

# Prevalencija bakterija iz roda *Leptospira* u populaciji mišolikih glodavaca

---

Čordaš, Roberta

Master's thesis / Diplomski rad

2019

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:970494>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-05-20**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom

**Roberta Čordaš**

**Prevalencija bakterija iz roda *Leptospira*  
u populaciji mišolikih glodavaca**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu 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. Doc. dr. sc. Suzana Hađina
2. Dr. sc. Matko Perharić
3. Doc. dr. sc. Josipa Habuš
4. Prof. dr. sc. Vilim Starešina - zamjena

*Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Josipi Habuš na stručnom vodstvu, savjetima, izdvojenom vremenu i strpljenju tijekom izrade ovog rada te na korektnom, profesionalnom i ljubaznom odnosu.*

*Zahvaljujem dr. sc. Vesni Mojčec Perko, dipl. ing. mol. biol., Branki Križanić, doc. dr. sc. Marku Vucelji i Marku Boljfetiću na stručnoj pomoći oko izvođenja praktičnog dijela rada te ukazanom povjerenju.*

*Zahvaljujem se volonterkama klinike za Zarazne bolesti zbog kojih mi predugi dani na fakultetu i odlasci u noćne smjene nikada nisu bili mrski.*

*Velika hvala mojim roditeljima i sestri koji su mi omogućili da se u životu bavim onime što volim.*

## SADRŽAJ:

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Popis slika: .....                                                                                    | IV |
| Popis tablica: .....                                                                                  | V  |
| 1. Uvod.....                                                                                          | 1  |
| 2. Pregled literature .....                                                                           | 2  |
| 2.1. Etiologija .....                                                                                 | 2  |
| 2.2. Epizootiologija.....                                                                             | 3  |
| 2.2.1. Mišoliki glodavci kao rezervoari leptospiroze .....                                            | 4  |
| 2.3. Patogeneza .....                                                                                 | 8  |
| 2.4. Klinička slika .....                                                                             | 8  |
| 2.5. Dijagnostika.....                                                                                | 9  |
| 2.6. Liječenje .....                                                                                  | 11 |
| 2.7. Profilaksa .....                                                                                 | 12 |
| 2.8. GPS lokacije .....                                                                               | 12 |
| 3. Materijali i metode .....                                                                          | 13 |
| 3.1. Odabir uzoraka .....                                                                             | 13 |
| 3.2. Nacjepljivanje tkiva bubrega na hranidbenu podlogu po Korthof-u i praćenje rasta leptospira..... | 14 |
| 3.3. Izdvajanje DNA iz tkiva bubrega životinja .....                                                  | 14 |
| 3.4. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu .....                                            | 15 |
| 4. Rezultati .....                                                                                    | 19 |
| 4.1. Izlov i identificiranje životinja .....                                                          | 19 |
| 4.2. Nacjepljivanje tkiva bubrega na hranidbenu podlogu po Korthof-u i praćenje rasta leptospira..... | 21 |
| 4.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu .....                                            | 21 |
| 4.4. Analiza učestalosti infekcije u mišolikih glodavaca.....                                         | 23 |
| 4.5. GPS lokacije ulovljenih mišolikih glodavaca.....                                                 | 25 |
| 5. Rasprava .....                                                                                     | 27 |
| 6. Zaključci .....                                                                                    | 30 |
| 7. Literatura.....                                                                                    | 31 |
| 8. Sažetak .....                                                                                      | 36 |
| 9. Summary .....                                                                                      | 37 |
| 10. Životopis .....                                                                                   | 38 |

## Popis slika:

Slika 1. *Apodemus flavicollis* – Žutogrli miš

Slika 2. *Apodemus sylvaticus* – Šumski miš

Slika 3. *Apodemus agrarius* – Poljski miš

Slika 4. *Myodes glareolus* – Šumska voluharica

Slika 5. *Microtus agrestis* – Livadna voluharica

Slika 6. *Microtus arvalis* – Obična voluharica

Slika 7. *Sorex* spp. – Rovka

Slika 8. Prikaz zaslona u programu po završetku lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu.

Slika 9. Prikaz relativne brojnosti mišolikih glodavaca po mjestima ulova.

Slika 10. Brojnost uzoraka prema vrstama mišolikih glodavaca.

Slika 11. Usporedni prikaz rezultata metoda korištenih u ovom istraživanju.

Slika 12. Varijacije stupnja kliconošva s obzirom lokalitet

Slika 13. Prikaz kliconošva po grupiranim lokalitetima.

Slika 14. Prikaz odnosa relativne brojnosti mišolikih glodavaca po grupiranim lokalitetima i kliconošva.

Slika 15. Prikaz kliconošva prema vrstama mišolikih glodavaca.

Slika 16. Prikaz lokacija svih uzoraka.

Slika 17. Prikaz općine Velika Gorica (Velika Gorica 79a,7a; Turopoljski Lug 7A; Šiljakovačka Dubrava 69C).

## **Popis tablica:**

Tablica 1. Prikaz genomske klasifikacije leptospira.

Tablica 2. Prikaz datuma i mjesta izlova, broja postavljenih klopki, broja ulovljenih glodavaca, uzoraka nepodesnih za pretragu te broja pretraženih uzoraka.

Tablica 3. Sastav tekuće hranidbene podloge po Korthof-u.

Tablica 4. Za pripremu uzoraka koristile su se kemikalije u koncentracijama prema uputama proizvođača prikazane u tablici.

Tablica 5. Nukleotidni sljedovi početnica i probe korištenih u Real Time PCR reakciji.

Tablica 6. Optimizirani uvjeti izmjene temperature i vremena u uređaju Roto-Gene<sup>®</sup> Q korišteni za potrebe ovog istraživanja.

Tablica 7. Prikaz metode očitavanja rezultata lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu.

Tablica 8. Prikaz umjesta i lokaliteta ulova, datuma te broja uhvaćenih glodavaca i relativna brojnost.

Tablica 9. Prikaz svih pozitivnih uzoraka, njihovih oznaka, lokaliteta, spola, Ct vremena i rezultata izolacije renokulutra.

## 1. Uvod

Leptospiroza je (re)emergentna zarazna bolest mnogih domaćih i divljih životinja i čovjeka uzrokovana patogenim bakterijama iz roda *Leptospira*. To je tipična bolest prirodno žarišnog tipa čija je epizootiologija i epidemiologija usko vezana uz pojedine životinjske vrste koje nose i izlučuju pojedine serovare leptospira u okoliš. Glavni izvor leptospira predstavljaju mišoliki glodavci i štakor (rezervoari leptospiroze) koji od leptospiroze ne oboljevaju i predstavljaju doživotne kliconoše. Mnoge se domaće i divlje životinje također mogu inficirati leptospirama nakon čega dolazi do vremenski ograničenog naseljavanja leptospira unutar prokismalnih bubrežnih kanalića i izlučivanja leptospira u okoliš. Tijekom 50-godišnjeg opsežnog, multidisciplinarnog proučavanja leptospiroze u Republici Hrvatskoj zamijećene su određene osobitosti u njenoj epidemiologiji i epizootiologiji, a vezane su prvenstveno uz vrlo visoku pojavnost leptospiroze u ljudi te razliku u pojavi vjerojatno infektivnih serovara. Navedene specifičnosti objašnjavaju se razlikama u postojanju određenog tipa prirodnog žarišta leptospiroze. U ostatku Europe glavni izvor infekcije predstavlja štakor koji je rezervoar serovara *Icterohaemorrhagiae* i Copenhageni (sinatotropna prirodna žarišta), a u Hrvatskoj glavni izvor infekcije predstavljaju mišoliki glodavci divlje prirode koji su arhaična prirodna žarišta.

Tijekom ovog istraživanja pretražili smo organe dobivene od 186 mišolikih glodavaca izlovljenih u endemskim područjima leptospiroze u Republici Hrvatskoj tijekom 2017. godine. Iz dobivenih organa prvo smo metodom renokulture, uzgojem na tekućim hranjivim podlogama izdvojili bakterije iz roda *Leptospira*. Iz istih organa smo izdvojili DNA koju smo pretražili uporabom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu u svrhu dokaza specifičnih odsječaka DNA patogenih bakterija roda *Leptospira*. Cilj ovog istraživanja je utvrditi učestalost infekcije u mišolikih glodavaca u područjima u kojim se leptospiroza javlja endemski te utvrditi osjetljivost pojedinih metoda koje rabimo kod utvrđivanja učestalosti inficiranosti glodavaca.

## 2. Pregled literature

### 2.1. Etiologija

Leptospiroza, zoonoza svjetske važnosti od koje oboljeva čovjek i više vrsta životinja, uzrokovana je spiralnim bakterijama. Taksonomski gledano spadaju u rod *Leptospira*, porodicu *Leptospiraceae*, red *Spirochaetales*. Zbog velike raznolikosti ovih bakterija nije ih moguće klasificirati prema samo jednom obilježju, već se koristi klasificiranje prema genskim karakteristikama (genomsko) i klasificiranje prema antigenim karakteristikama (serološko ili fenotipsko). Prema genomskoj klasifikaciji, prikazanoj u Tablici 1., razlikujemo 22 genomske vrste koje su podjeljene u 10 patogenih, 5 intermedijarnih i 7 saprofitskih vrsta (PICARDEAU, 2017.). Serološkom klasifikacijom razlikujemo 320 serovara od kojih su 60 saprofitske i intermedijarne, a 260 ih je patogeno. Sve one su svrstane u 29 seroloških skupina (DIKKEN i KMETY, 1978. ; KMETY i DIKKEN, 1993.).

**Tablica 1.** Prikaz genomske klasifikacije 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> (genomospecies 3)   |
| <i>L. noguchii</i>                   | <i>L. licerasiae</i>            | <i>L. vanthiellii</i> (genomospecies 4) |
| <i>L. weilii</i>                     |                                 | <i>L. yanagawae</i> (genomospecies 5)   |
| <i>L. alexanderi</i>                 |                                 | <i>L. vanthielli</i>                    |
| <i>L. alstonii</i> (genomospecies 1) |                                 |                                         |
| <i>L. kmetyi</i>                     |                                 |                                         |
| <i>L. mayottensis</i>                |                                 |                                         |

Leptospire su tanke bakterije, 0,1 do 0,2  $\mu\text{m}$  široke i 6 do 20  $\mu\text{m}$  duge. Fine su spiralne građe koju čine dva aksijalna filamenta oko kojih se uvija protoplazmatski cilindar, a završavaju sa kukicama na oba kraja. Leptospire su spororastuće obligatno aerobne bakterije koje za umožavanje trebaju tekuće i polutekuće hranidbene podloge obogaćene vitaminima B1 i B12, masnim kiselinama dugih lanaca i amonijevim solima te optimalnu temperaturu između 28 i 30°C.

Leptospire dobivaju ugljik i energiju beta-oksidacijom masnih kiselina dugih lanaca, a amonijak koriste kao izvor dušika (HENNEBERRY i COX, 1970.). Za izdvajanje bakterija najčešće se koriste hranjive podloge sa dodatkom kunićjeg seruma (hranidbene podloge prema Stuartu, Korthofu i Fletcheru) (ELLINGHAUSEN i McCULLOUGH, 1965.; JOHNSON i HARRIS, 1967.). Kod primarnih izdvajanja često se rabe podloge s dodatkom kunićjeg seruma koji služi kao dodatni izvor piruvata. U njih se dodaju još i antimikrobe tvari koje inhibiraju rast ostalih bakterija. Od antibiotika koristi se 5-fluorouracil, ali mogu se dodavati i gentamicin, rimfapicin i drugi antibiotici.

