis         |
| M-841          | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Novoselec, Žutica | Australis *                               | Australis         |

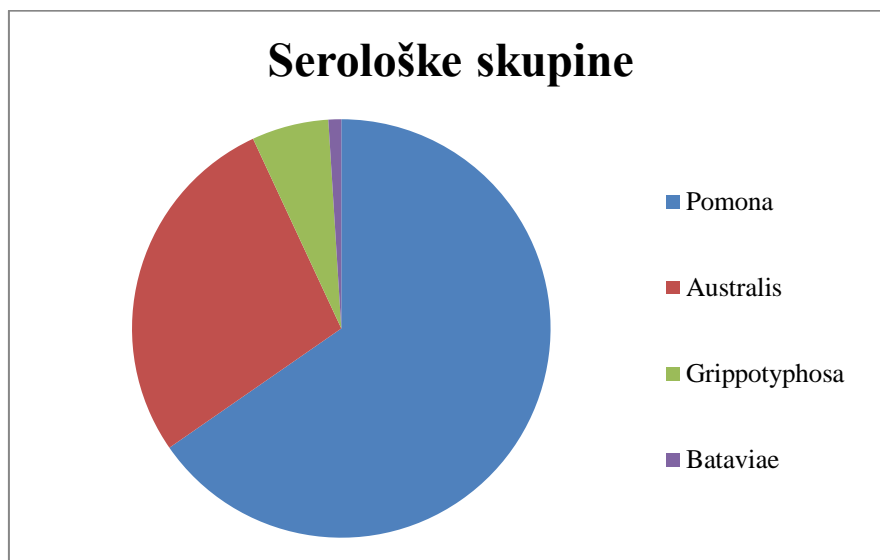


|        |                             |                       |   |               |
|--------|-----------------------------|-----------------------|---|---------------|
| M-845  | <i>Apodemus agrarius</i>    | Draganić              | Bataviae 1:3200<br>Tarassovi 1:100          | Bataviae      |
| M-864  | <i>Apodemus flavicollis</i> | Sušica 1a             | Australis 1:1600<br>Grippytyphosa 1:100     | Australis     |
| M-943  | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Sušica 34a,<br>Gerovo | Australis 1:3200                            | Australis     |
| M-1019 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani AA1        | Pomona 1:3200                               | Pomona        |
| M-1078 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani 1 175a     | Pomona 1:800                                | Pomona        |
| M-1084 | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Lipovljani            | Pomona 1:3200                               | Pomona        |
| M-1086 | <i>Myodes glareolus</i>     | Lipovljani            | Pomona 1:1600                               | Pomona        |
| M-1087 | <i>Myodes glareolus</i>     | Lipovljani            | Pomona 1:400 RGA 1:100                      | Pomona        |
| M-1088 | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Lipovljani            | Pomona 1:800                                | Pomona        |
| M-1089 | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Lipovljani            | Pomona 1:400                                | Pomona        |
| M-1090 | <i>Myodes glareolus</i>     | Lipovljani            | Pomona 1:800                                | Pomona        |
| M-1117 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani 1          | Pomona 1:800                                | Pomona        |
| M-1118 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani 1          | Pomona 1:200                                | Pomona        |
| M-1166 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovoljani           | Pomona 1:800 Poi 1:100                      | Pomona        |
| M-1167 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovoljani           | Pomona 1:200                                | Pomona        |
| M-1172 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovoljani           | Pomona 1:3200                               | Pomona        |
| M-1205 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovoljani           | Australis 1:3200                            | Australis     |
| M-1216 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovoljani           | Pomona 1:800 Ballum 1:100<br>Bataviae 1:100 | Pomona        |
| M-1217 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovoljani           | Pomona 1:200                                | Pomona        |
| M-1384 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Plitvice              | Australis 1:800<br>Autumnalis 1:50          | Australis     |
| M-1391 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Sljeme                | Pomona 1:3200 Poi 1:50                      | Pomona        |
| M-1709 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani            | Pomona 1:800                                | Pomona        |
| M-1711 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani            | Pomona 1:400                                | Pomona        |
| M-1712 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani            | Pomona 1:1600                               | Pomona        |
| M-1713 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani            | Pomona 1:800                                | Pomona        |
| M-1718 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani            | Pomona 1:400                                | Pomona        |
| M-1719 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani            | Pomona 1:400                                | Pomona        |
| M-1723 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani            | Pomona 1:800                                | Pomona        |
| M-1725 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani            | Pomona 1:1600                               | Pomona        |
| M-1726 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani            | Pomona 1:1600                               | Pomona        |
| M-1729 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani            | Pomona 1:3200                               | Pomona        |
| M-1735 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani            | Pomona 1:400                                | Pomona        |
| M-1739 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani            | Pomona 1:800                                | Pomona        |
| M-1740 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani            | Grippytyphosa 1:1600                        | Grippytyphosa |
| M-1743 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani            | Pomona 1:800                                | Pomona        |
| M-1744 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani            | Pomona 1:400                                | Pomona        |
| M-1745 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani            | Pomona 1:400                                | Pomona        |
| M-1746 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani            | Pomona 1:400                                | Pomona        |
| M-1747 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani            | Pomona 1:400                                | Pomona        |

|        |                             |                                      |                                      |               |
|--------|-----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------|
| M-1749 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani                           | Pomona 1:800                         | Pomona        |
| M-1750 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani                           | Pomona 1:400                         | Pomona        |
| M-1751 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani                           | Pomona 1:800                         | Pomona        |
| M-1752 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani                           | Pomona 1:800                         | Pomona        |
| M-1755 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani                           | Pomona 1: 400                        | Pomona        |
| M-1759 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani                           | Pomona 1:1600                        | Pomona        |
| M-1760 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani                           | Pomona 1:400                         | Pomona        |
| M-1761 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani                           | Pomona 1:3200                        | Pomona        |
| M-1762 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani                           | Pomona 1:3200                        | Pomona        |
| M-1766 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani                           | Pomona 1:800                         | Pomona        |
| M-1769 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani                           | Pomona 1:3200                        | Pomona        |
| M-1771 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani                           | Pomona 1:1600                        | Pomona        |
| M-1773 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Lipovljani                           | Pomona 1:1600                        | Pomona        |
| M-1776 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Lipovljani                           | Pomona 1:100                         | Pomona        |
| M-1780 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Nova Subocka                         | Pomona 1:400                         | Pomona        |
| M-1781 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Nova Subocka                         | Pomona 1:3200                        | Pomona        |
| M-1782 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Nova Subocka                         | Pomona 1:800                         | Pomona        |
| M-1784 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Županja                              | Australis 1:3200                     | Australis     |
| M-1785 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Županja                              | Pomona 1:800                         | Pomona        |
| M-1789 | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Županja K1                           | Pomona 1:3200                        | Pomona        |
| M-1798 | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Županja K4                           | Pomona 1:800                         | Pomona        |
| M-1802 | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Županja                              | Australis 1:3200                     | Australis     |
| M-1805 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Županja                              | Pomona 1:1600                        | Pomona        |
| M-1812 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Županja                              | Grippytyphosa 1:3200                 | Grippytyphosa |
| M-1817 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Županja                              | Pomona 1:1600                        | Pomona        |
| M-1990 | <i>Microtus arvalis</i>     | Čakovec                              | Grippytyphosa 1:1600                 | Grippytyphosa |
| M-1994 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Čakovec                              | Pomona 1:1600                        | Pomona        |
| M-2012 | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Velika Gorica,<br>Turopoljski lug 7a | Australis 1:3200<br>Pomona 1:100     | Australis     |
| M-2128 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Lekenik 37B                          | Australis 1:3200                     | Australis     |
| M-2139 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Lekenik 51A                          | Australis 1:3200                     | Australis     |
| M-2141 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Lekenik 51A                          | Grippytyphosa 1:1600                 | Grippytyphosa |
| M-2179 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Turopoljski lug                      | Australis 1:3200                     | Australis     |
| M-2182 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Šiljakovačka<br>dubrava              | Australis 1:3200                     | Australis     |
| M-2183 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Šiljakovačka<br>dubrava              | Australis 1:3200<br>Hebdomadis 1:100 | Australis     |
| M-2230 | <i>Apodemus agrarius</i>    | Bjelovar                             | Pomona 1:3200                        | Pomona        |
| M-2234 | <i>Apodemus flavicollis</i> | Valpovačke<br>nizinske šume 47b      | Australis 1:3200                     | Australis     |

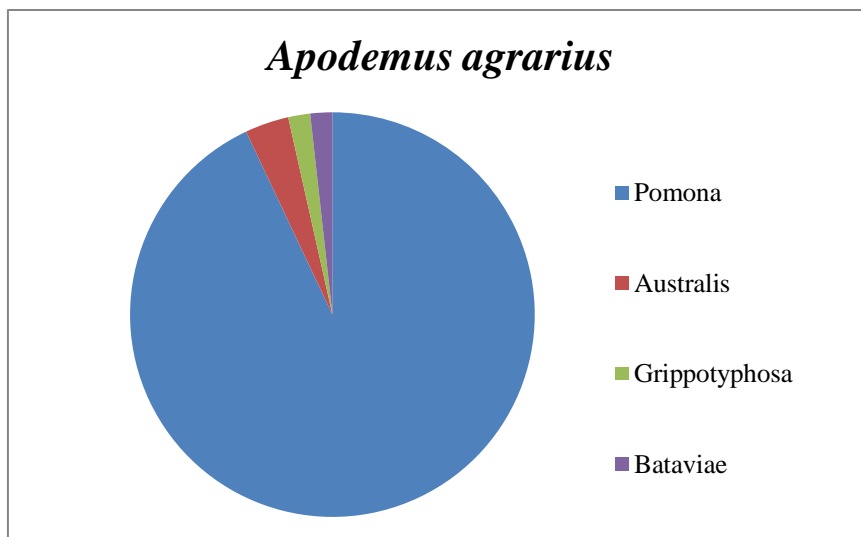
\* Uzorci koji nisu pretraženi hiperimunim serumima tijekom ovog istraživanja, obzirom da je njihova serološka tipizacija obavljena tijekom prijašnjih istraživanja.

Nakon što su ovim rezultatima pribrojani izolati (kojima je pripadnost serološkoj skupini determinirana tijekom prijašnjih istraživanja) utvrđeno je da 65,3% (66/101) izolata pripada serološkoj skupini Pomona. Serološkoj skupini Australis je pripada 27,7% (28/101) izolata, serološkoj skupini Grippytyphosa 6% (6/101) izolata, a preostalih 1% (1/101) pretraženih izolata, pripada serološkoj skupini Bataviae (Slika 9).



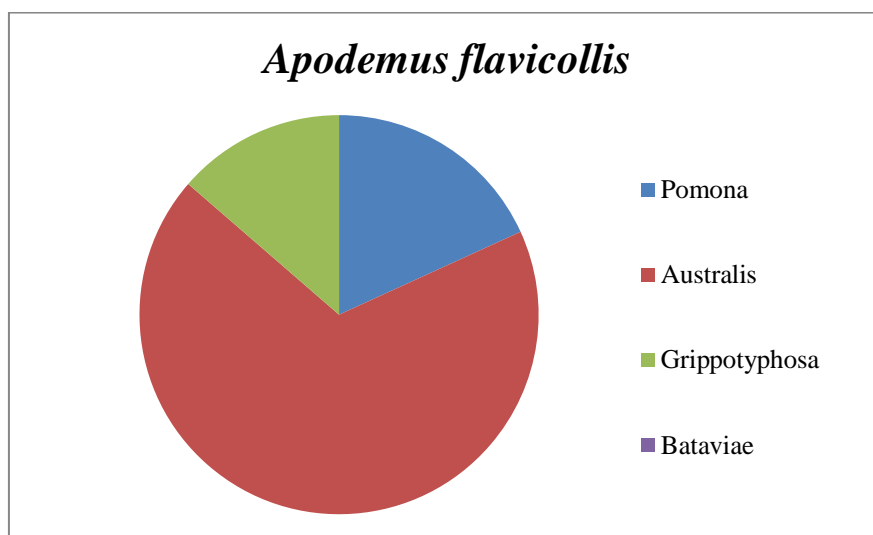
**Slika 9.** Zastupljenost seroloških skupina u svim izolatima korištenim u ovom istraživanju.