Ove bakterije se slabo boje pa ih promatramo u kapi pomoću mikroskopa sa tamnim vidnim poljem. Vanjska membrana im je izgrađena od sastavnih transmembranskih proteina (porin OmpL1), sekretina (GspD), lipopolisaharida (LPS) i antigenskih lipoproteina od kojih nam je najznačajniji LipL32 (GREENE, 2012.). On se pojavljuje isključivo kod patogenih sojeva leptospira (ADLER, 2014.), dokazano je da se baš on najdominantnije izražava na stanici tijekom infekcije (HAAKE i sur., 2000.), a seroaktivan je i tijekom akutne i konvalescentne faze leptospiroze.

## 2.2 Epizootiologija

Primarni izvor infekcije predstavljaju bolesne životinje, kliconoše i rezervoari bolesti koji, povremeno ili trajno, izlučuju leptospire urinom i tako kontaminiraju okoliš. Kada se nađu izvan domaćina, preživljavanje im pospješuju zaštitni mehanizmi stvaranja biofilma i nakupljanje stanica (TRUEBA i sur. 2004.). U vodi, ponajviše stajaćicama, leptospire mogu preživjeti tjednima, a učestale kiše i topla klima pogoduju održavanju u prirodi.

Rezervoari leptospiroze su glodavci. Zbog evolucijske prilagodbe bakterije na ovu skupinu životinja, glodavci ne oboljevaju, ali nakon infekcije doživotno izlučuju leptospire te su zaslužni za održavanje prirodnih žarišta. Infekcija u ljudi i životinja nastupa nakon izravnoga ili neizravnoga kontakta s urinom životinja kliconoša, prvenstveno rezervoara – mišolikih glodavaca. Ulazna vrata za leptospire predstavljaju oštećena koža i sluznica.

Od leptospiroze mogu oboljeti skoro svi sisavci, a klinička slika i kliconoštvo ovisiti će o evolucijskoj prilagodbi određenog serovara na zaraženu jedinku. Primjerice, ukoliko se goveda zaraze serovarom Hardjo-bovis poremetnje u reprodukciji i pobačaja u stadu biti će puno slabije izražene nego kad dođe do infekcije serovarom Pomona za kojeg je govedo slučajni domaćin. Evolucijska prilagodba dokazana je i u drugih domaćih životinja; svinje – serovari Pomona, Tarassovi i Bratislava, psi – serovar Canicola, a kopitari – serovar Bratislava.

Slučajnim domaćinima smatramo one kod kojih ne postoji prilagodba serovara na inficirani makroorganizam. Te životinje će, u pravilu, imati izraženije simptome, a kada prebole bolest, izlučivati će leptospire u urinu kraće vrijeme. U ovu skupinu spadaju i ljudi.

Rizik od oboljevanja ljudi i životinja u izravnoj je vezi s brojnošću populacije rezervoara, što je osobito izraženo na gospodarstvima gdje se ne provode mjere deratizacije ili tijekom takozvanih "mišjih godina", kada broj slobodnoživućih mišolikih glodavaca višestruko poraste. Epidemije leptospiroze su povezane sa poplavama i jakim kišama (PARK i sur., 1990. ; KO, 1999.).

### **2. 2. 1. Mišoliki glodavci kao rezervoari leptospiroze**

Mišoliki glodavci predstavljaju rezervoare leptospiroze u prirodi. Njihova infekcija leptospirama prolazi asimptomatski. Nakon što im se leptospire trajno nasele u proksimalne bubrežne kanaliće, oni postaju kliconoše, te vrlo dugo, čak i doživotno, izlučuju leptospire u okoliš (FAINE i sur. 1999.). Rezervoari se inficiraju u ranoj dobi, infekcija se među njima širi vertikalno. Osim leptospiroze glodavci su rezervoari za još neke zoonoze (hantavirusna hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom, kuga, Lymška borelija, limfocitni koriomeningitis, tularemija, trihinelozna i dr.).

Povećani rizik oboljevanja životinja a i ljudi usko je povezan sa samom brojnošću populacija mišolikih glodavaca. Povećana brojnost glodavaca povećati će mogućnost kontakta i neminovno dovesti do veće kontaminacije okoliša. Praćenjem populacije rezervoara moguće je predvidjeti pojave epizootija odnosno epidemija. Sama gustoća populacije rezervoara ovisiti će o meteorološkim uvjetima, staništu i izvorima hrane, prirodnim neprijateljima i bolestima kao i o fiziološkom stanju populacije (KORPIMAKI i KREBS, 1996.). U velikim dijelovima šumskih područja Hrvatske istraživale su se fluktuacije brojnosti mišjih populacija, a one godine kada je brojnost izrazito velika nazivaju se "mišje godine" (MARGALETIĆ i sur. , 2008.).

### ***Biologija mišolikih glodavaca***

To su sisavci koji imaju tipičan oblik lubanje sa dva para oštih sjekutića koji im služe za glodanje (DELANY, 1974.). Taksonomski gledano pripadaju redu *Rodentia* koji obuhvaća oko 2000 vrsta. Voluharice i miševi razlikuju se temeljem nekoliko fenotipskih značajki. Voluharice imaju kratke uši i rep, kraće stražnje noge, zaobljen oblik tijela i njušku, dobri su kopači i vrlo su pokretne, oprezne i nepovjerljive (BÖSTROM i HANSSON, 1981.). Miševi imaju dugi rep i uši, šiljatu njušku, velike oči i duže stražnje noge. Reprodukcijski potencijala ovih glodavaca je velik, a brojnost populacije ovisi o nekoliko biotičkih i abiotičkih čimbenika (klimatski uvjeti, stanište i izvor hrane, fiziološko stanje populacije, prirodni neprijatelji i bolesti). Gustoća populacije ima

izravan utjecaj na biljni svijet, brojnost predatora ali i širenje zaraznih bolesti. Glodavci su teritorijalne životinje, njihovo ponašanje u obliku borbi u cilju zaštite teritorija, fiziološko ponašanje, socijalni i spolni odnosi imaju veliki utjecaj na gustoću populacije ali i na horizontalno širenje raznih patogena.

### ***Vrste mišolikih glodavaca koje smo susreli u ovom istraživanju***

#### **Apodemus flavicollis – Žutogrli miš**

Ubraja se u najveće i vrlo proždrljive poljske miševe. Prepoznaje se po žutoj okruglastoj ili ovalnoj mrlji koja obuhvaća cijeli vrat. Gornja strana tijela je smečkaste boje, a donja je svjetlija. Živi u šumama, poljima, a zalazi i u vrtove. Pretežito nastanjuje manje vlažne terene sa slabije razvijenim slojem grmlja i velikom količinom listinca (MARGALETIĆ i sur. 2008.). Hrani se sjemenkama, bukvicom, žirom i kukcima. Aktivan je noću, a preko dana spava u skloništima napravljenim od kore i lišća. U prirodi živi oko 4 godine.

#### **Apodemus sylvaticus – Šumski miš**

Nastanjuje livade, šume, šikare, neka polja, ali može živjeti gdje god ima prikladno sklonište. Na vratu ima manju žutu mrlju od žutogrlog miša, tamniji stomak, velike oči i uši. On je jedan od najčešćih malih sisavaca u Europi i dijelu Azije. Vrlo je dobar skakač, plivač i penjač. Hrani se sjemankama biljaka, korijenjem, bobicama ali i člankonošcima. U prirodi kopa tunele i jame pod zemljom gdje se koti i skladišti hranu. (PARKER, 1990.).



**Slika 1.** *Apodemus flavicollis* – žutogrli miš



**Slika 2.** *Apodemus sylvaticus* – šumski miš

### Apodemus agrarius – Poljski miš

Ovaj miš obitava na livadama, određenim poljima, širakrama i rubovima šuma. Zbog pomanjkanja hrane na poljima zimi prelazi u šume, ali se vraća na polja u proljeće (MAZURKIEWICZ, 1981.). Po danu je aktivan i izrađuje skloništa u kojima boravi tijekom noći. Krzno mu je žuto-smeđe boje sa karakterističnom crnom prugom uzduž tijela. Ima relativno malu glavu i kratku njušku. Hrani se većinom kukcima, ličinkama, paucima, stonogama, mekušcima, ali jede i sjemenke i voće.

### Myodes glareolus – Šumska voluharica

Aktivna je danju. Živi u gustom grmlju, skrivena ispod trave. Dobar je penjač pa se hrani mladim lišćem na nekoliko metara visine. Riđe-smeđe je boje sa svjetlijim trbuhom. Ima velike uši i rep duži od livadne voluharice, Gnijezdo pravi pod zemljom, obloži ga mahovinom, ali može i u dupljama drveća, napuštenim gnijezdima i kućicama za ptice. Hrani se sjemenkama, voćem, gomoljima, bobicama, korjenjem i gljivama. Živi samotnjački, a životni vijek joj je oko 2 godine.



**Slika 3.** *Apodemus agrarius* – poljski miš



**Slika 4.** *Myodes glareolus* – šumska voluharica

### Microtus agrestis – Livadna voluharica

Livadna voluharica preferira vlažna staništa bogata vegetacijom, šume i otvorene površine gusto obrasle travom. Uške su joj do pola ili u potpunosti pokrivene krznom za razliku od poljske voluharice koja joj je izgledom jako slična. Ima kratki rep i sivosmeđe krzno na leđima, a trbušna strana joj je svjetlija. Najveću aktivnost pokazuje u sumrak i zoru. Ova vrsta gradi kuglasta gnijezda od izgrižene trave. Hrani se zeljastim biljem, gljivama, korijenjem, korama, bobicama i insektima.



**Slika 5.** *Microtus agrestis* – livadna voluharica



**Slika 6.** *Microtus arvalis* – obična voluharica

#### *Microtus arvalis* – Obična voluharica

Obična voluharica živi na povišenim mjestima, otvorenim područjima, poljima, livadama, na rubovima šuma i putova. Hrani se podzemnim dijelovima biljaka, a za jakih zima glođe koru mladog drveća u visini snježnog pokrivača. Zdepaste je građe sa kratkim nogama i repom te malim ušima. Krzno sa leđne strane je sivo smeđe. Živi u kolonijama. Ima veliki reproduksijski potencijal. Svaki desetak godina dođe do izrazitog povećanja gustoće populacije

#### *Sorex spp.* – Rovka

Usprkos morfološkim sličnostima s ostalim vrstama opisanim u ovom poglavlju rovkica zapravo ne spada u glodavce već u kukcojede. Manja je od kućnog miša. Krzno na leđima je baršunasto, tamnosmeđe, a trbuh joj je sivobijel. Rep je prilično kratak. Živi u vlažnim šumama, parkovima, vrtovima, kopa vlastite hodnike, ali nastanjuje i krtičje i mišje. Zimi ne spava zimski san jer joj je tjelesna težina premala i nema dovoljnih zaliha masnog kiva. Vid joj je zakržljao pa se oslanja na njuh i sluh. Dnevno mora pojesti oko 80% svoje težine da bi preživjela. Od bilja radi gnijezdo poput lončića ispod korijenja ili kamenja. Prehranjuje se kukcima, paucima, crvolikim životinjama.



**Slika 7.** *Sorex spp.* – rovkica

### **2.3. Patogeneza**

Ulazna vrata za leptospire su sluznice ili ozljede na koži. Kad dospiju u krvotok izazivaju septikemiju (leptospiremiju) koja obično traje do 8 dana kad bilježimo i značajan porast humoralnih protutijela. Tijekom te faze leptospire možemo naći u raznim parenhimskim organima (FAINE i sur, 1999.). Nakon toga nasele se u zavinate bubrežne kanaliće odakle se se izlučuju mokraćom (leptospiurija) u goveda više od mjesec dana, u svinja dulje od jedne godine, a u pasa tjednima. Primarna lezija kod leptospiroze je oštećenje endotela, te posljedična ishemija i nekroza. Svojstvo stvaranja toksina kao što je primjerice hemolizin utvrđeno je u više patogenih sojeva leptospira. Leptospire sadrže i nekoliko proteina homolognih životinjskim proteinima pa tako same mogu aktivirati koagulacijsku kaskadu i izazvati diseminiranu intravaskulranu koagulaciju ili pak rekurentni uveitis (HABUŠ, 2013.). Leptospirozni pobačaj nastupi uvijek nekoliko tjedana nakon septikemije i to najčešće u drugoj polovici bređosti, a posljedica je placentitisa. Subakutni ili latentni oblik bolesti se može pojaviti u svih vrsta životinja. Iako nema kliničkih znakova, lako se dokaže povišeni titar protutijela.

### **2.4. Klinička slika**

Kako je već navedeno, klinička slika ovisi o evolucijskoj prilagodbi serovara i domaćina, infektivnoj dozi, serovaru koji je uzrokovao bolest i imunosnom stanju jedinke. Inkubacija uobičajeno traje 5 do 15 dana. Bolest se može očitovati kao inaparentna infekcija, netipična, samolimitirajuća febrilna bolest ili se očituje s težim kliničkim oblicima uz zatajenje bubrega te ponekad i leziju jetre. U iznimno teškim slučajevima dolazi do krvarenja po plućima, koje je vrlo često praćeno smrtnim ishodom (MILAS, 2012.).

Kod konja je infekcija najčešće asimptomatska, no može se očitovati septikemijom, pobačajima ili rekurentnim iridociklitisom, odnosno mjesečnom sljepoćom (BRUDNJAK i sur. , 1956; NIEDERMAIER i sur. , 2006.). HAMOND i sur. 2012. u svom istraživanju dokazali su da i inaparentna infekcija leptospirama ima utjecaj na sportske rezultate i fizičku sposobnost konja.

U goveda leptospiroza najčešće uzrokuje reproduktivne probleme. Teži oblici bolesti, s izraženim općim infekcijskim sindromom, ikterusom, hemoglobinurijom i naglim padom mlječnosti koji traje od dva do deset dana mogu se javiti kod odraslih životinja no ipak su češći kod teladi i junadi u tovu (FAINE i sur. , 1999.).

Vrlo slično je i kod svinja kod kojih se leptospiroza klinički očituje poremećajima u reprodukciji, te težim oblicima kod tovljenika i prasadi (MODRIĆ i sur, 2006; HABUŠ i sur, 2008.).

U koza i ovaca česte su infekcije serovarima Pomona, Grippotyphosa, Hardjo i Bratislava. Kod njih bolest najčešće prolazi inaparentno ili sa smetnjama u reprodukciji (FAINE i sur., 1999.).

U pasa bolest može biti inaparetna ili pak blaga, samolimitirajuća uz nespecifične simptome. Teži slučajevi počinju depresijom, anoreksijom i povraćanjem. Dolazi do zatajenja bubrega i posljedično uremije. Klinički kod tih životinja možemo uočiti i slabost, dehidraciju, povišenu tjelesnu temperaturu, žuticu, nevoljkost za kretanjem, proljev, PU/PD i napet i bolan abdomen. U zadnje vrijeme, u pasa i ljudi, sve je češći i leptospirozni plućni hemoragijski sindrom (LPHS) koji ima visoku smrtnost.

U mačaka je klinički izražena leptospiroza rijetkost jer su one vrlo slabo prijemljive na infekciju (FAINE i sur., 1999.).

Kod ljudi bolest se također može pojaviti inaparentno ili sa blagom kliničkom slikom glavobolje, vrućice, bolovima u mišićima i trbuhu te konjuktivalnim podljevim. Ovaj oblik može proći spontano nakon tjedan dana što se poklapa sa vremenom potrebnim za stvaranje protutijela. Također može se razviti i teški klinički oblik koje se naziva Weilova bolest koja se očituje vrućicom, krvarenjem, zatajenjem bubrega, oštećenjem jetre, žuticom i letalnim ishodom od 5-15% (LEVETT, 2001.). Porastom plućnog hemoragijskog sindroma smrtnost dostiže i do 50% (HELMERHORST i sur. , 2012.).

## **2.5. Dijagnostika**

Kako bi postavili pravodobnu sumnju na leptospirozu vrlo su nam značajni anamnestički podatci (kontakt sa glodavcima, boravak u šumama i područjima s vodama stajaćicama i rijekama). Objektivnu dijagnozu leptospiroze postižemo dokazom uzročnika mikrobiološkim/molekularnim metodama ili dokazom specifičnih protutijela serološkim dijagnostičkim metodama.

### **Dokazivanje uzročnika**

Kako bi dokazali živog uzročnika u nekom organizmu vrlo je bitno pravodobno uzimanje određenih uzraka. U krvi se leptospire nalaze samo oko tjedan dana, kada se pojavljuju protutijela koja ih uklanjaju iz krvotoka. Nakon tjedan dana moguće je leptospire tražiti u urinu, no izlučivanje nije uvijek konstanto pa možemo dobiti lažno negativan rezultat. Postmortalno možemo leptospire tražiti u svim parenhimskim organima u prvih tjedan dana bolesti, nakon tog perioda jedino mjesto gdje ih možemo naći su bubrezi.

### *Izravna detekcija u tjelesnim tekućinama ili tkivu pod mikroskopom s tamnim poljem*

Ovo je vrlo nepouzdana metoda. Potrebna je izrazita gustoća leptospira da bi ih vidjeli u tjelesnim tekućinama. U tkivu odnosno histopatološkim preparatima bubrega nešto je lakše pronaći leptospire, a u tu svrhu se koriste bojanje na bazi srebra ili imunohistokemijske metode.

### ***Molekularne metode***

Da bi dokazali uzročnika dovoljan nam je samo njegov DNA. Za dokaz specifičnih odsječaka DNA patogenih leptospira koristimo se lančanom reakcijom polimeraze (PCR) i lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (Real Time PCR). Ova potonja metoda (real time PCR) ima vrlo visoku osjetljivost i specifičnost, te je relativno brza. Kao uzorak mogu se koristiti krv, urin, cerebrospinalna tekućina te, postmortalno, dijelovi tkiva. Nedostatak ovih metoda je nemogućnost identifikacije serovara leptospira.

### ***Izdvajanje na hranjivim podlogama***

Kao uzorak za ovu metodu može se koristiti krv, prije davanja antibiotika. Izdvajanje je najbolje raditi odmah po uzimanju pune krvi. Ukoliko to nije moguće uzorak se uzima u epruvetu sa heparinom ili natrij oksalatom i dostavlja u laboratorij roku od 24h. Nakon sedmog dana bolesti možemo nacijepljivati i urin. Kod uzimanja uzorka urina za ovu pretragu vrlo je važno neutralizirati urin, posebice ako se radi o urinu mesoždera jer imaju niži pH. Takav uzorak se centrifugira te se sediment razrijedi sa puferom i nasadi na hranjivu podlogu sa 5-fluoruracilom koji sprječava rast drugih bakterija koje su potencijalno kontamirale uzorak. Također se možemo koristiti uzorcima bubrega (renokulture) uzetim iz svježih, ne smrznutih, lešina rezervoara, kliconoša ili bolesnih životinja. Uzorke nasađujemo na tekuću hranjivu podlogu čiji je sastav opisan u poglavlju 2. 4. Svi uzorci se tada gledaju pod mikroskopom sa tamnim vidnim poljem najmanje 3 mjeseca jedanput tjedno. Ova metoda predugo traje da bi imala izravnu dijagnostičku svrhu, no obzirom da jedino ovom metodom dobijemo izolat koji možemo poslje determinirati iznimno je važna za povećavanje osjetljivosti seroloških metoda o čemu će više riječi biti u slijedećem poglavlju. Ova metoda iznimno je značajna za znanstvenike i epidemiologe.

### **Dokazivanje protutijela**

Da bi dokazali postojanje protutijela u organizmu koristimo se serološkim metodama. Najvažnija metoda je mikroskopska aglutinacija (MAT), koja predstavlja zlatni standard u dijagnostici leptospiroze. Od drugih metoda mogu se još koristiti ELISA u obliku komercijalnog kita koji detektira samo IgM protutijela i zapravo je koristan samo u prvom tjednu bolesti jer tada

IgM nastaju (SMITS i sur., 1999.). Još jedna metoda je i makroskopska odnosno lateks-aglutinacija. Ona dokazuje i IgM i IgG ali s njom se ne može utvrditi infektivni serovar, također je slabije osjetljiva od MAT-a.

### **MAT**

Mikroskopska aglutinacija predstavlja zlatni standard u dijagnostici leptospiroze. Ovom serološkom pretragom dokazuje se prisustvo specifičnih IgM i IgG protutijela u serumu. Princip reakcije zasniva se na mogućnosti protutijela da aglutiniraju živi antigen. Ovu reakciju promatramo pod mikroskopom sa tamnim poljem. Pozitivna reakcije je ona gdje je najmanje 50% leptospira u vidnom polju aglutiniralo. Dodatan razlog zašto je ova metoda zlatni standard leži u činjenici da je ona kvalitativna ali i kvantitativna. Uz samu potvrdu postojanja protutijela možemo odrediti i njihov titar koristeći se dvostrukim razrjeđenjima. Zbog velikog broja sojeva leptospira gotovo je nemoguće testirati serum na sve njih, stoga se koristimo panelima antigena. Svaki panel se izrađuje tako da sadrži jednog ili više predstavnika različitih seroloških skupina i prilagođava se vrsti koju testiramo ali i epidemiološkoj i epizootiološkoj situaciji na terenu.

Kod akutnog oblika bolesti potrebno je uzeti parne serume. Ako je u drugom serumu titar četverostruko porastao možemo sa sigurnošću potvrditi bolest. Kada je uzimanje parnih seruma otežano, bolest možemo potvrditi ako je titar u orvom serumu izrazito visok, a podaci o kliničkoj slici, epizootiološkoj i epidemiološkoj situaciji odgovaraju leptospirozi.

Ova metoda je dosta kompleksna, manje je osjetljiva, nema mogućnosti razlikovanja akutnog od rezidualnog titra i potrebno nam je vješto osoblje jer je očitavanje reakcije subjektivno. Iako je izrazito kompleksna metoda ima veliki značaj u dijagnostici, kako kliničarima tako i znanstvenicima i epidemiolozima.

## **2.6. Liječenje**

Leptospire su osjetljive na nekoliko kemoterapeutika, tu spadaju aminoglikozidi, makrolidi, tetraciklini, penicilini i fluorokinoloni. (LEVETT, 2007.). Iako je velika većina antibiotika učinkovita u uklanjanju leptospira iz krvotoka samo streptomycin i doksiciklin sprječavaju kliconoštvo i uklanjaju leptospire iz bubrega (TRUCCOLO i sur. , 2002. ; FAINE, 1999.). Potporno i simptomatsko liječenje, uz etiološko, primjenjeno u početnom stadiju bolesti, uvelike povećava šanse za oporavak životinje.