Analiza prikupljenih podataka pokazuje da od dostupnih pedeset sedam izolata izdvojenih iz prugastog poljskog miša (*A. agrarius*), serološkoj skupini Pomona pripada 93% izolata (53/57), serološkoj skupini Australis pripada 4% (2/57) izolata prugastih poljskih miševa pretraženih tijekom ovog istraživanja, a serološkim skupinama Grippytyphosa i Bataviae pripada po 2% (1/57) pretraženih izolata (Slika 10).



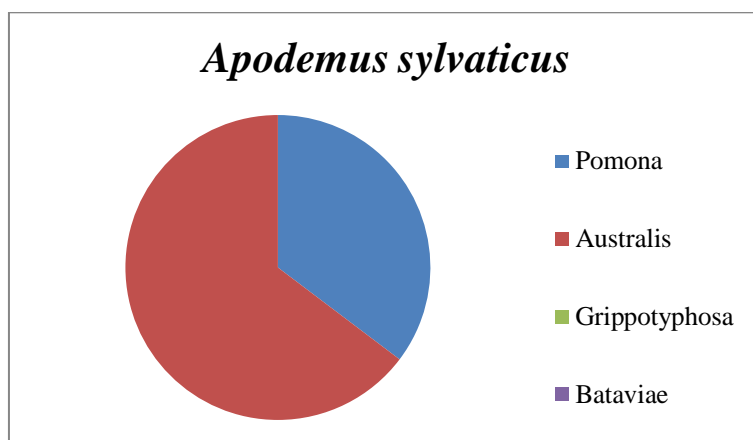
**Slika 10.** Zastupljenost pojedinih seroloških skupina u izolatima izdvojenim iz prugastog poljskog miša tijekom ovog istraživanja.

Od dvadeset dva izolata izdvojena iz žutogrlih miševa (*A. flavicollis*) koji su pretraženi u ovom istraživanju, 68% (15/22) izolata pripadalo je serološkoj skupini Australis, 18% (4/22) serološkoj skupini Pomona, a 14% (3/22) serološkoj skupini Grippytyphosa (Slika 11).



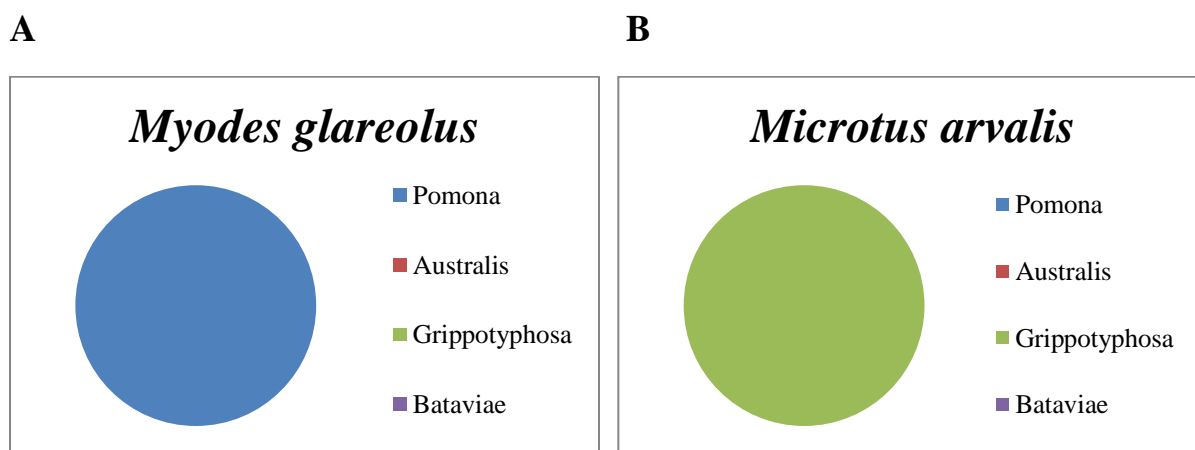
**Slika 11.** Zastupljenost pojedinih seroloških skupina u izolatima izdvojenim iz žutogrlih miševa tijekom ovog istraživanja.

Od sedamnaest izolata izdvojenih iz običnog šumskog miša (*A. sylvaticus*) pretraženih u ovom istraživanju, 65% (11/17) izolata je pripadalo serološkoj skupini Australis, a 35% (6/17) serološkoj skupini Pomona (Slika 12).



**Slika 12.** Zastupljenost pojedinih seroloških skupina u izolatima izdvojenim iz običnog šumskog miša tijekom ovog istraživanja.

Na Slici 13 vidi se da tri izolata izdvojena iz šumskih voluharica (*M. glareolus*) pripadaju serološkoj skupini Pomona (3/3; 100%), dok su dva izolata izdvojena iz običnih voluharica (*M. arvalis*) determinirani kao serološka skupina Grippotyphosa (2/2; 100%).

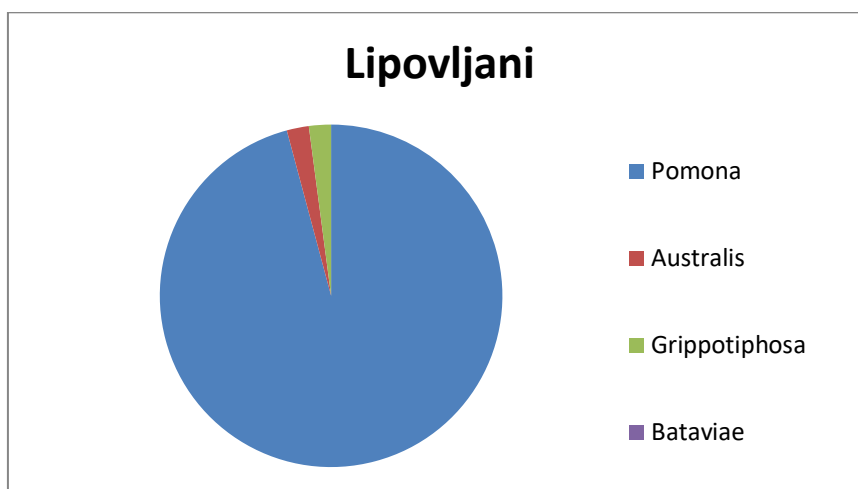


**Slika 13.**

**A.** Zastupljenost pojedinih seroloških skupina u izolatima izdvojenim iz šumskih voluharica tijekom ovog istraživanja.

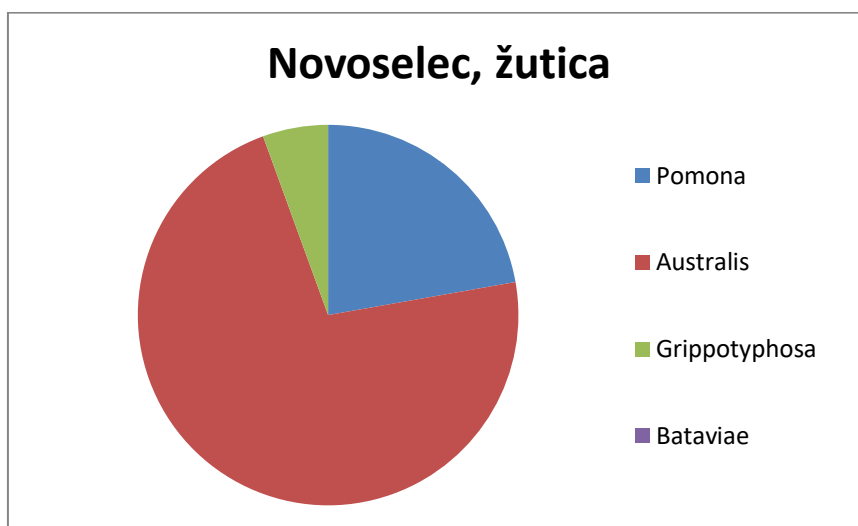
**B.** Zastupljenost pojedinih seroloških skupina u izolatima izdvojenim iz običnih voluharica tijekom ovog istraživanja.

S druge strane, može se vidjeti raširenost pojedinih serovara na određenom lokalitetu. Na primjer na lokalitetu Lipovljani izdvojeno je četrdeset i osam izolata od kojih je četrdeset šest Pomona (96%), jedan Australis (2%) i jedan Grippytyphosa (2%) (Slika 14).



**Slika 14.** Zastupljenost pojedinih seroloških skupina kod izolata pretraženih tijekom ovog istraživanja na lokalitetu Lipovljani.

Ili se pak može vidjeti raširenost pojedinih serovara na lokalitetu Novoselec, Žutica gdje je izdvojeno osamnaest izolata od kojih su četiri Pomone (22%), trinaest Australis (72%) i jedan Grippytyphosa (6%) (Slika 15).

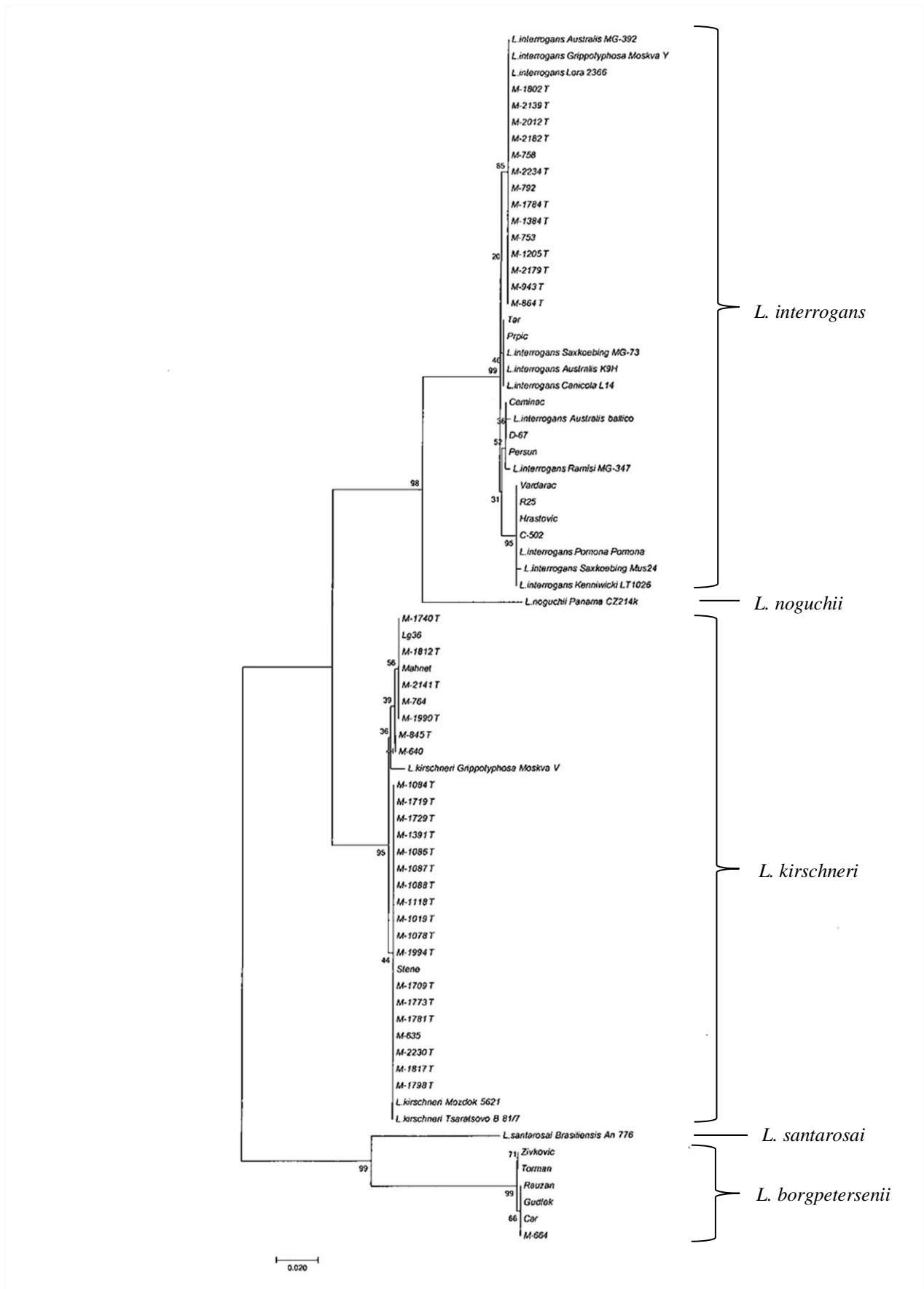


**Slika 15.** Zastupljenost pojedinih seroloških skupina kod izolata pretraženih tijekom ovog istraživanja na lokalitetu Novoselec, Žutica.