## **2.7. Profilaksa**

Leptospirozu, kao bolest prirodnog žarišta, izuzetno je teško suzbijati. Opća profilaksa svodi se na suzbijanje kliconoštva i sprječavanja kontakta životinja i ljudi sa izvorima infekcije te smanjenje brojnosti populacije glodavaca. Cjepiva za zaštitu pasa, goveda i svinja od leptospiroze proizvedena su inaktivacijom cijele bakterijske stanice. Imunost je djelomična i kratkotrajna jer ne dolazi do unakrižne zaštite između serovara.

## **2.8. GPS lokacije**

Globalni položajni sustav (GPS) je satelitski radionavigacijski sustav koji služi za lokaliziranje položaja na Zemlji pomoću koordinata. U ovom istraživanju korištene su GPS koordinate mrtvolovki za miševe koje su postavljene po određenim lokalitetima. Koordinate su unešene u sustav Google Maps i Google Earth koji nam vizualno pokazuje točne lokacije uzoraka te tipove lokaliteta gdje su uzorci izlovljeni. Ovakav način prikaza rezultata omogućuje nam lakše razumijevanje kretanja rezervoara i žarišta bolesti.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Odabir uzoraka

U svrhu ovog istraživanja pretražili smo bubrege 186 mišolikih glodavaca izlovljenih u endemskim područjima leptospiroze u Republici Hrvatskoj tijekom 2017. godine. Prisutnost bakterija iz roda *Leptospira* se u svim uzorcima utvrđivala bakteriološkom i molekularnom metodom. Za svakog ulovljenog mišolikog glodavca prikupljeni su i analizirani podaci o mjestu i datumu ulova, vrsti i spolu.

**Tablica 2.** Prikaz datuma i mjesta izlova, broja postavljenih klopki, broja ulovljenih glodavaca, uzoraka nepodesnih za pretragu (pojedeni i truli glodavci, bubrezi koji nisu pretraživani jer su nakon uzorkovanja bili smrznuti) te broja pretraženih uzoraka.

| Br.     | Mjesto ulova         | Lokalitet | Datum ulova | Br. PK <sup>1</sup> | Br. UG <sup>2</sup> | Br. UN <sup>3</sup> | Br. UZ <sup>4</sup> |
|---------|----------------------|-----------|-------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 1       | Velika Gorica        | 79a       | 2.6.2017.   | 50                  | 5                   | 0                   | 5                   |
|         | Velika Gorica        | 7a        | 2.6.2017.   | 50                  | 7                   | 1                   | 6                   |
| 2       | Lipovljani           | 119B      | 7.6.2017.   | 50                  | 12                  | 4                   | 8                   |
|         | Lipovljani           | 175A      | 7.6.2017.   | 50                  | 14                  | 3                   | 11                  |
| 3       | Sljeme               | L1        | 12.7.2017.  | 50                  | 11                  | 1                   | 10                  |
|         | Sljeme               | L2        | 12.7.2017.  | 50                  | 30                  | 16                  | 14                  |
|         | Sljeme               | L3        | 12.7.2017.  | 50                  | 22                  | 7                   | 15                  |
|         | Sljeme               | L4        | 12.7.2017.  | 50                  | 29                  | 16                  | 12                  |
| 4       | Koprivnica           | 29A       | 12.10.2017. | 100                 | 25                  | 5                   | 20                  |
|         | Koprivnica           | 32D       | 12.10.2017. | 100                 | 18                  | 1                   | 17                  |
| 5       | Lekenik              | 51A       | 19.10.2017. | 50                  | 14                  | 0                   | 14                  |
|         | Lekenik              | 37B       | 19.10.2017. | 50                  | 13                  | 1                   | 13                  |
| 6       | Lipovljani           | 119B      | 26.10.2017. | 27                  | 9                   | 0                   | 9                   |
|         | Lipovljani           | 175A      | 26.10.2017. | 27                  | 14                  | 1                   | 13                  |
| 7       | Turopoljski lug      | 7A        | 27.10.2017. | 50                  | 13                  | 1                   | 12                  |
|         | Šiljakovačka Dubrava | 69C       | 27.10.2017. | 50                  | 21                  | 14                  | 7                   |
| UKUPNO: |                      |           |             | 854                 | 257                 | 71                  | 186                 |

<sup>1</sup> Br. PK – broj postavljenih klopki

<sup>2</sup> Br. UG – broj ulovljenih glodavaca

<sup>3</sup> Br. UN – uzorci nepodesni za pretragu

<sup>4</sup> Br. UZ – broj uzoraka

Relativna brojnost glodavaca računala se za svaki izlov po sljedećoj formuli:

$$RB = \frac{\text{broj ulovljenih glodavaca}}{\text{broj postavljenih klopki}} \times 100\%$$

### 3.2. Nacjepljivanje tkiva bubrega na hranidbenu podlogu po Korthof-u i praćenje rasta leptospira

Hranidbena podloga po Korthofu tekućeg je sastava, te služi za uzgoj bakterija iz roda *Leptospira* (BABUDIERY, 1961.). Korištena je razdijeljena po 5 ml u staklene epruvete s metalnim čepom. Sastav ove hranjive podloge naveden je u Tablici 3.

Renokulture su inkubirane pri temperaturi od 28°C, te pregledavane pod mikroskopom s tamnim poljem dva puta tjedno u prvih dva tjedna, a potom jednom tjedno sljedeća tri mjeseca. Rast kultura označavan je s oznakama križa (+) ovisno o gustoći kulture. Pozitivne renokulture su presađivane na nove hranjive podloge sve dok se nije postigla stabilna kultura u vrijednosti gustoće 4 križa (++++), koja odgovara gustoći od  $2-4 \times 10^8$  bakterija u mililitru. Pozitivni uzorci u stabilnoj kulturi su presađeni na hranjivu podlogu po Fletcheru, te pohranjeni u arhivi Laboratorija za leptospire na sobnoj temperaturi.

**Tablica 3.** Sastav tekuće hranidbene podloge po Korthof-u

| Sastojak                             | Količina           |
|--------------------------------------|--------------------|
| <b>Pepton</b>                        | 0,8 g              |
| <b>NaCl</b>                          | 1,4 g              |
| <b>NaHCO<sub>3</sub></b>             | 0,02 g             |
| <b>KCl</b>                           | 0,04 g             |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b>              | 0,04 g             |
| <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>  | 0,18 g             |
| <b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> | 0,96 g             |
| <b>Destilirana voda</b>              | 1 L                |
| <b>Inaktivirani kunićji serum</b>    | koncentracija 10 % |

### 3.3. Izdvajanje DNA iz tkiva bubrega životinja

Za izdvajanje DNA iz bubrega mišolikih glodavaca korišten je komercijalni kit NucleoSpin®Tissue, QIAGEN. Uzorak je prvo odmrznut na sobnoj temperaturi, te usitnjen sterilnim instrumentima (skalpel, pinceta, igla) u mikrobiološkoj biozaštitnoj komori. Potom je odvagano 25 mg tkiva, te je uzorak pohranjen u Eppendorf epruvetu zapremnine 1,5 ml. Da bi se postigla stanična liza dodano je 180 µl Pufera T1 i 25 µl enzima proteinaze K. Uzorci su

promiješani pomoću stolne laboratorijske tresalice (vorteks), te inkubirani preko noći u termomješalici na temperaturi 56°C i brzini vrtnje od 300 rpm-a. Zatim je dodano 200 µl pufera B3 za lizu, vorteksirano, te su uzorci stavljeni na inkubaciju 10 minuta na temperaturi od 70°C i 300 rpm-a u termomješalici. Po završetku inkubacije uzorcima je dodano 210 µl 96%-tnog etanola. Cjelokupan uzorak prebačen je u epruvetu sa silikagelnom membranom koja je u kompletu s sakupljačkom epruvetom. Silikagelna membrana služi da bi se na njoj zadržala DNA iz uzorka. Uzorak je centrifugiran 1 minutu na 11000 rcf. Epruveta sa silikagelnom membranom prebačena je u novu sakupljačku epruvetu, a sadržaj prethodne sakupljačke epruvete je bačen. Sljedeći korak je prvo ispiranje membrane. Dodano je 500 µl pufera BW u epruvetu s membranom, potom centrifugirano 1 minutu na 11000 rcf. Ponovno je epruveta sa silikagelnom membranom prebačena u novu sakupljačku epruvetu, a sadržaj prethodne je bačen. Za drugo ispiranje dodano je 600 µl pufera B5, ovoga puta centrifugirano je 2 puta po 1 minutu na 11000 rcf. Epruveta sakupljačica je bačena, a epruveta s membranom stavljena u Eppendorf epruvetu zapremnine 1,5 ml. Da bi otpustili DNA, na silikagelnu membranu je dodano 100 µl pufera BE. Nakon inkubacije od 1 minute na sobnoj temperaturi, epruveta je centrifugirana 1 minutu na 11000 rcf. Završetkom ovog koraka dobivena je cjelokupna DNA iz tkiva bubrega mišolikih glodavaca. Uzorci DNA su pohranjeni na temperaturi od -20°C.

### **3.4. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu**

U svrhu dokazivanja prisutnosti specifičnih odsječaka DNA patogenih bakterija iz roda *Leptospira*, izdvojena DNA svakog pojedinog uzorka analizirana je lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (Real-time PCR). Real-time PCR pouzdana je i precizna metoda za kvalitativan i kvantitativan dokaz i analizu specifičnih molekula DNA. Za izvođenje reakcije potrebne su vrlo male količine DNA. U reakciji Real time PCR produkti reakcije su obilježeni fluorescencijskom bojom i analiziraju se prilikom nastanka u stvarnom vremenu.

Za izvođenje Real time PCR reakcije korišten je komercijalni komplet QuantiFast Pathogen PCR +IC Kit, Qiagen. Značajno je za ovaj kit da nije potrebno optimizirati koncentraciju početnica, Mg<sup>2+</sup> ili enzima DNA polimeraze, budući da je 5x QuantiFast Pathogen Master Mix posebno optimiziran za visoko osjetljivu detekciju nukleinske kiseline ciljanog patogena u kombinaciji s DNA koji služi kao unutarnja kontrole uspješnosti provedbe PCR reakcije.

Priprema uzoraka za reakciju provedena je u mikrobiološkoj biozaštitnoj komori. U plastične kapilare stavljena je PCR smjesa u koju je dodana izdvojena DNA za svaki uzorak. Ukupni volumeni i kemikalije prikazane su u tablici 4. Svaki uzorak rađen je u dvije zasebne reakcije. U

svakoj analizi korištene su pozitivne i negativne kontrole, također u dvije reakcije svaka. Za negativnu kontrolu u PCR smjesu dodana je sterilna voda, a za pozitivnu kontrolu DNA izdvojena iz kulture bakterija leptospira, serovar Tarrasovi, soj Mus 127.

**Tablica 4.** Za pripremu uzoraka koristile su se kemikalije u koncentracijama prema uputama proizvođača prikazane u tablici.

| Kemikalija                                        | Volumen | Koncentracija                           |
|---------------------------------------------------|---------|-----------------------------------------|
| <b>5x QuantiFast Pathogen Master Mix</b>          | 2,5 µl  | 1x                                      |
| <b>10x specifična Lip L32 početnica/proba Mix</b> | 1,94 µl | 0,7 µM F i R početnice<br>0,15 µM probe |
| <b>10x Test interne kontrole</b>                  | 1,25 µl | 1x                                      |
| <b>10x DNA unutarnje kontrole</b>                 | 1,25 µl | 1x                                      |
| <b>Voda bez RNaze</b>                             | 4,56 µl | -                                       |
| <b>Uzorak DNA</b>                                 | 1µl     | -                                       |
| Ukupan volumen:                                   | 12,5 µl | -                                       |

Za dokaz prisutnosti DNA leptospira u Real Time PCR reakciji korištene su uzvodna LipL32-45F i nizvodna LipL32- 286R početnica koje su specifične za umnažanje dijela gena za lipoprotein vanjske membrane, Lip L32. Uz početnice u Real Time PCR reakciji korištena je i proba LipL32-189P fluorescentno obilježena na krajevima.

**Tablica 5.** Nukleotidni sljedovi početnica i probe korištenih u Real Time PCR reakciji

| Naziv početnice/probe                    | Nukleotidni slijed početnice/probe 5'-3' |
|------------------------------------------|------------------------------------------|
| <b>LipL32-45F- uzvodna početnica</b>     | AAGCATTACCGCTTGTGGTG                     |
| <b>LipL32- 286R – nizvodna početnica</b> | GAAACTCCCATTTCAGCGATT                    |
| <b>LipL32-189P – proba</b>               | FAM-AAAGCCAGGACAAGCGCCG-BHQ-1            |

Reakcije su izvođene u uređaju Roto-Gene® Q, Qiagen koji koristi napredni sustav za grijanje i hlađenje uzorka, te postizanje optimalnih uvjeta reakcije. Jedinstveni rotacijski format osigurava optimalnu toplinsku i optičku uniformnost među uzorcima, što je značajno za preciznu i pouzdanu analizu. Uzorci se neprestano vrte pri brzini vrtnje od 400 rpm tijekom reakcije.

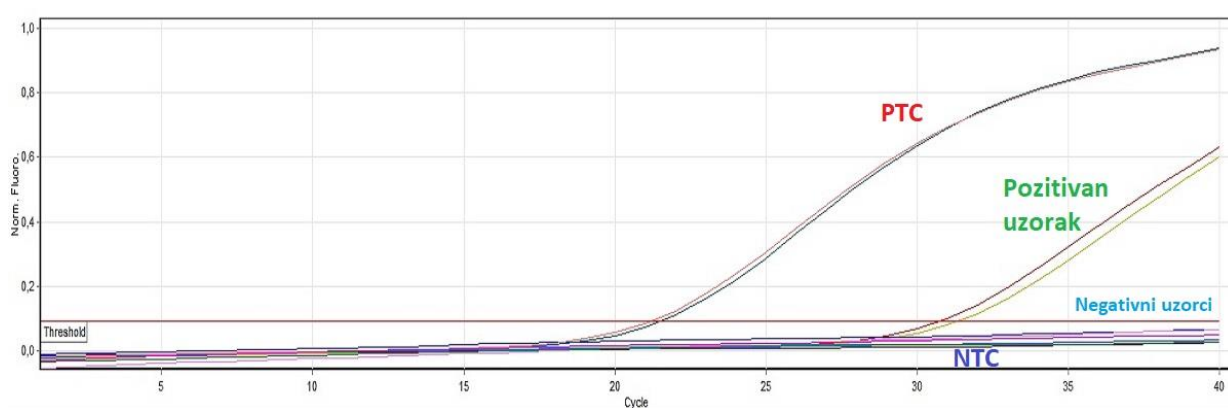
Rotiranje sprječava kondenzaciju i uklanja mjehuriće zraka iz uzorka, ali ne taloži DNA. Uzorke nije potrebno centrifugirati prije početka reakcije. U uređaju za Real Time PCR postavljeni su uvjeti PCR reakcije kroz zadane promjene temperature i vremena reakcije koje su prikazane u tablici 6.

**Tablica 6.** Optimizirani uvjeti izmjene temperature i vremena u uređaju Roto-Gene® Q korišteni za potrebe ovog istraživanja.

| Korak                                    | Vrijeme | Temperatura |            | Opis reakcije                                                             |
|------------------------------------------|---------|-------------|------------|---------------------------------------------------------------------------|
| <b>Prva aktivacija enzima polimeraze</b> | 2 min   | 95°C        |            | aktivacija DNA polimeraze                                                 |
| <b>Denaturacija DNA</b>                  | 5 sek   | 95°C        | 40 ciklusa | Denaturacija dvolančane DNA/ nastanak i produljivanje novonastalih lanaca |
| <b>Hibridizacija</b>                     | 30 sek  | 60°C        |            |                                                                           |

Za analizu podataka korišten je informatički program Software Version Roto-Gene 2. 1. 0. 9. Umnažanje DNA u uzorku očituje se porastom krivulje u programu koji prati reakciju u stvarnom vremenu. Za analizu uzoraka koristi se Ct (cycle threshold) vrijednost koja određuje ciklus u kojem linija amplifikacije prelazi prag detekcije. Postavljanjem praga detekcije dobivene su točke križanja sa svakom od krivulja umnažanja za pojedine uzorke, odnosno Ct vrijednost.

**Slika 8.** Prikaz zaslona u programu po završetku lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu. Na slici vidimo krivulje koje označuju pozitivnu (PTC) i negativnu (NTC) kontrolu te pozitivne i negativne uzorke.



Kao pozitivan uzorak, odnosno uzorak kod kojeg je zabilježena prisutnost dijela gena za vanjsko-membranski protein bakterije iz roda *Leptospire*, opisujemo onaj uzorak kod kojeg je Ct vrijednost ispod 36 u obje reakcije.

**Tablica 7.** Prikaz metode očitavanja rezultata lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu.

|                              |                                        |
|------------------------------|----------------------------------------|
| <b>2x &lt; 36</b>            | <b>Pozitivan uzorak</b>                |
| <b>1x &lt;36, 1x nema Ct</b> | sumnjivo pozitivan (ponoviti pretragu) |
| <b>1x &gt;36, 1x nema Ct</b> | sumnjivo negativan (ponoviti pretragu) |
| <b>2x nema Ct</b>            | Negativan uzorak                       |

## 4. Rezultati

### 4.1. Izlov i identificiranje životinja

Ovo istraživanje provedeno je na uzorcima koji su prikupljeni tijekom petomjesečnog razdoblja (od 2. lipnja do 27. listopada 2017. godine). U navedenom razdoblju postavljeno je ukupno 854 mrtvolovki i uhvaćeno 257 mišolikih glodavaca od kojih je 186 bilo podobno za ovo istraživanje.

Analizom dobivenih podataka utvrđeno je da gustoća populacije mišolikih glodavaca nije bila jednaka na svim lokalitetima (Slika 9.), niti unutar svih vremenskih razdoblja. Kad smo analizirali podatke obzirom na godišnje doba prosječna relativna brojnost u proljeće bila je 19%, ljeti 46% a početkom zime 32,41% (Tablica 8). Prosječna relativna brojnost za cjelokupno istraživanje iznosi 30,76%.

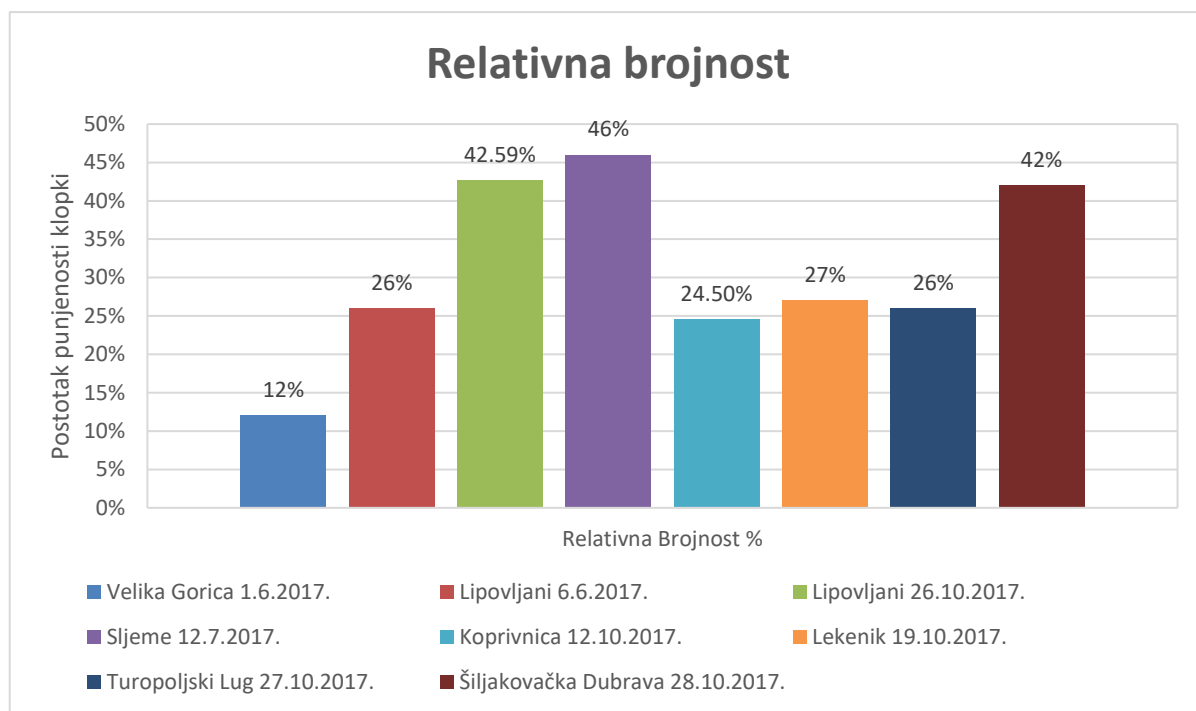
**Tablica 8.** Prikaz mjesta i lokaliteta ulova, datuma te broja uhvaćenih glodavaca i relativna brojnost.

| Br.     | Mjesto ulova         | Lokalitet | Datum ulova | Br. PK | Br. UG | R. B.  |
|---------|----------------------|-----------|-------------|--------|--------|--------|
| 1       | Velika Gorica        | 79a       | 2.6.2017.   | 50     | 5      | 12%    |
|         | Velika Gorica        | 7a        | 2.6.2017.   | 50     | 7      |        |
| 2       | Lipovljani           | 119B      | 7.6.2017.   | 50     | 12     | 26%    |
|         | Lipovljani           | 175A      | 7.6.2017.   | 50     | 14     |        |
| 3       | Sljeme               | L1        | 12.7.2017.  | 50     | 11     | 46%    |
|         | Sljeme               | L2        | 12.7.2017.  | 50     | 30     |        |
|         | Sljeme               | L3        | 12.7.2017.  | 50     | 22     |        |
|         | Sljeme               | L4        | 12.7.2017.  | 50     | 29     |        |
| 4       | Koprivnica           | 29A       | 12.10.2017. | 100    | 25     | 24,5%  |
|         | Koprivnica           | 32D       | 12.10.2017. | 100    | 18     |        |
| 5       | Lekenik              | 51A       | 19.10.2017. | 50     | 14     | 27%    |
|         | Lekenik              | 37B       | 19.10.2017. | 50     | 13     |        |
| 6       | Lipovljani           | 119B      | 26.10.2017. | 27     | 9      | 42,59% |
|         | Lipovljani           | 175A      | 26.10.2017. | 27     | 14     |        |
| 7       | Turopoljski lug      | 7A        | 27.10.2017. | 50     | 13     | 26%    |
| 8       | Šiljakovačka Dubrava | 69C       | 27.10.2017. | 50     | 21     | 42%    |
| UKUPNO: |                      |           |             | 854    | 257    | 30,76% |