### **4.3. ODREĐIVANJE GENOMSKE VRSTE IZOLATA UMNAŽANJEM I FILOGENIJSKOM ANALIZOM 245 BP ODSJEČAKA *secY* GENA**

Za određivanje genomske vrste pomoću umnažanja, sekvenciranja i filogenijske analize *secY* gena odabrana su 33 uzoraka. Odabir uzoraka temeljio se na rezultatima serološke pretrage hiperimunim serumima odnosno pripadnosti određenoj serološkoj skupini, vrsti domaćina iz kojeg je izdvojen navedeni uzorak, te lokalitetu na kojem je ulovljen domaćin. Smatramo da smo na taj način dobili reprezentativan uzorak svih izolata na kojima je rađena serološka determinacija, obzirom na nabrojane kategorije.

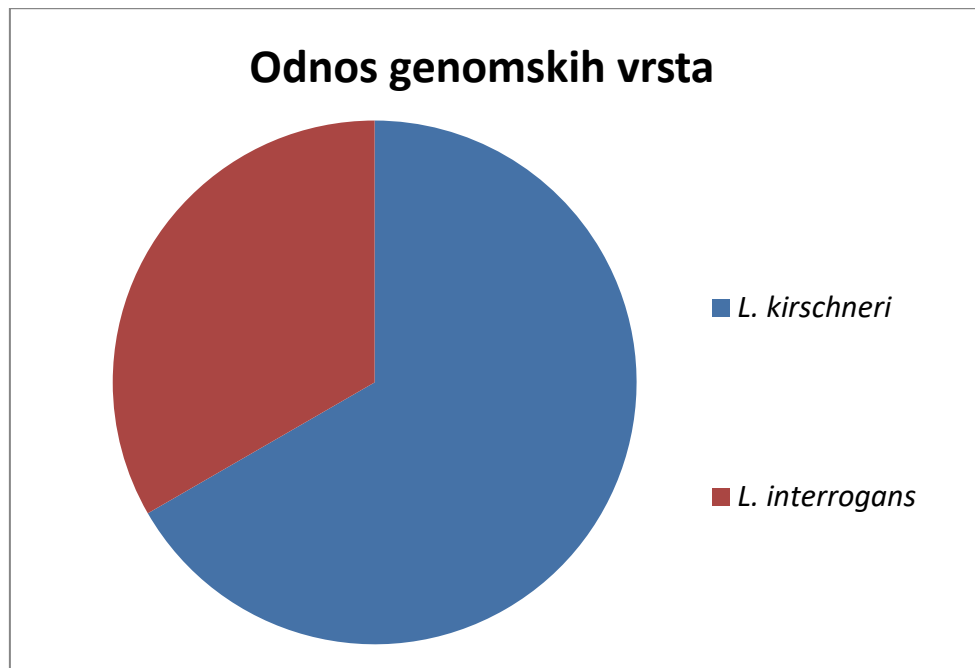
Analizom dobivenog filogenijskog stabla prikazanog na Slici 16. ustanovljeno je da od 33 pretraživana uzorka njih 22 pripada genomskoj vrsti *L. kirschneri* (M-845, M-1019, M-1078, M-1084, M-1086, M-1087, M-1088, M-1118, M-1391, M-1709, M-1719, M-1729, M-1740, M-1773, M-1781, M-1798, M-1812, M-1817, M-1990, M-1994, M-2141, M-2230), dok je njih 11 svrstano u genomsku vrstu *L. interrogans* (M-864, M-943, M-1205, M-1384, M-1784, M-1802, M-2012, M-2139, M-2179, M-2182, M-2234).



**Slika 16.** Filogenijsko stablo dobiveno analizom odsječka SecY gena veličine 245 bp pretraživanih izolata, referentnih sojeva i već determiniranih lokalnih sojeva.

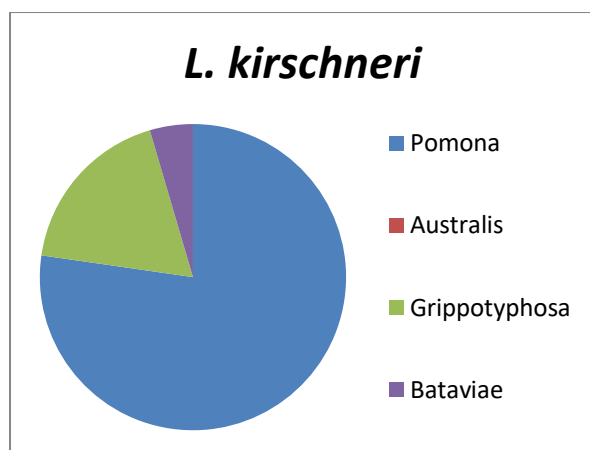
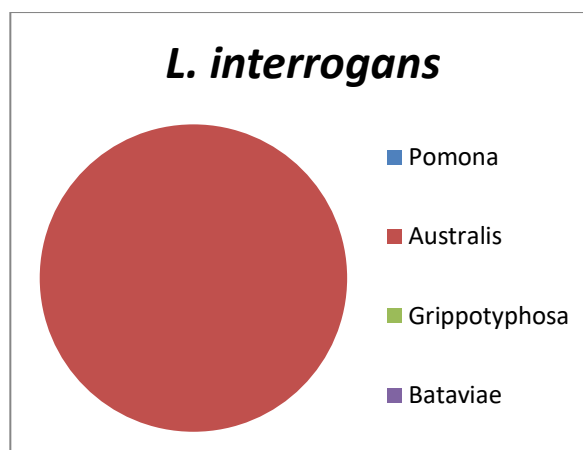


Odnos u broju genomskih vrsta kod odabranih uzoraka može se vidjeti na Slici 17. Vidljivo je da genomskoj vrsti *L. kirschneri* pripada 66,6% svih uzoraka pretraženih u ovom istraživanju, dok genomskoj vrsti *L. interrogans* pripada 33,3% svih pretraženih uzoraka.



**Slika 17.** Odnos genomskih vrsta izolata pretraženih u ovom istraživanju pomoću filogenijske analize 245 bp secY gena.

Analizom navedenog filogenijskog stabla i rezultata dobivenih hiperimunim serumima ustanovili smo da svi pretraženi izolati genomske vrste *L. interrogans* pripadaju u serološku skupinu Australis, dok unutar genomske vrste *L. kirschneri* nalazimo izolate svrstane u serološke skupine Pomona, Grippytyphosa i Bataviae (Slika 18).

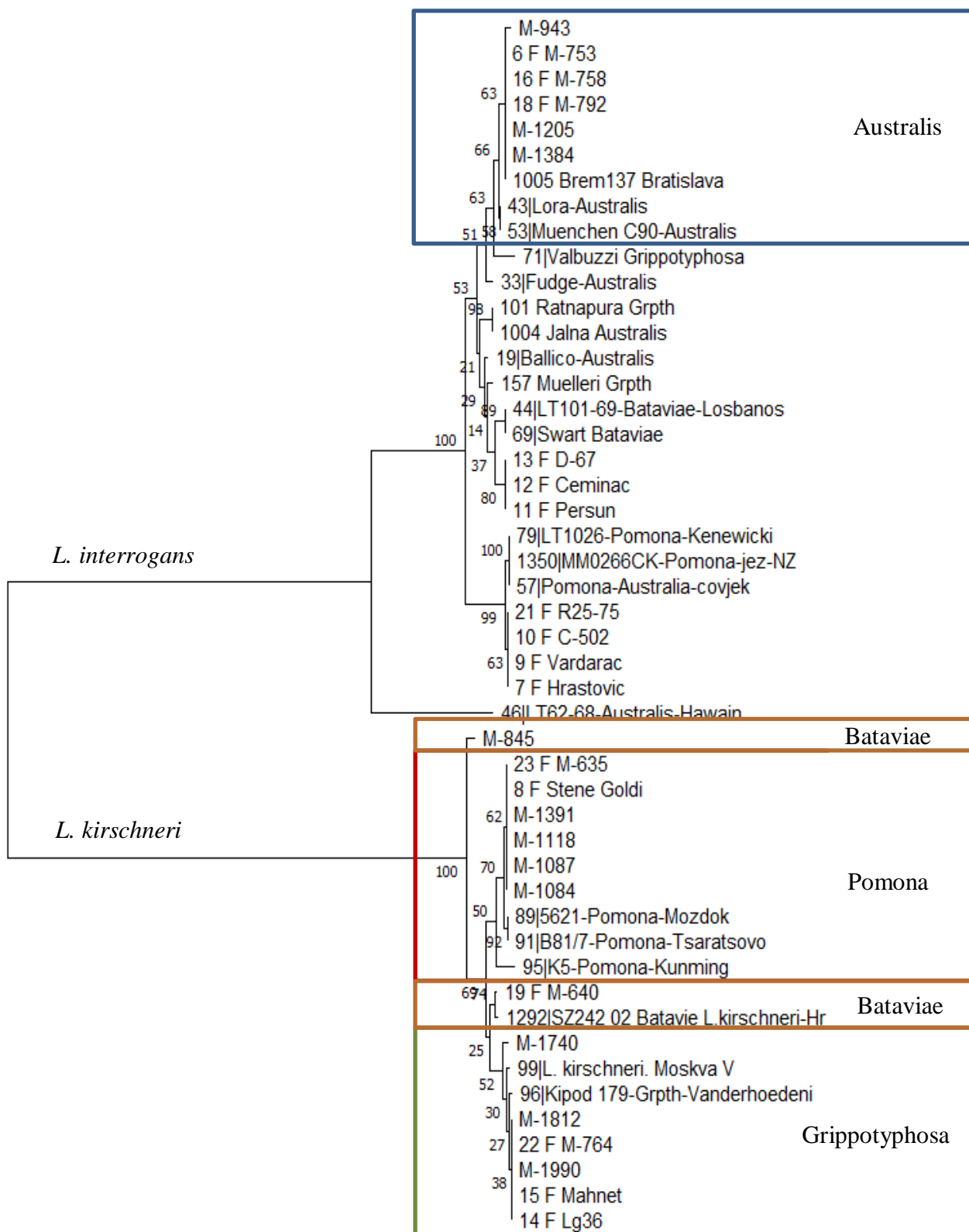
**A****B****Slika 18.**

- A.** Serološke skupine ustanovljene unutar genomske skupine *L. kirschneri* u izolata izdvojenih iz mišolikih glodavaca na području Republike Hrvatske (n=33).
- B.** Serološke skupine ustanovljene unutar genomske skupine *L. interrogans* u izolata izdvojenih iz mišolikih glodavaca na području Republike Hrvatske (n=33).

#### **4.4. TIPIZIRANJE NA OSNOVI MULTILOKUSNIH SEKVENCI (MLST)**

Za izvođenje MLST metode odabrano je 33,3% (11/33), tj. 11% (11/101) uzoraka za koje se smatra da su reprezentativan uzorak od trideset tri uzorka na kojima je vršena genotipizacija, odnosno od sto jednog uzorka na kojim je urađena serološka pretraga. Uzorci su odabrani po genomskoj vrsti, serovaru, vrsti životinje iz koje su izdvojeni i lokaciji pronalaska domaćina.

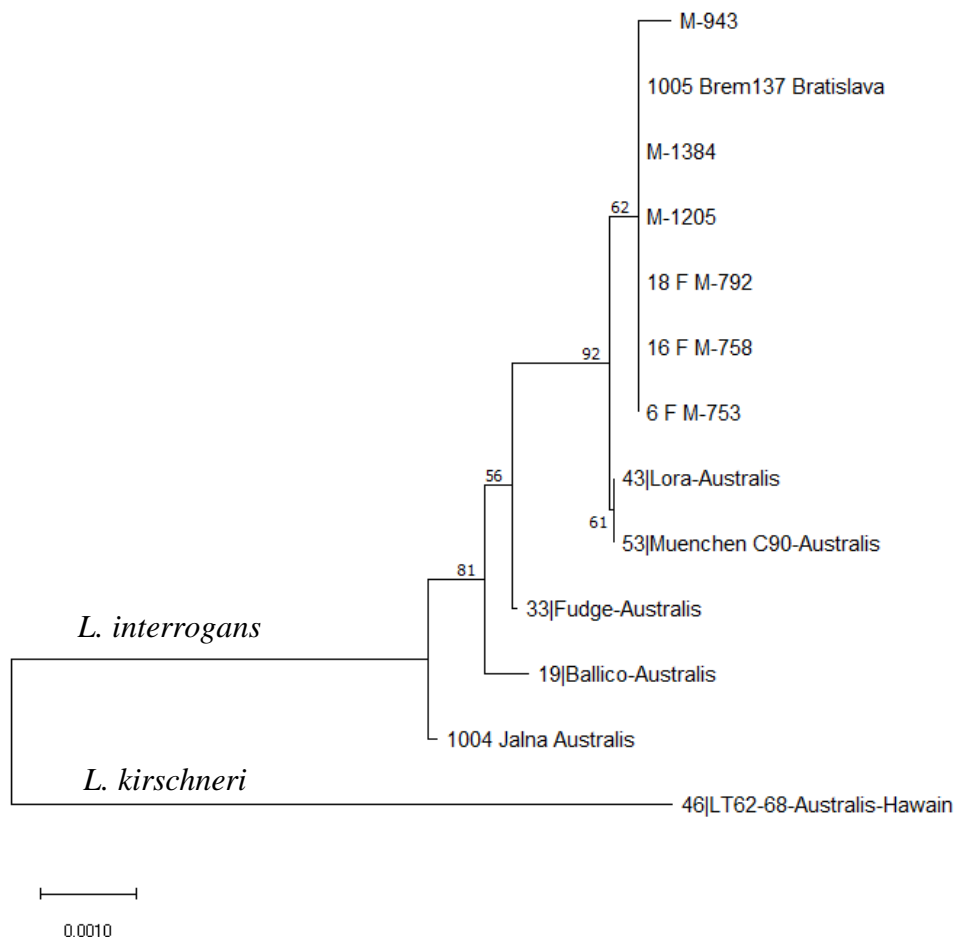
U svrhu tipiziranja odabranih izolata umnoženo i sekvencirano je šest polimorfnihs odsječaka koji su zatim spojeni u jednu mega sekvencu veličine 2855bp. Filogenijskom analizom tih mega-sekvenci, već determiniranih lokalnih izolata i odgovarajućih mega lokusa dostupnih na internetskoj bazi (*Leptospira* spp. MLST database) utvrdili smo da su svi istraživani izolati ispravno genotipizirani odnosno svrstani unutar klastera koji prikazuju genomske vrste *L. interrogans*, *L. kirschneri* (Slika 19).



**Slika 19.** Filogenijsko stablo prema analizi pretraženih izolata, prethodno tipiziranih lokalnih sojeva i referentnih sojeva, dobiveno pomoću Neighbour joining algoritma i „Tamura-Nei“ modela uz „Gamma“ distribuciju i 1000 „Bootstrap“ poduzorkovanja. S naknadno označenim pripadnostima istraživanih izolata određenim serološkim skupinama.

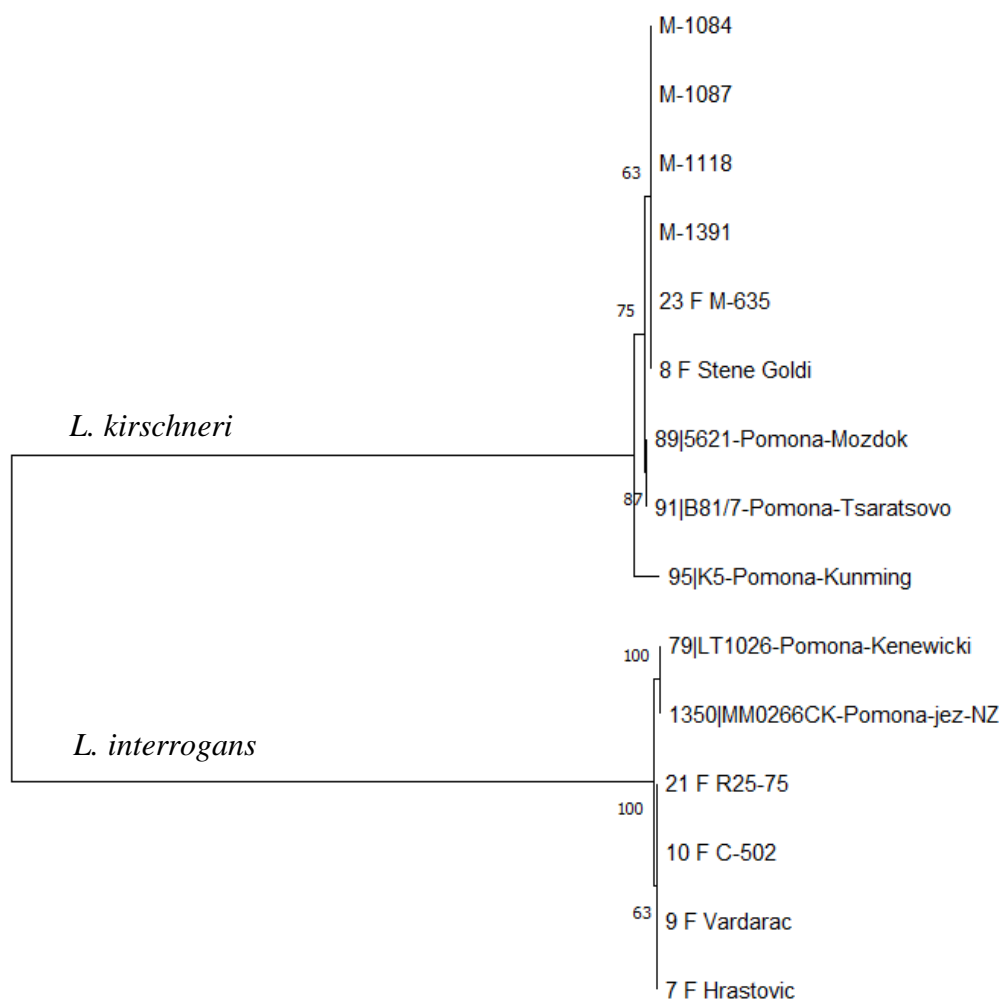
Utvrđen je i visok stupanj podudaranja obzirom na pripadnost određenoj serološkoj skupini odnosno serovaru koja je puno bolje vidljiva kad se filogenijska analiza radi samo za određenu serološku skupinu.

Slika 20. prikazuje filogenijsko stablo izolata svrstanih u serološku skupinu Australis sa prethodno tipiziranim lokalnim sojevima i svim sekvencama odgovarajuće serološke skupine i genomske vrste dostupnim u MLST internetskoj bazi. Analizom dobivenih podataka vidi se grupiranje naših Hrvatskih izolata (iz ovog i prethodnih istraživanja) na istu granu na kojoj se nalazi i soj Brem 137 koji se determiniran kao serovar Bratislava, serološka skupina Australis.



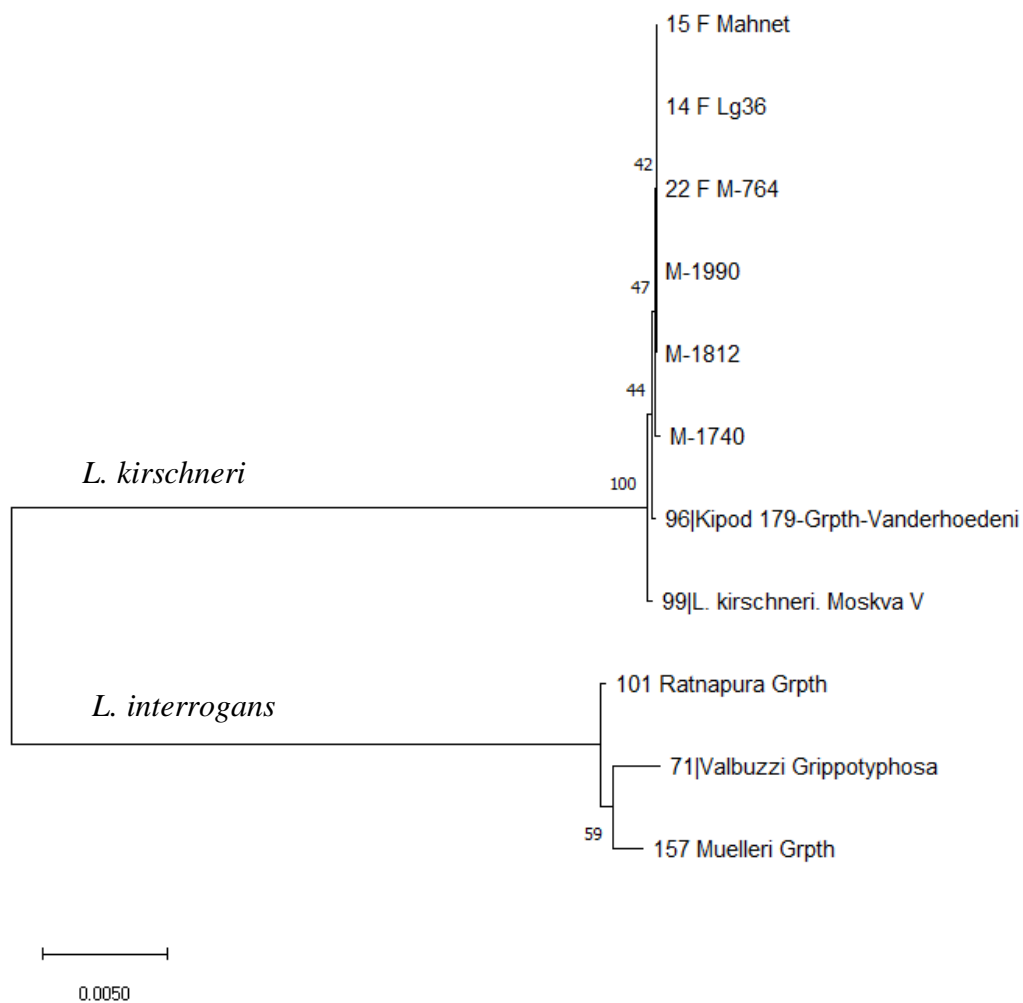
**Slika 20.** Filogenijsko stablo prema analizi pretraženih izolata, prethodno tipiziranih lokalnih sojeva i referentnih sojeva koji pripadaju serološkoj skupini Australis. Dobiveno pomoću Neighbour joining algoritma i Tamura 3 parametra uz „Gamma“ distribuciju s 1000 „Bootstrap“ poduzorkovanja. Skala na dnu slike označava evolucijsku udaljenost.