Br. PK – broj postavljenih klopki  
Br. UG – broj ulovljenih glodavaca  
R.B. – relativna brojnost

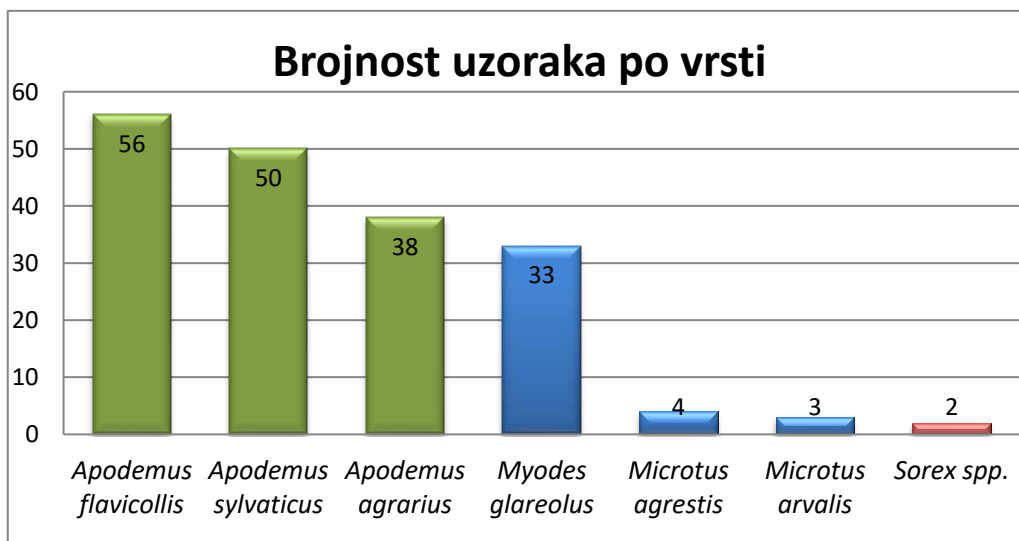
|  |          |
|--|----------|
|  | Proljeće |
|  | Ljeto    |
|  | Jesen    |

**Slika 9.** Relativna brojnost mišolikih glodavaca po mjestima ulova



Unutar pretraženih uzoraka distribucija vrste glodavaca također je bila raznolika (Slika 10). Od ukupnog broja uhvaćenih životinja, miševi su činili 77,41%, voluharice 21,50% a rovke 1,07%. Najbrojnija vrsta bila je *Apodemus flavicollis* – žutogrli miš (30,1%), a raspodjela ostalih vrsta je kako slijedi: *A. sylvaticus* 26,88%, *A. agrarius* 20,4%, *M. glareolus* 17,74%, *M. agrestis* 2,15%, *M. arvalis* 1,61% te *Sorex spp.* 1,07%. Muških životinja bilo je 94 (51%), a ženskih 91 (49%) dok podaci o spolu za jednu životinju nisu bili poznati.

**Slika 10.** Brojnost uzoraka prema vrstama mišolikih glodavaca.



Zeleno su označeni miševi, plavo voluharice, a crveno rovke.

#### 4.2. Nacjepljivanje tkiva bubrega na hranidbenu podlogu po Korthof-u i praćenje rasta leptospira

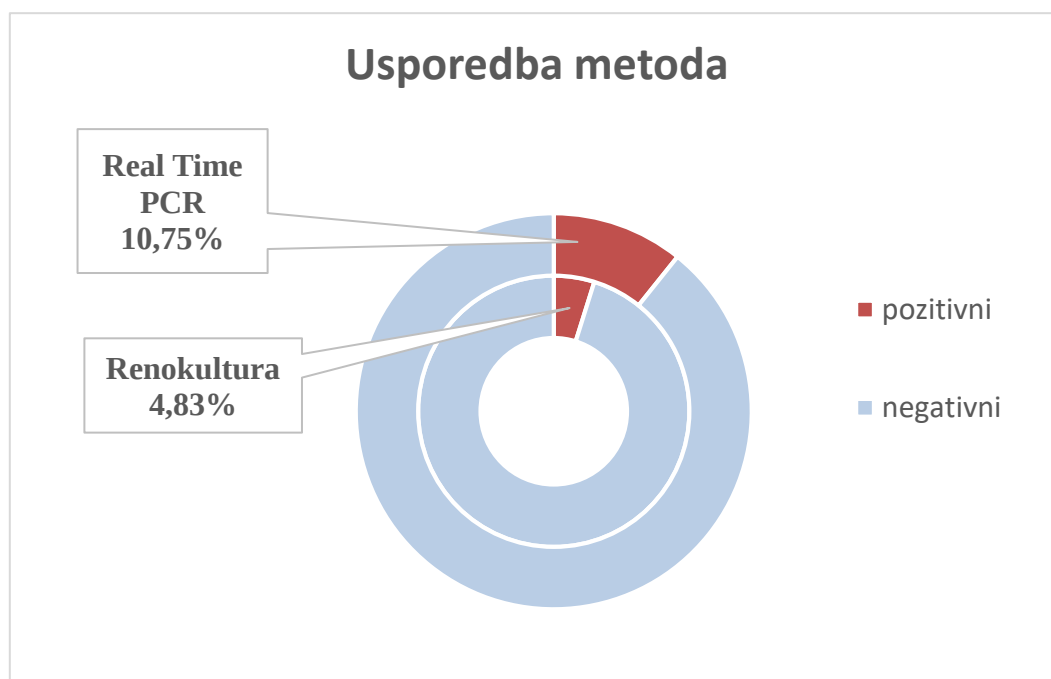
Od ukupno 186 uzoraka bubrega koji su nasađeni na hranidbenu podlogu po Korthof-u, leptospire su izdvojene iz njih devet. Šest izolata (66,66%) izdvojeno je iz bubrega žutogrlog miša, dva iz bubrega poljskog miša (22,22%) dok je jedan izolat izdvojen (11,11%) iz bubrega šumskog miša. Izdvajanjem devet izolata od ukupno 186 životinja ustanovljeno je kliconoštvo od 4,83%.

#### 4.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Od ukupno 186 uzoraka u njih 20 je utvrđen specifični odsječak DNA leptospira (10,75%). Devet pozitivnih uzoraka (45%) utvrđeno je u žutogrlog miša, pet (25%) u poljskog miša, a četiri (20%) u livadnog miša. Lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu prisutnost DNA leptospira utvrđena je i u voluharica; po jedan pozitivan uzorak potjecao je tako od livadne (5%) i jedan od šumske voluharice (5%) (Tablica 9).

Metodom reakcije polimerazom u stvarnom vremenu utvrđena je prisutnost patogenih leptospira u bubrezima svih miševa iz kojih su renokulturom izdvojene leptospire, no i u dodatnih jedanaest mišolikih glodavaca kod kojih je metoda izolacije polučila negativan rezultat (Slika 11.).

**Slika 11.** Usporedni prikaz rezultata metoda korištenih u ovom istraživanju.



**Tablica 9.** Prikaz svih pozitivnih uzoraka, njihovih oznaka, lokaliteta, spola, Ct vremena i rezultata izolacije renokulutra

| R. br. | Oznaka miša | Vrsta                       | Spol | Lokalitet                 | Ct 1   | Ct 2   | Renokult. |
|--------|-------------|-----------------------------|------|---------------------------|--------|--------|-----------|
| 1      | M 2002      | <i>Apodemus flavicollis</i> | M    | 79a, Velika Gorica        | 30. 33 | 30. 95 | +, KB     |
| 2      | M 2008      | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Ž    | 79a, Velika Gorica        | 25. 54 | 25. 64 | -         |
| 3      | M 2010      | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | Ž    | 79a, Velika Gorica        | 27. 01 | 27. 15 | -         |
| 4      | M 2012      | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | M    | 79a, Velika Gorica        | 25. 76 | 25. 89 | +         |
| 5      | M 2013      | <i>Apodemus flavicollis</i> | Ž    | 119b, Lipovljani          | 26. 6  | 36. 43 | KB        |
| 6      | M 2019      | <i>Myodes glareolus</i>     | Ž    | 119b, Lipovljani          | 36. 9  | 35. 24 | -         |
| 7      | M 2030      | <i>Microtus agrestis</i>    | M    | 175a, Lipovljani          | 32. 89 | 32. 11 | -         |
| 8      | M2123       | <i>Apodemus agrarius</i>    | Ž    | 37B, Lekenik              | 34. 08 | 33. 51 | -         |
| 9      | M 2125      | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | M    | 37B, Lekenik              | 25. 25 | 25. 56 | KB        |
| 10     | M 2128      | <i>Apodemus flavicollis</i> | M    | 37B, Lekenik              | 28. 14 | 32. 13 | +         |
| 11     | M2133       | <i>Apodemus agrarius</i>    | M    | 51A, Lekenik              | 31. 99 | 31. 7  | KB        |
| 12     | M 2139      | <i>Apodemus flavicollis</i> | Ž    | 51A, Lekenik              | 32. 37 | 32. 61 | +         |
| 13     | M 2141      | <i>Apodemus flavicollis</i> | M    | 51A, Lekenik              | 32. 99 | 33. 08 | +         |
| 14     | M 2148      | <i>Apodemus agrarius</i>    | M    | 175A, Lipovljani          | 26. 53 | 26. 59 | +, KB     |
| 15     | M 2158      | <i>Apodemus agrarius</i>    | M    | 119B, Lipovljani          | 29. 22 | 28. 8  | KB        |
| 16     | M 2176      | <i>Apodemus flavicollis</i> | Ž    | 7A, Turopoljski lug       | 26. 25 | 26. 54 | -         |
| 17     | M 2179      | <i>Apodemus flavicollis</i> | Ž    | 7A, Turopoljski lug       | 31. 76 | 31. 89 | +         |
| 18     | M 2182      | <i>Apodemus flavicollis</i> | M    | 69C, Šiljakovačka Dubrava | 28. 22 | 27. 2  | +         |
| 19     | M 2183      | <i>Apodemus agrarius</i>    | M    | 69C, Šiljakovačka Dubrava | 32. 03 | 31. 94 | +         |
| 20     | M 2186      | <i>Apodemus flavicollis</i> | Ž    | 69C, Šiljakovačka Dubrava | 28. 64 | 28. 27 | -         |