Slika 21. prikazuje filogenijsko stablo izolata svrstanih u serološku skupinu Pomona sa prethodno tipiziranim lokalnim sojevima i svim sekvencama serološke skupine Pomona dostupnim u MLST internetskoj bazi. Analizom dobivenih podataka razvidno je da sojevi serološke skupine Pomona pripadaju dvjema genomskim vrstama; *L. kirschneri* i *L. interrogans*. Izolati iz prijašnjih istraživanja koji su izdvojeni iz ljudi i domaćih životinja, te su već prethodno tipizirani kao serovar Pomona, grupirani su na klasteru s ostalim izolatima svrstanim u genomsku vrstu *L. interrogans*. Izolati iz mišolikih glodavaca grupiraju se pak na klasteru koji predstavlja genomsku vrstu *L. kirschneri* te su identični izolatu izdvojenom iz psa (RH) te izolatima iz MLST baze tipiziranim kao serovar Mozdok i Tsaratsovo.



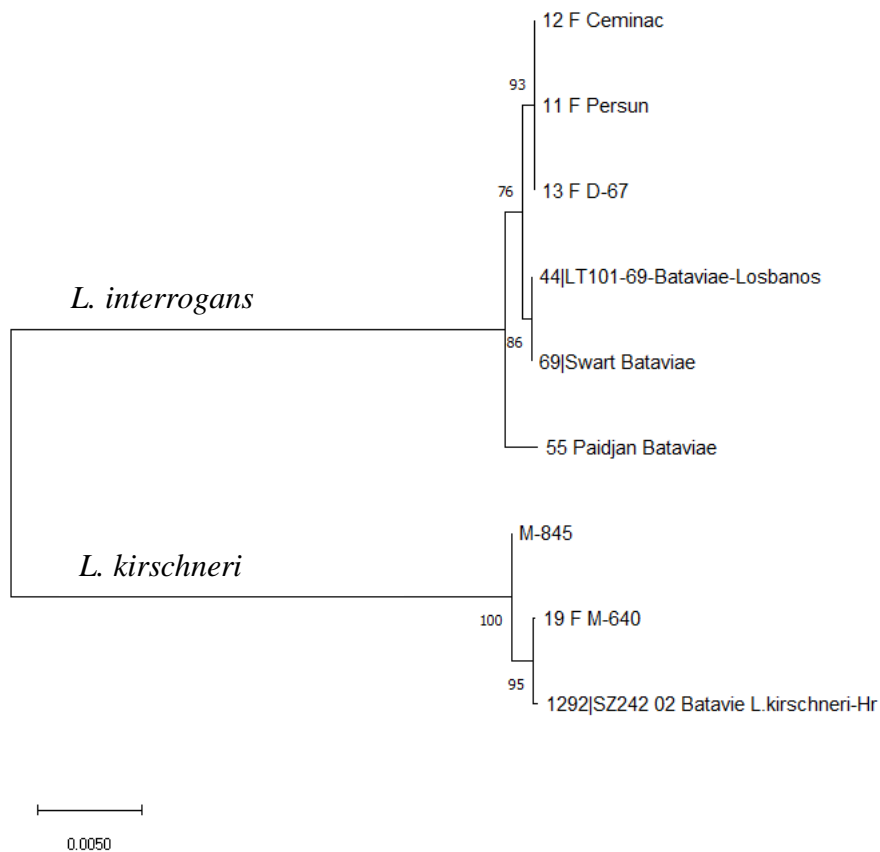
**Slika 21.** Filogenijsko stablo prema analizi pretraženih izolata, prethodno tipiziranih lokalnih sojeva i referentnih sojeva koji pripadaju serološkoj skupini Pomona. Dobiveno pomoću Neighbour joining algoritma i Tamura 3 parametra uz „Gamma“ distribuciju s 1000 „Bootstrap“ poduzorkovanja.

Slika 22. prikazuje filogenijsko stablo pretraženih izolata koji su svrstani u serološku skupinu Grippotyphosa sa prethodno tipiziranim lokalnim sojevima i svim sekvencama odgovarajuće serološke skupine i genomske vrste dostupnim u MLST internetskoj bazi. Analizom dobivenih podataka razvidno je da sojevi serološke skupine Grippotyphosa pripadaju dvjema genomskim vrstama; *L. kirschneri* i *L. interrogans*, no svi hrvatski izolati iz glodavaca, zečeva i ljudi (iz ovog i proteklih istraživanja) grupiraju se na istoj grani, a najbliži su serovarima Grippotyphosa i Vanderhoedeni genomske vrste *L. kirschneri*.



**Slika 22.** Filogenijsko stablo prema analizi pretraženih izolata, prethodno tipiziranih lokalnih sojeva i referentnih sojeva koji pripadaju serološkoj skupini Grippotyphosa. Dobiveno pomoću Neighbour joining algoritma i Tamura 3 parametra uz „Gamma“ distribuciju s 1000 „Bootstrap“ poduzorkovanja. Skala na dnu slike označava evolucijsku udaljenost.

Slika 23. prikazuje filogenijsko stablo izolata svrstanog u serološku skupinu Bataviae sa prethodno tipiziranim lokalnim sojevima i svim sekvencama odgovarajuće serološke skupine i genomske vrste dostupnim u MLST internetskoj bazi. Analizom dobivenih podataka razvidno je da postoji izrazita razlika između sojeva izdvojenih u Republici Hrvatskoj (koji uključuju dva izolata iz mišolikih glodavaca i jedan ljudskog izvora) u odnosu na sve ostale sojeve dostupne u internetskoj bazi.



**Slika 23.** Filogenijsko stablo prema analizi pretraženih izolata, prethodno tipiziranih lokalnih sojeva i referentnih sojeva koji pripadaju serološkoj skupini Bataviae. Dobiveno pomoću Neighbour joining algoritma i Tamura 3 parametra uz „Gamma“ distribuciju s 1000 „Bootstrap“ poduzorkovanja. Skala na dnu slike označava evolucijsku udaljenost.

## **5. RASPRAVA**



Ovo istraživanje obuhvaća sve dostupne izolate (n=101) pohranjene u arhivi izolata patogenih leptospira Laboratorija za leptospire, Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Analizom podataka o odabranim izolatima saznaje se da su odabrani izolati izdvojeni u periodu od trinaest godina (21.10.2005. - 14.6.2018.) sa čak sedamnaest različitih lokaliteta i iz pet različitih vrsta mišolikih glodavaca ulovljenih na području kontinentalnog dijela Republike Hrvatske (*A. agrarius*, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *M. glareolus* i *M. arvalis*). Svi lokaliteti sa kojih potječu izdvojeni izolati nalaze se u blizini plavnih rijeka (Save i Drave) i već su tijekom prošlih istraživanja istaknuti kao poznata arhaična prirodna žarišta unutar kojih se glavnim izvorom infekcije leptospirama smatraju mišoliki glodavci (ČORDAŠ, 2019.; HABUŠ, 2013.; ŠTRITOF MAJETIĆ, 2010.; TURK i sur., 2009.; ZAHARIJA i sur., 1982.).

Skupna analiza podataka dobivenih serološkom determinacijom izolata pokazuje da najviše izolata pripada serološkoj skupini Pomona (65,3%). Budući da su ovi izolati uglavnom izdvojeni iz prugastog poljskog miša (*A. agrarius*), navedeno upućuje na činjenicu da je ova serološka skupina iznimno prisutna i proširena u ove vrste mišolikih glodavaca, odnosno da *A. agrarius* predstavlja važan rezervoar serovara iz serološke skupine Pomona. Vrlo slične rezultate dobili su i drugi autori tijekom nekih prethodnih istraživanja (MILAS i sur., 2002.; TREML i sur., 2002.). Utvrđene rezultate također je moguće povezati sa povećanom incidencijom leptospiroze primarno u pasa i konja uzrokovanih ovom serološkom skupinom (HABUŠ, 2017.; ŠTRITOF, 2012.).

Rezultati serološke determinacije sojeva izdvojenih iz *A. sylvaticus* i *A. flavicollis*, ukazuju pak na njihovu ulogu u održavanju serovara iz serološke skupine Australis. Navedeni rezultati se u potpunosti slažu sa rezultatima prethodnih istraživanja u kojim je utvrđeno da su ove vrste najčešće inficirane genomskom vrstom *L. interrogans* i serološkom skupinom Australis, serovarom Bratislava (HABUŠ i sur., 2008.; MILAS i sur., 2013.). Odnosno, sa rezultatima radova (MILAS i sur., 2002.; ŠTRITOF MAJETIĆ, 2010.; TURK i sur., 2003.) koji su utvrdili da je žutogrli miš najčešće inficiran serovarom Lora. Smatra se da su navedeni rezultati komplementarni visokoj prevalenciji serovara Australis u lisica i divljih svinja (HABUŠ i sur., 2008.; MILAS i sur., 2013.).

S obzirom na mali broj izolata dobiven od šumskih i poljskih voluharica (*C. glareolus* i *M. arvalis*), teško je utvrditi kakvu ulogu imaju ove vrste u održavanju seroloških skupina Pomona, odnosno Grippotyphosa.

Iz dosad objavljenih publikacija, može se zaključiti da u Hrvatskoj postoji povezanost poljske voluharice i serovara *Grippytyphosa* (HABUŠ i sur., 2008.; TREML i sur., 2002.; TURK i sur., 2008.). Mali broj izolata iz arhive možda se može objasniti činjenicom da je većina izlova mišolikih glodavaca vršena u šumama, a obična voluharica uglavnom živi na poljima i livadama (pašnjacima). Već opisana povećana incidencija serovara *Grippytyphosa* u svih pašnih životinja tijekom godina s puno kiše, odnosno kad su pogodni uvjeti za preživljavanje leptospira, dodatno potvrđuje moguću povezanost. Ipak, ulogu poljskih voluharica u održavanju serovara *Grippytyphosa* treba još svakako dodatno istražiti (HABUŠ i sur., 2017.). S druge strane, šumska voluharica živi u šumskim područjima, te je tijekom proteklih istraživanja relativno često lovljena i pretraživana. Stoga bi mali broj dobivenih izolata mogao upućivati na činjenicu da ova vrsta glodavaca nema važnu ulogu u održavanju *Leptospira*, već da se zapravo radi o slučajnim infekcijama. Zanimljivo bi bilo istražiti da li ova vrsta glodavaca nakon infekcije ipak ostaje doživotno inficirana ili se pak radi o vremenski ograničenom kliconoštvu.

Skupna analiza podataka dobivenih serološkom i molekularnom determinacijom 33 odabrana izolata upućuju na zaključak da svi izolati determinirani kao *L. interrogans* zapravo pripadaju serološkoj skupini Australis, dok unutar izolata determiniranih kao *L. kirschneri* nalazimo pripadnike različitih seroloških skupina (Pomona, *Grippytyphosa* i *Bataviae*). Kad razmatramo povezanost određenih genomskih vrsta leptospira sa vrstama glodavaca, pojedini autori smatraju da su u Europi miševi iz roda *Apodemus* rezervoari serovara koji pripadaju u genomsku vrstu *L. kirschneri* (FAINE i sur., 1999.). U ovom istraživanju, izolati koji su izdvojeni iz *A. flavicollis* i *A. sylvaticus*, češće su pripadali genomskoj vrsti *L. interrogans*. Navedeni rezultat je u skladu sa istraživanjem (MAYER-SCHOLL i sur., 2014.) i u potpunosti se slaže sa spoznajama prijašnjih studija provedenih u Republici Hrvatskoj (ŠTRITOF MAJETIĆ, 2010.; TURK i sur., 2003.). Ipak, kada tome pridodamo serološku determinaciju uočavamo određene razlike. Tako TURK i sur., 2003. determiniraju izolate serološke skupine Australis kao serovar Lora, a ŠTRITOF MAJETIĆ 2010. i HABUŠ 2013. kao serovar Bratislava. Navedene razlike vjerojatno su posljedica različitih molekularnih metoda koje su autori upotrebljavali u procesu determinacije, a od kojih svaka ima određene prednosti i nedostatke. Rezultati ovog istraživanja, gdje je korištena metoda tipiziranja na osnovu multilokusnih sekvenci (MLST), idu u prilog istraživanjima ŠTRITOF MAJETIĆ 2010. i HABUŠ 2013. jer se izolati iz serološke skupine Australis tijekom filogenijske analize dobivenih mega-sekvenci svrstavaju na istu granu sa serovarom Bratislava.

Tijekom ovog istraživanja, uporabom navedene MLST metode, utvrđen je visok stupanj razlučivosti s obzirom na pripadnost određenoj serološkoj skupini odnosno serovaru, osobito kad su se tijekom analize koristili i prethodno serološki tipizirani lokalni izolati. Primjerice, filogenijska analiza MLST sekvenci u prijašnjem istraživanju pokazuje da izolati izdvojeni iz svinja i ljudi u Republici Hrvatskoj pripadaju genomskoj vrsti *L. interrogans*, serovaru Pomona dok izolati iz mišolikih glodavaca i pasa pripadaju genomskoj vrsti *L. kirschneri*, serovaru Mozdok (HABUŠ, 2013.). Svi Pomona izolati izdvojeni iz mišolikih glodavaca koji su tipizirani u ovom istraživanju potpuno su identični onima tipiziranim 2013. (HABUŠ, 2013) i svrstavaju na istu granu. Ovi rezultati možda mogu olakšati i utvrđivanje izvora infekcije u slučajnih domaćina. Sudeći po dosadašnjim rezultatima možemo zaključiti da se ljudi izgleda češće inficiraju kontaktom sa svinjama, što je logično obzirom na bliski kontakt dvaju vrsta. Ipak, treba biti svjestan da i glodavci predstavljaju opasnost za širenje zaraze, budući da je jedan od izolata koji je tipiziran kao serovar Mozdok izdvojen iz psa sa kliničkom slikom leptospiroze (Štene Goldi), što navodi na zaključak da se pas zarazio u kontaktu s poljskim mišem. Buduća istraživanja izolata iz klinički oboljelih pasa omogućiti će nam detaljniji uvid u moguće izvore infekcije i možda objasniti zamijećenu povećanu incidenciju leptospiroze u pasa uzrokovane upravo serološkom skupinom Pomona (HABUŠ, 2017.; ŠTRITOF, 2012.).

Osobito je zanimljiva bila analiza filogenijskog stabla izolata M-845 koji je tijekom ovog istraživanja svrstan u serološku skupinu Bataviae, genomsku vrstu *L. kirschneri*. Naime, svi lokalni izolati serološke skupine Bataviae izdvojeni iz domaćih životinja i ljudi, determiniranih tijekom proteklih istraživanja, svrstavaju se na istu granu sa ostalim izolatima i referentnim sojem serovara Bataviae, unutar klastera genomске vrste *L. interrogans*. Sasvim zaseban klaster unutar vrste *L. kirschneri* čine M-845, još jedan mišji izolat iz Hrvatske (HABUŠ, 2013.) i jedan izolat iz čovjeka (pacijent iz Hrvatske) koji je jedini takav izolat dostupan u MLST internetskoj bazi. Navedeni rezultat upućuje na činjenicu da na našem području kruže patogeni serovari iz serološke skupine Bataviae koji se ne podudaraju niti sa jednim poznatim serovarom iz serološke skupine Bataviae. Ipak izolat (M-845) ne pokazuje potpunu gensku srodnost s ostala dva izolata unutar genomске vrste *L. kirschneri*, što je potrebno potvrditi budućim istraživanjima.

## **6. ZAKLJUČCI**

1. Serološkom determinacijom utvrđeno je da 65,3% izolata pripada serološkoj skupini Pomona, 28% serološkoj skupini Australis, 6% serološkoj skupini Grippytyphosa, a 1% serološkoj skupini Bataviae.
2. Filogenijska analiza odsječaka *secY* gena pokazuje da 66,6% uzoraka pripada genomskoj vrsti *L. kirschneri*, dok 33,3% uzoraka pripada genomskoj vrsti *L. interrogans*.
3. Svi izolati genomske vrste *L. interrogans*, pripadaju serološkoj skupini Australis, dok izolati unutar genomske vrste *L. kirschneri* pripadaju različitim serološkim skupinama (Pomona, Grippytyphosa, Bataviae).
4. Upotrebljena metoda tipiziranja multilokusnim sekvencama (MLST) rezultira ispravnim tipiziranjem svih izolata sukladno genomskoj vrsti i daje dobru serološku razlučivost, pogotovo ako se uzorci uspoređuju sa lokalnim izolatima.
5. Analizom dobivenih rezultata utvrđeno je da prugasti poljski miš (*A. agrarius*) predstavlja važan izvor infekcije za serovar Mozdok, dok su žutogrli i obični šumski miš česti nosioci serovara Bratislava. Iako je pretražen mali broj uzoraka porijeklom od livadne voluharice postoje naznake da ova vrsta možda ima određenu ulogu u održavanju serovara Grippytyphosa.
6. Analizom dostupnih mega-sekvenci lokalnih sojeva izdvojenih iz ljudi, domaćih životinja i glodavaca koji pripadaju u serološku skupinu Pomona može se zaključiti da se ljudi u Hrvatskoj češće zaraze kontaktom sa inficiranim svinjama (serovar Pomona). No, ostaje za istražiti koliku ulogu ima prugasti poljski miš kao izvor infekcije za pse (serovar Mozdok).
7. Postoji izrazita razlika između izolata M-845 svrstanog u serološku skupinu Bataviae, genomsku vrstu *L. kirschneri* u odnosu na sve druge poznate sojeve serološke skupine Bataviae. U dostupnoj u internetskoj MLST bazi postoje još samo dva ovakva izolata (jedan iz miša i jedan iz čovjeka), oba izdvojena na području Republike Hrvatske.

## **7. LITERATURA**

1. ADLER B. i A. DE LA PEÑA MOCTEZUMA (2010): *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 140, 287–296.
2. ADLER, B. (2014): *Current Topics in Microbiology and Immunology: Leptospira and Leptospirosis.* Springer. 198-238.
3. AHMED, N., S. MANJULATA DEVI, M. VALVERDE, P. VIJAYACHARI, R. S. MACHANG'U, W. A. ELLIS, R. A. HARTSKEERL (2004): Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 5, 1-10.
4. ANTUNOVIĆ-MIKAČIĆ, S. (1935): O prvom slučaju Weilove bolesti na našem Primorju. (The first case of Weil's disease on our coastal region). *Lij. vjes.* 57, 377.
5. BABIĆ, I. (1927): Typhus canum u Zagrebu (Typhus canum in Zagreb). *Jug. vet. glas.* 7, 21.
6. BABUDIERY, B. (1961): Laboratory Diagnosis of Leptospirosis. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 24, 45.
7. BALEN TOPIĆ, M., J. HABUŠ, Z. MILAS, E. ČELJUSKA 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.
8. BARANTON G., D. POSTIC (2006): Trend in leptospirosis epidemiology in France. Sixty-six years of passive serological surveillance from 1920 to 2003. *Int. J. Infect. Dis.* 10, 162-170.
9. BAROCCHI M. A., A. I. KO, M. G. REIS, K. L. MCDONALD, L. W. RILEY (2002): Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. *Infect Immun.* 70, 6926–6932.
10. BHARADWAJ R., A. M. BAL, S. A. JOSHI, A. KAGAL, S. S. POL, G. GARAD, V. ARJUNWADKAR, R. KATTI (2002): An urban outbreak of leptospirosis in Mumbai, India. *Jpn. J. Infect. Dis.* 55, 194-196.

11. 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.
  
12. 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 leptospire in snakes. *Pesq. Vet. Bras.* 31, 806-811.
  
13. BJEDOV, L. (2015): Odnosi populacija sitnih glodavaca kao rezervoara prirodno-žarišnih zoonoza u šumskim ekosustavima obične bukve (*Fagus sylvatica* L.) u Republici Hrvatskoj / doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu: Šumarski fakultet.
  
14. BROWN, P. D., C. GRAVEKAMP, D. G. CARRINGTON, H. VAN DE KEMP, R. A. HARTSKEERL, C. N. EDWARDS, C. O. EVERARD, W. J. TERPSTRA, P. N. LEVETT (1995): Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J. Med. Microbiol.* 43, 110–114.
  
15. BRUDNJAK, Z., P. ZELENKA, M. ŠIBALIN (1956): Prilog poznavanju leptospiroze u konja. *Vet. arhiv* 26, 165.
  
16. BULACH, D. M., R. L. ZUERNER, P. WILSON, T. SEEMANN, A. MCGRATH, P. A. CULLEN, J. DAVIS, M. JOHNSON, E. KUCZEK, D. P. ALT, B. PETERSONBURCH, R. L. COPPEL, J. I. ROOD, J. K. DAVIES, B. ADLER (2006): Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 14560–14565.
  
17. CERQUEIRA, G. M., M. PICARDEAU (2009): A century of *Leptospira* strain typing. *Infect. Genet. Evol.* 9, 760-768.
  
18. CERQUEIRA G. M., A. J. A. MCBRIDE, M. PICARDEAU, S. G. RIBEIRO, V. MOREL, M. G. REIS, A. I. KO, O. A. DELLAGOSTIN (2009): Distribution of the Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. and application of ligB to typing leptospiral isolates. *J. Med. Microbiol.* 9, 1173-1181.



19. 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.
  
20. CICERONI, L., S. CIARROCCHI, A. CIERVO, A. PETRUCCA, A. PINTO, A. CALDERARO, I. VIANI, L. GALATI, G. DETTORI, C. CHEZZI (2002): Differentiation of leptospires of the serogroup Pomona by monoclonal antibodies, pulsed-field gel electrophoresis and arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Res. Microbiol.* 153, 37-44.
  
21. CULLEN, P. A., S. J. CORDWELL, D. M. BULACH, D. A. HAAKE, B. ADLER (2002): Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Infect. Immun.* 70, 2311-2318.
  
22. ČORDAŠ, R. (2019.): Prevalencija bakterija iz roda *Leptospira* u populaciji mišolikih glodavaca / diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu: Veterinarski fakultet.
  