+ : pozitivna renokultura

- : negativna renokultura

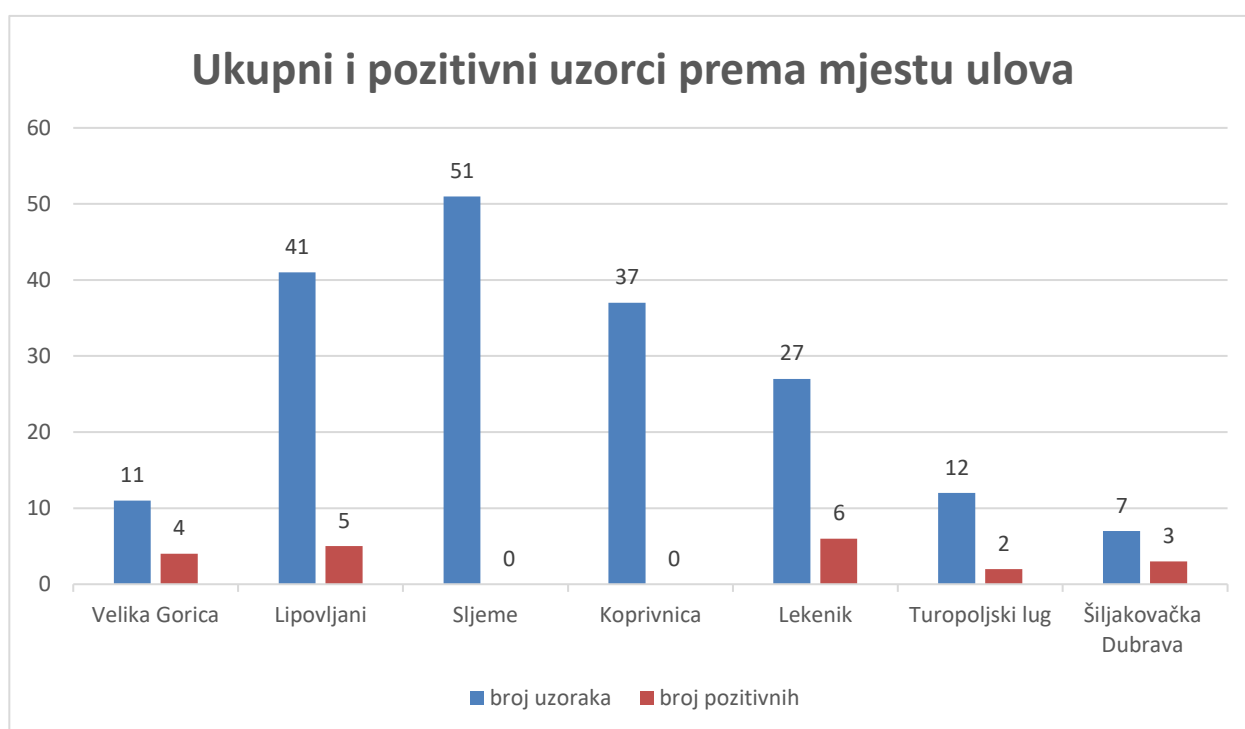
KB: kontaminirana i bačena renokultura

#### 4.4. Analiza učestalosti infekcije u mišolikih glodavaca

Rezultati dobiveni laboratorijskim metodama obrađeni su kako bi dobili podatke o učestalosti infekcije u mišolikih glodavaca obzirom na lokalitet, vrstu, spol i godišnje doba.

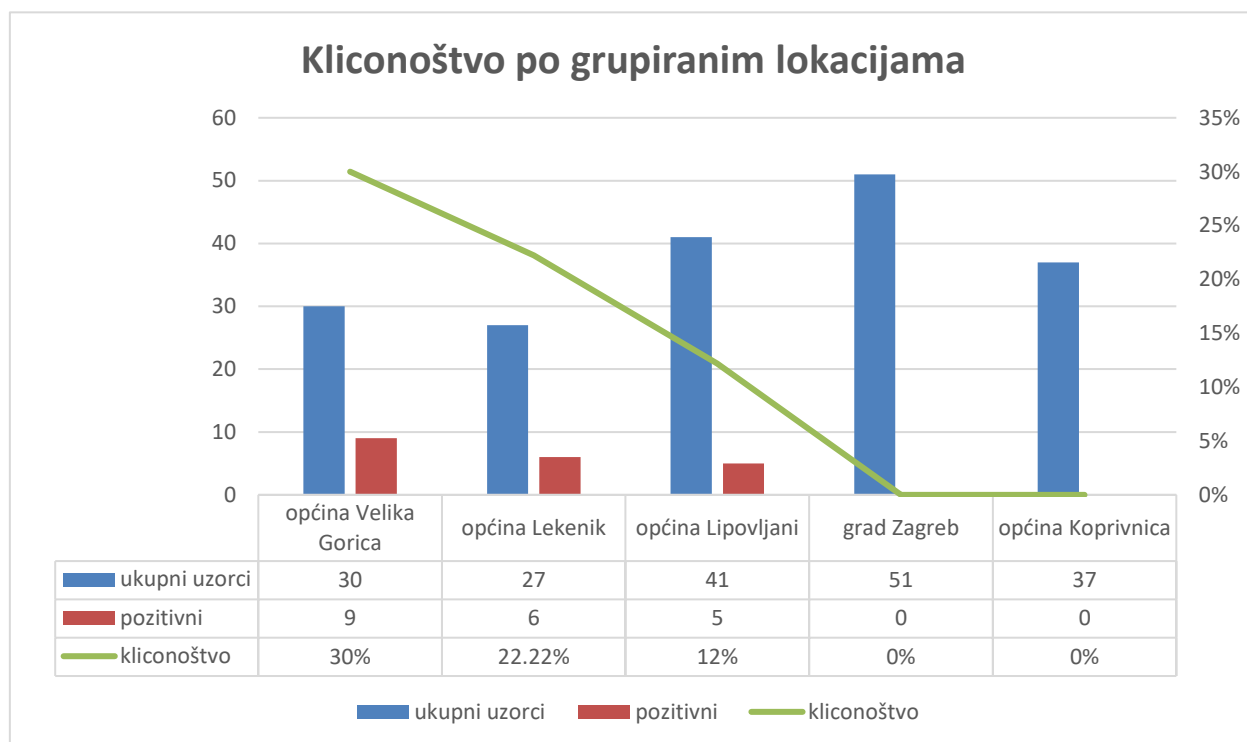
Prosječna učestalost infekcije bakterijama iz roda *Leptospira* iznosila je 10,75% (20/186), no analizom dobivenih rezultata vidljiva je izrazita razlika učestalosti infekcije obzirom na lokaciju izlova (Slika 12.).

**Slika 12.** Varijacije stupnja kliconoštva obzirom na lokalitet. Graf prikazuje odnos ukupno uhvaćenih i pozitivnih životinja po mjestu ulova.



Obzirom na mjesto ulova pozitivni uzorci utvrđeni su na pet od sedam istraživanih lokacija; u Velikoj Gorici, Lipovljanima, Lekeniku, Turopoljskom Lugu i Šiljakovačkoj Dubravi. Razlika u postotku kliconoštva bila je još očitija kad smo uzorke grupirali uzevši u obzir nešto šire geografsko područje (grad, općinu) (Slika 13.) Najveća učestalost infekcije zabilježena je u općini Velika Gorica (30%). U općini Lekenik iznosila je 22%, a u općini Lipovljani 12%. Gledajući odnos između relativne brojnosti i učestalosti infekcije nije pronađena pozitivna korelacija (Slika 14.).

**Slika 13.** Prikaz kliconošva po grupiranim lokalitetima



Općina Velika Gorica: Velika Gorica 79a,7a; Turopoljski Lug 7A; Šiljakovačka Dubrava 69C.

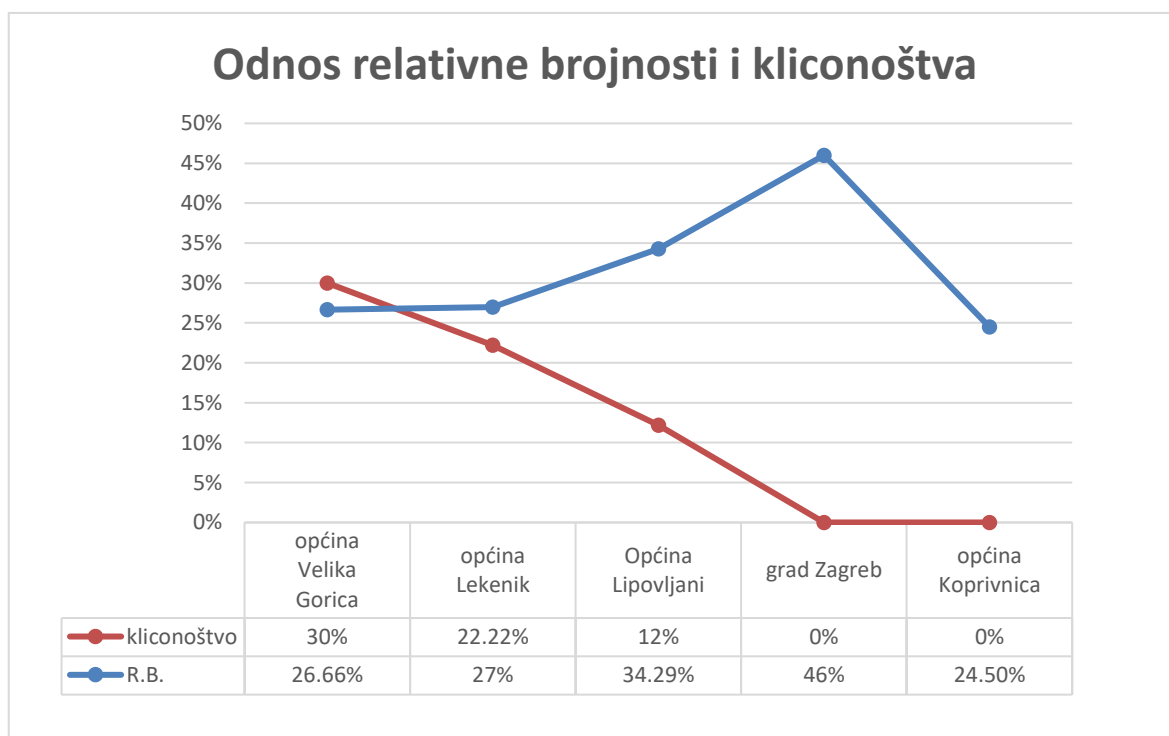
Općina Lekenik: Lekenik 37B, 51A.

Općina Lipovljani: Lipovljani 119B, 175a.

Grad Zagreb: Sljeme L1, L2, L3, L4.

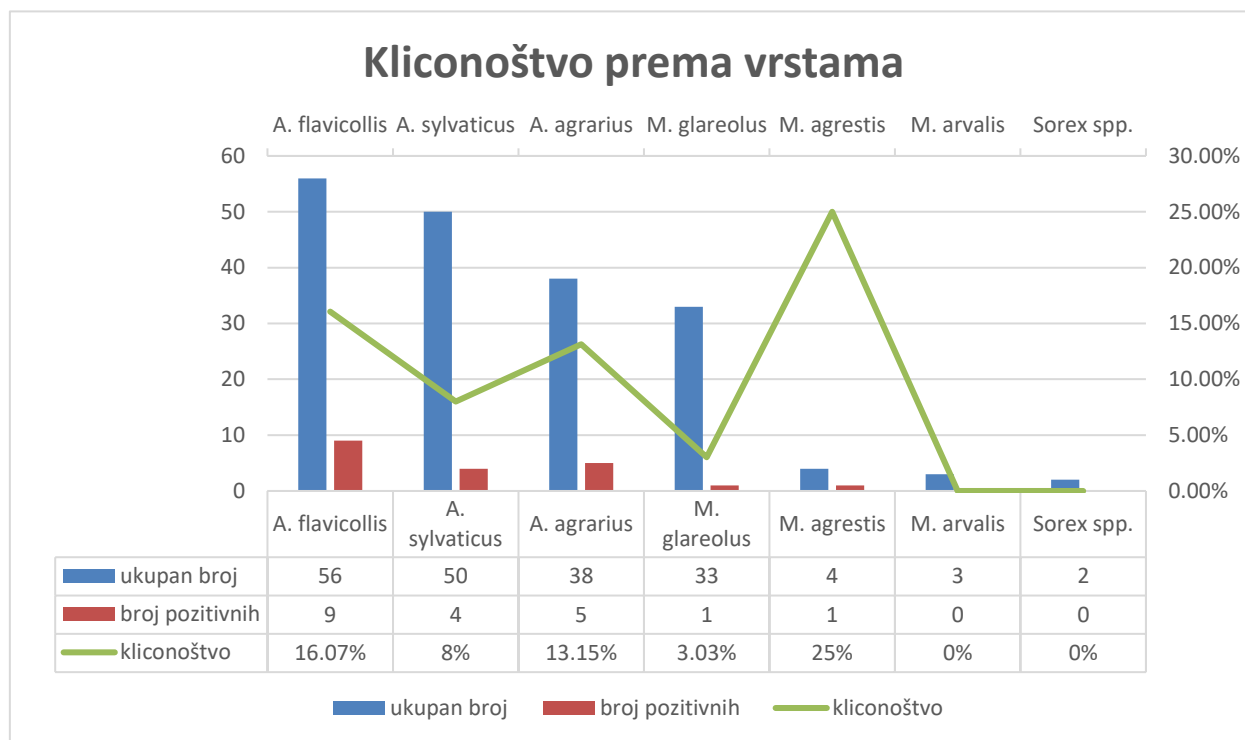
Općina Koprivnica: Koprivnica 29A, 32d.