23. DECHET, A. M., M. PARSONS, M. RAMBARAN, P. MOHAMED-RAMBARAN, A. FLORENDO-CUMBERMACK, S. PERSAUD, S. BABOOLAL, M. D. ARI, S. V. SHADOMY, S. R. ZAKI, C.D. PADDOCK, T. A. CLARK, L. HARRIS, D. LYON, E. D. MINTZ (2012): Leptospirosis Outbreak following Severe Flooding: A Rapid Assessment and Mass Prophylaxis Campaign; Guyana, January–February 2005. *PLoS ONE* 7, e39672
  
24. DIAMENT, D., M. K. C. BRUNIALTI, E. C. ROMERO, E. G. KALLAS, R. SALOMAO (2002): Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycolipoprotein. *Infect. Immun.* 70, 1677–1683.
  
25. DIKKEN, H., E. KMETY (1978): Serological typing methods of leptospires. In: *Methods in Microbiology*. New York: Academic Press, 259-307. (Bergan T. and Norris J.R eds. Vol. 11).
  
26. 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.

27. FAINE, S., B. ADLER, C. BOLIN, P. PÉROLAT (1999): *Leptospira* and Leptospirosis, Second Edition, MediSci, Melbourne, Australia.
28. FAISAL S. M., S. P. MCDONOUGH, Y. CHANG (2012) *Leptospira*: Invasion, pathogenesis and persistence. Springer US. 143-172.
29. GALLOWAY, R., P. N. LEVETT (2008): Evaluation of a Modified Pulsed-Field Gel Electrophoresis Approach for the Identification of *Leptospira* Serovars. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 78, 628-632.
30. GOLDSTEIN, R. E. (2010): Canine leptospirosis. *Vet. Clin. Small. Anim.* 40, 1091-1101.
31. GREENE, C. E. (2012): *Leptospirosis*. U: *Infectious diseases of the dog and cat*, fourth edition; Elsevier Saunders, Missouri; 431-447.
32. HABUŠ, J., Ž. CVETNIĆ, Z. MILAS, Z. ŠTRITOF, M. BALEN-TOPIĆ, J. MARGALETIĆ, N. TURK (2008): Seroepidemiološko i seroepizootiološko istraživanje leptospiroze u Hrvatskoj tijekom 2007. *Infekt. glas.* 28, 183-188.
33. HABUŠ, J. (2013): *Genska sljedivost patogenih bakterija roda leptospira u prirodnom žarištu leptospiroze / doktorska disertacija*. Zagreb: Veterinarski fakultet, 2013.
34. HABUŠ, J., Z. PERSIC, S. SPICIC, S. VINCE, Z. STRITOF, Z. MILAS, Z. CVETNIC, M. PERHARIC, N. TURK (2017): New trends in human and animal leptospirosis in Croatia, 2009–2014. *Acta Tropica.* 168, 1-8.
35. 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, 2276-2285.
36. HARTSKEERL, R. A., H. L. SMITS, H. KORVER, M. G. A. GORIS, W. J. TERPSTRA (2006): *Manual international course on laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis*. KIT, Amsterdam, Nizozemska.

37. HELMERHORST, H. J. F., E. N. VAN TOL, P. R. TUINMAN, P. J. DE VRIES, R. A. HARTSKEERL, M. P. GROBUSCH, J. W. HOVIUS (2012): Severe pulmonary manifestation of leptospirosis. *Neth. J. Med.* 5, 215-221.
38. HENNEBERRY, R. C., C. D. COX (1970): Beta-oxidation of fatty acids by *Leptospira*. *Can. J. Microbiol.* 16, 41-45.
39. HERRMANN, J. L., C. BARIL, E. BELLENGER, P. PÉROLAT, G. BARANTON, I. SAINT GIRONS (1991): Genome conservation in isolates of *Leptospira interrogans*. *J. Bacteriol.* 173, 7582-7588.
40. JANSEN A., I. SCHÖNEBERG, C. FRANK, K. ALPERS, T. SCHNEIDER, K. STARK (2005): Leptospirosis in Germany 1962–2003. *Emerg Infect Dis.* 11: 1048–1054. pmid:16022779
41. JOHNSON, R. C., W. G. HARRIS (1967): Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire. Growth at low temperatures. *J. Bacteriol.* 94, 27-31.
42. KMETY, E., H. DIKKEN (1993): Classification of the Species *Leptospira interrogans* and History of its Serovars. University Press, Groningen, The Netherlands.
43. KO, A. I., M. G. REIS, C. M. R. DOURADO, JR. W. D. JOHNSON, L. W. RILEY (1999): Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet* 354, 820–825.
44. KO, A. I., C. GOARANT, M. PICARDEAU (2009): *Leptospira*: The Dawn of the Molecular Genetics Era for an Emerging Zoonotic Pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 736–747.
45. KORPIMAKI, E., C. J. KREBS (1996): Predation and population cycles of small mammals. *Bioscience* 46, 754-764.
46. LARAS, K., B. V. CAO, K. BOUNLU. T. K. T. NGUYEN, J. G. OLSON, S. THONGCHANH, N. VAN ANH TRAN, K. L. HOANG, N. PUNJABI, B. K. HA, S. A. UNG, S. INSISIENGMAY, D. M. WATTS, H. J. BEECHAM, A. L. CORWIN (2002): The importance of leptospirosis in Southeast Asia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67:, 78-86.

47. LEE, S. H., S. KIM, S. C. PARK, M. J. KIM (2002): Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. *Infect Immun.* 70, 315–322.
48. LEVETT, P. N. (2001): Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 296–326.
49. LEVETT, P. N. (2004): Leptospirosis: A forgotten zoonosis? *Clin. Appl. Immunol. Rev.* 4, 435-448.
50. MARGALETIĆ, J., M. BOŽIĆ, M. GRUBEŠIĆ, M. GLAVAŠ, W. BÄUMLER W. (2008): Distribution and abundance of small rodents in Croatian forests. *J. Pest Sci;* 78, 99- 103.
51. MARŠIĆ, K. (2017.): Leptospiroza u Hrvatskoj u razdoblju od 2010. do 2016. Godine / diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu: Šumarski fakultet.
52. MAYER-SCHOLL A., J. A. HAMMERL, S. SCHMIDT, R. G. ULRICH, M. PFEFFER, D. WOLL, H. C. SCHOLZ, A. THOMAS, K. N ÖCKLER (2014): *Leptospira* spp. in Rodents and Shrews in Germany. *Int J Environ Res Public Health.* 11: 7562–7574. pmid:25062275
53. MÉRIEN, F., G. BARANTON, P. PÉROLAT (1995): Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *J. Infect. Dis.* 172, 281-285.
54. MILAS, Z., N. TURK, V. STAREŠINA, J. MARGALETIĆ, A. SLAVICA, D. ŽIVKOVIĆ, Z. MODRIĆ (2002): The role of myomorphous mammals as reservoirs of leptospira in the pedunculate oak forests of Croatia. *Vet. arhiv* 72, 119-129.
55. MILAS, Z. (2012): Leptospiroza. U: Veterinarski priručnik, Medicinska naklada, Zagreb. 2516-2523 str.
56. MILAS Z., Z. ŠTRITOF MAJETIĆ, J. HABUŠ, V. MOJČEC PERKO, V. STAREŠINA, LJ. BARBIĆ, V. STEVANOVIĆ, M. PERHARIĆ, N. TURK, B. LJUBIĆ (2013): The occurrence and maintenance of *Leptospira* serovars Australis and Bratislava in domestic and wild animals in Croatia. *Veterinarski Arhiv.* 83:4, 357-369.
57. MODRIĆ, Z., N. TURK, B. ARTUKOVIĆ, K. MATANOVIĆ, V. STAREŠINA, G. BARANTON (2006): Leptospiroza u prasadi uzrokovana s *Leptospira interrogans* sensu stricto serovar icterohaemorrhagiae. *Hrv. vet. vjes.* 29, 223-230.

58. MORI, M., P. BOURHY, M. L. GUYADER, M. VAN ESBROECK, Z. DJELOUADJI, A. SEPTFONS, A. KODJO, M. PICARDEAU (2017): Pet rodents as possible risk for leptospirosis, Belgium and France, 2009 to 2016. *Eurosurveillance*. 22:43.
  
59. NAIMAN, B. M., S. BLUMERMAN, D. ALT, C. A. BOLIN, R. BROWN, R. ZUERNER, C. L. BALDWIN (2002): Evaluation of type 1 immune response in naive and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1(+) gammadelta and CD4 T cells. *Infect. Immun.* 70, 6147–6157.
  
60. NALAM, K., A. AHMED, S. MUNJALTA DEVI, P. FRANCALACCI, M. BAIG, L. A. SECHI, R. A. HARTSKEERL, N. AHMED (2010): Genetic Affinities within a Large Global Collection of Pathogenic *Leptospira*: Implication for Strain identification and Molecular Epidemiology. *PLoS ONE* 5, e12637.
  
61. NIEDERMAIER, G., B. WOLLANKE, R. HOFFMANN, S. BREM, H. GERHARDS (2006): Detection of leptospira in the vitreous body of horses without ocular diseases and of horses with equine recurrent uveitis (ERU) using transmission-electron microscopy. *Deut. Tierarztl. Woch.* 113, 418-422.
  
62. OBIEGALA A., D. Woll, C. Karnath, C. SILAGHI, S. SCHEX, S. EßBAUER, M. PFEFFER (2016.): Prevalence and Genotype Allocation of Pathogenic *Leptospira* Species in Small Mammals from Various Habitat Types in Germany. *PLoS Negl Trop Dis.* 10:3.
  
63. PAPPAS, G., P. PAPADIMITRIOU, V. SIOZOPOULOU, L. CHRISTOU, N. AKRITIDIS (2008): The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int. J. Infect. Dis.* 12, 351-357.
  
64. PICARDEAU, M., D. M. BULACH, C. BOUCHIER, R. L. ZUERNER, N. ZIDANE, P. J. WILSON, S. CRENO, E. S. KUCZEK, S. BOMMEZZADRI, J. C. DAVIS, A. MCGRATH, M. J. JOHNSON, C. BOURSAUX-EUDE, T. SEEMANN, Z. ROUY, R. L. COPPEL, J. I. ROOD, A. LAJUS, J. K. DAVIES, C. MÉDIGUE, B. ADLER (2008): Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis, *PLoS ONE* 3, e1607.

65. PICARDEAU, M. (2017): Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 297-307.
66. POSTIC, D., N. RIQUELME-SERTOURE, F. MÉRIEN, P. PÉROLAT, G. BARANTON (2000): Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogenities between *Leptospira* collections: application to *L. meyeri*. *Res. Microbiol.*, 151, 333-341.
67. REIS R. B., G. S. RIBEIRO, R. D. FELZEMBURGH, F. S. SANTANA, S. MOHR, A.X.T.O. MELENDEZ, A. QUEIROZ, 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: e228. pmid:18431445
68. REN S. X., G. FU, X. G. JIANG, R. ZENG, Y. G. MIAO, H. XU, Y. X. ZHANG, H. XIONG, G. LU, L. F. LU, H. Q. JIANG , J. JIA, Y. F. TU, J. X. JIANG, W. Y. GU, Y. Q. ZHANG, Z. CAI, H. H. SHENG, H. F. YIN, Y. ZHANG, G. F. ZHU, M.WAN, H. L. HUANG, Z. QIAN, S. Y. WANG, W. MA, Z. J. YAO, Y. SHEN, B. Q. QIANG, Q .C. XIA, X. K. GUO, A. DANCHIN, I. SAINT GIRONS, R. L. SOMERVILLE, Y. M. WEN, M. H. SHI, Z. CHEN, J. G. XU , G. P. ZHAO (2003): Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 422, 888–893.
69. RISTOW, P., P. BOURHY, S. KERNEIS, C. SCHMITT, M. C. PREVOST, W. LILENBAUM, M. PICARDEAU (2008): Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiol.*154:5, 1309-1317.
70. 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;
71. SCHREIER, S., G. DOUNGCHAWEE, S. CHADSUTHI, D. TRIAMPO, W. TRIAMPO (2013): Leptospirosis: current situation and trends of specific laboratory tests. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 9, 263-280.
72. SMITS, H. L., Y. V. ANANYINA, A. CHERESHKY, L. DANCEL, R. F. M. LAI-A-FAT, H. D. CHEE, P. N. LEVETT (1999): International Multicenter Evaluation of the Clinical Utility of a Dipstick Assay for Detection of *Leptospira*-Specific Immunoglobulin M Antibodies in Human Serum Specimens. *J. Clin. Microbiol* 37, 2904-2909.

73. SMITS, H. L., M. A. W. G. VAN DER HOORN, M. G. A. GORIS, G. C. GUSSENHOVEN, C. YERSIN, D. M. SASAKI, W. J. TERPSTRA, . R. A. HARTSKEERL (2000): Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1272-1275.
74. SONRIER C., C. BRANGER, V. MICHEL, N. RUVOEN-CLOUET, J. P. GANIERE, G. ANDRE-FONTAINE (2000): Evidence of crossprotection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. *Vaccine* 19, 86–94.
75. ŠTRITOF MAJETIĆ, Z. (2010): Molekularna epizootologija leptospiroze u mišolikih glodavaca / doktorska disertacija. Zagreb: Veterinarski fakultet, 17.12.2010., 129 str.
76. ŠTRITOF MAJETIĆ, Z., J. HABUŠ, Z. MILAS, V. MOJČEC PERKO, V. STAREŠINA, N. TURK (2012): A serological survey of canine leptospirosis in Croatia - the changing epizootiology of the disease. *Vet. arhiv* 82, 183-191.
77. TREML F., M. PEJČOCH, Z. HOLEŠOVSKÁ (2002): Small mammals - natural reservoir of pathogenic leptospires. *Veterinarni Medicina.* 10:11, 309-314.
78. TURK, N., Z. MILAS, J. MARGALETIĆ, V. STAREŠINA, A. SLAVICA, N. RIQUELMESERTOUR, E. BELLENGER, G. BARANTON, D. POSTIC (2003): Molecular characterisation of *Leptospira* spp. strains isolated from small rodents in Croatia. *Epidemiol. Infect.* 130, 159-166.
79. TURK N., Z. MILAS, J. HABUŠ, Z. ŠTRITOF, V. MOJČEC, Z. MODRIČ, V. STAREŠINA, D. POSTIC (2008): Identificiranje i tipiziranje *Leptospira* spp. primjenom metode raznolikosti dužine restrikcijskih fragmenata rDNK za gen 16S (RFLP) i gel elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE). *Infektoloski Glasnik.* 28:4, 173-182.
80. TURK, N., Z. MILAS, V. MOJČEC, E. RUŽIĆ-SABLJIĆ, V. STAREŠINA, Z. ŠTRITOF, J. HABUŠ, D. POSTIC (2009): Molecular analysis of *Leptospira* spp. isolated from humans by restriction fragment length polymorphism, real-time PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* 300, 174-179.
81. VASYLIEVA N., M. ANDREYCHYN, Y. KRAVCHUK, O. CHERVINSKA, I. IOSYK (2017): Changes in leptospirosis etiology in animals and humans. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine.* 24:4, 671-675.
82. VIJAYACHARI P., A. P. SUGUNAN, A. N. SHRIRAM (2008): Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci.* 33: 557–569. pmid:19208981

83. VARNI V., P. RUYBAL, J.J. LAUTHIER, N. TOMASINI, B. BRIHUEGA, A. KOVAL, K. CAIMI (2014): Reassessment of MLST schemes for *Leptospira* spp. typing worldwide. *Infection, Genetics and Evolution*. 22, 216-222.
84. WOLF, J. W. (1954): *The laboratory diagnosis of leptospirosis*. Charles C Thomas, Publisher, Springfield, SAD.
85. XUE, F., J. YAN, M., PICARDEAU (2009): Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes. *Microb. Infecti.* 11, 328-333.
86. ZAHARIJA, I., J. FALIŠEVAC, B. BORČIĆ, Z. MODRIĆ (1982): *Leptospiroze: 30-godišnje istraživanje i izučavanje u SR Hrvatskoj*. Zagreb: JUMENA.



## **8. SAŽETAK**

Leptospiroza je (re)emergentna zoonoza uzrokovana izrazito heterogenim bakterijama iz roda *Leptospira*. Rod *Leptospira* se na osnovu genotipskih i fenotipskih razlika može podijeliti na 22 genomske vrste i više od 320 saprofitskih, intermedijarnih i patogenih serovara. Svi patogeni serovari mogu zaraziti više vrsta domaćih i divljih životinja i čovjeka, no u pojedinom području kruže zahvaljujući određenoj životinjskoj vrsti koja predstavlja rezervoar tog serovara. Neka od prijašnjih istraživanja utvrdila su određene osobitosti leptospiroze kod ljudi u Republici Hrvatskoj, kao što su visoka prevalencija bolesti u ljudi i pojava vjerojatno infektivnih serovara čiji su rezervoari mišoliki glodavci. Navedeno čini Hrvatsku državom sa najviše slučajeva leptospiroze u ljudi u Europskoj Uniji, s obzirom na broj stanovnika, odnosno trinaestom u svijetu.

Slijedom navedenog, ciljevi ovog istraživanja bili su serološki i molekularno tipizirati sojeva leptospire izdvojenih iz mišolikih glodavaca izlovljenih na području prirodnih žarišta Republike Hrvatske, te utvrditi povezanosti određenih vrsta mišolikih glodavaca s pojedinim serovarima *Leptospira*.

Tijekom ovog istraživanja pretraženi su svi izolati (n=101) leptospira izdvojeni iz mišolikih glodavaca i pohranjeni u arhivu Laboratorija za leptospire, Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Mikroskopskom aglutinacijom pomoću 12 hiperimunih seruma proizvedenih na kunićima utvrđena je pripadnost nedeterminiranih izolata serološkim skupinama Pomona, Australis, Grippotyphosa i Bataviae. Zatim su odabrana 33 izolata koja su dalje tipizirana i molekularnim metodama: umnažanjem *secY* gena, sekvencioniranjem i filogenijskom analizom odsječaka, kako bi se utvrdila genomska vrsta. Za kraj je odabrano 11 izolata koji su predstavljali reprezentativan uzorak molekularno i serološki pretraženih izolata koji su determinirani upotrebom molekularne metode tipizacije na osnovu multilokusnih sekvenci (MLST).

Dobiveni rezultati pokazali su veliku genetsku srodnost pretraženih izolata unutar pojedinih genomskih vrsta i time potvrdili teoriju o postojanju arhaičnih prirodnih žarišta, a primjećena je i povezanost pojedinih serovara sa određenim vrstama mišolikih glodavaca.

**Ključne riječi:** *Leptospira*, mišoliki glodavci, prirodno žarište, serološka i molekularna determinacija, MLST

## **9. SUMMARY**

## **Serological and molecular typization of *Leptospira* spp. isolated from small rodents**

Leptospirosis is one of the most widespread (re)emergent zoonoses caused by a highly heterogeneous genus *Leptospira*. Based on genotypic and phenotypic differences, *Leptospira* can be divided into 22 genomospecies and more than 320 saprophytic, intermediate and pathogenic serovars. All pathogenic serovars can infect multiple species of domestic and wild animals as well as humans. However, every serovar has its own predilection host that is considered to be its main reservoir in that specific geographical area. Some of the previous studies of human leptospirosis in Croatia revealed some specificity, primarily concerning the high incidence and prevalence of presumptive infective serogroups carried by small rodents. This makes Croatia the country with the highest incidence of human leptospirosis cases in European Union, in terms of population and thirteen in the world.

The aim of this study was to type strains of *Leptospira* isolated from small rodents using a serological and molecular techniques and to determine the association of certain rodent species with a particular serovar of *Leptospira*.

In this study, all *Leptospira* strains isolated from small rodents (n=101) during the past years and stored in the archives of the Department of Microbiology and Infectious Diseases with Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb. Serologically undetermined isolates were tested using rabbit hyperimmune sera and assigned to serogroups Pomona, Australis, Grippytyphosa and Bataviae. Afterwards, representatives of serologically screened isolates (n=33) were selected for PCR based amplification of the *secY* gene, sequencing and phylogenetic analysis. In the end, multilocus sequence typing (MLST) method was employed in order to type and compare relationship of 11 selected strains.

Results obtained in this study showed increased genetic relatedness of the tested isolates within individual genomic species, thus confirming the theory of archaic natural foci. In addition, connection of particular serovars with a certain species of small rodents were also noted.

**Keywords:** *Leptospira*, small rodents, natural focus, serological group, genetic affinities, MLST

## **10. ŽIVOTOPIS**

Rođen sam 09.01.1995. u Mostaru, BiH, gdje završavam opći smjer Gimnazije fra Grge Martića. Nakon gimnazije upisujem Veterinarski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu koji pohađam kao jedan od 10% najuspješnijih studenata. Za vrijeme studija bio sam aktivan kao demonstrator na Zavodu za kemiju i biokemiju, Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju i Zavodu za stočarstvo, te kao član studentskih organizacija IVSA Croatia i eSTUDENT. Tijekom 2017. godine završavam ljetnu školu „Food Hygiene“ na Fakultetu veterinarske higijene i ekologije, Sveučilišta u Brnu, Češka Republika, u skladu sa regulativom (EC) No. 854/2004. Osim ljetne škole, tijekom studija sudjelujem na razmjenama studenata u Ljubljani, Slovenija; Beogradu, Srbija; Brnu, Češka republika; Wroclawu, Poljska; Cluj-Napoci, Rumunjska; također sudjelujem na CEEPUS ekskurziji u Beču, Austrija; te Erasmus + projektima u Tokatu, Turska; Panagyurishtu, Bugarska i Trentu, Italija. Za vrijeme studija također prisustvujem na sedmom i osmom međunarodnom kongresu „Veterinary science and profession ” u Zagrebu; „Interdisciplinarnom znanstveno – stručnom simpoziju o antimikrobnoj rezistenciji – Jedno zdravstvo = jedna znanost“ u Zagrebu; međunarodnoj konferenciji „The Global Leadership Summit“, Zagreb 2017; #TTIP raspravi; TAIEX regionalnoj radionici „Biomedicinski inženjering: Nanotehnologija“ u Mostaru; prvom znanstveno - stručnom simpoziju o reptilima „Reptilia“ u Zagrebu; DDL veterinarskom seminaru male prakse; drugom Europskom seminaru studenata veterine; četvrtom studentskom simpoziju studenata biologije u Zagrebu; manifestaciji „Dani otvorenih vrata Veterinarskog fakulteta“ 2018. i 2019. godine; stručnom skupu „Biološki lijekovi i što ljekarnik mora znati“ u Zagrebu; ERA radionici „Post – genomic era of molecular biology Proteomics era II“ na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu i mnogim drugim.

Za akademske i vanakademske uspjehe tijekom studija sam nagrađen Dekanovom nagradom za izvrsnost, te Generinom stipendijom za najuspješnijeg studenta. Terensko stručnu praksu sam odradio u veterinarskoj ambulanti za male životinje „Buba“ u Zagrebu, a diplomiram na temu ovog znanstveno – istraživačkog rada uz pomoć mentorice J. Habuš.