**Slika 14.** Prikaz odnosa relativne brojnosti mišolikih glodavaca po grupiranim lokalitetima i kliconošva.



Stupanj kliconošta također je varirao obzirom na vrstu životinje (Slika 15.). Najveća učestalost infekcije (25%) tako je utvrđena u livadne voluharice (*M. agrestis*), dok s druge strane kliconošto nije dokazano u rovki i običnih voluharica.

**Slika 15.** Prikaz kliconošta prema vrstama mišolikih glodavaca.

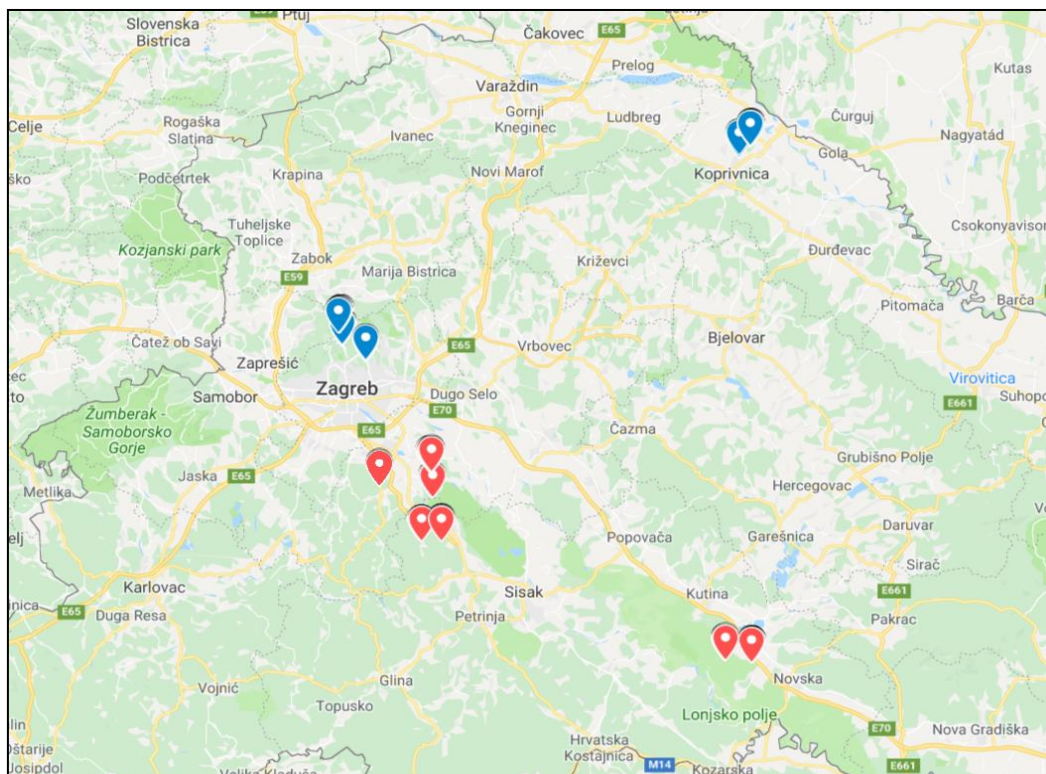


Nije bilo značajne razlike u kliconoštu obzirom na spol. DNA leptospira utvrđena je u 11 (55%) muških i 9 (45%) ženskih životinja.

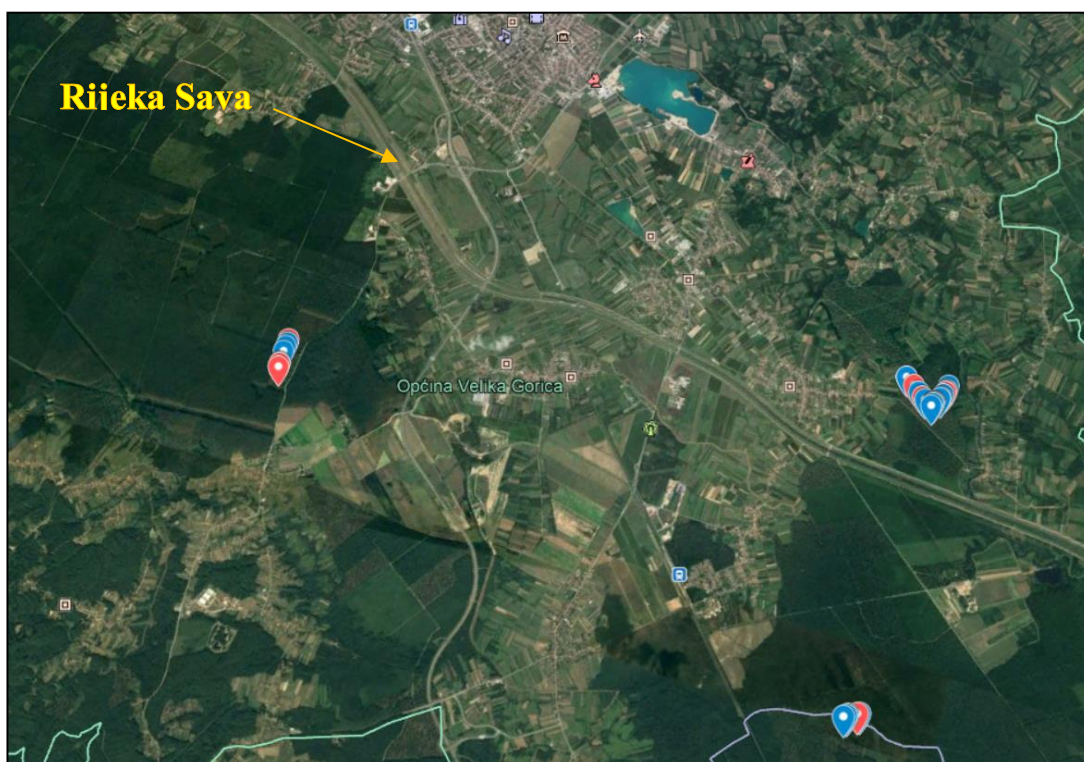
#### 4.5. GPS lokacije ulovljenih mišolikih glodavaca

Koristeći se koordinatama unešenim u sustav Google Maps dobivene su karte na kojima su točno vidljiva mjesta uhvaćenih mišolikih glodavaca (označeni plavo) i mjesta pozitivnih uzoraka (označeni crveno). Koristeći se programom Google Earth ustanovljen je tip staništa te položaj većih rijeka i njihovih slivova u odnosu na lokalitete koji su pretraživani.

**Slika 16.** Prikaz lokacija svih uzoraka. Lokaliteti gdje su detektirani pozitivni uzorci označeni su crvenim oznakama, a lokaliteti bez pozitivnih uzoraka su označeni plavom oznakom.



**Slika 17.** Prikaz općine Velika Gorica (Velika Gorica 79a,7a; Turopoljski Lug 7A; Šiljakovačka Dubrava 69C). Ovaj prikaz je odabran zbog visokog stupnja kliconošta (30%). Ovi lokaliteti pripadaju poplavnom području rijeke Save.



## 5. Rasprava

U ovom radu prikazana je proširenost bakterija iz roda *Leptospira* u populaciji mišolikih glodavaca uzorkovanih na sedam različitih lokaliteta u Republici Hrvatskoj u razdoblju od pet mjeseci. Korištene su metode naciepljivanja tkiva bubrega na hranidbenu podlogu po Korthof-u i praćenje rasta leptospira te lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu.

Koristeći se metodom naciepljivanja tkiva bubrega na tekuću hranidbenu podlogu po Korthof-u prisutnost leptospira utvrđeno je u devet životinja, dok je metodom reakcije polimerazom u stvarnom vremenu detektirano 20 pozitivnih uzoraka. Svi pozitivni uzorci dobiveni naciepljivanjem potvrđeni su i metodom reakcije polimeraze u stvarnom vremenu, no uporabom molekularne metode utvrđeno je i dodatnih 11 pozitivnih životinja. Navedeni rezultati potvrđuju činjenicu da je lančana reakcija polimerazom puno osjetljivija metoda detekcije prisustva leptospira u tkivu bubrega. Prednosti molekularnih metoda, uz visoku osjetljivost i specifičnost, su i brzina izvođenja, i mogućnost detekcije DNA leptospira i kratko nakon davanja antibiotika (važno za dijagnostiku u ljudi i domaćih životinja). Dodatno, ovom metodom može se utvrditi prisustvo leptospira i u organima koji su zbog početka autolize ili način skladištenja (smrzavanje) nepogodni za bakteriološku pretragu. Nedostatak ovih metoda je nemogućnost identifikacije dokazanih leptospira. Stoga, iako je manje osjetljiva, dugo traje i zahtjeva veću stručnost, metoda izdvajanjem ne može u potpunosti biti zamijenjena bržim i osjetljivijim molekularnim metodama koje su pak izuzetno pogodne za određivanje postotka kliconoštva.

Prosječna relativna brojnost, odnosno punjenost klopki i gustoća populacije u ovom istraživanju bila je 30,76% što je vrlo slično relativnoj brojnosti glodavaca utvrđenoj u istraživanju ŠTRITOF, 2010., kada je prosječna punjenost klopki iznosila 28,2% što se smatralo većom gustoćom nego prijašnjih godina. Raspon punjenosti klopki u ovom istraživanju kretao se od najmanjeg od 12% u Velikoj Gorici do najvećeg od 46% na Sljemenu.

Obzirom da je većina izlova vršena samo jednokratno, temeljem podataka prikupljenih u ovom istraživanju, teško je potvrditi zaključke nekih prijašnjih studija. Ipak, relativno niska relativna brojnost glodavaca na lokalitetu Velika Gorica u lipnju (12%) poklapa se sa već provedenim istraživanjima gustoće populacije u različita godišnja doba (MARGALETIĆ i sur., 2008.) koja su, na istoj lokaciji, zabilježila vrlo sličan trend.

Prema podacima dobivenih istraživanjem VUGRINEC, 2018., relativna brojnost u općini Lipovljani bila je 2014. godine 91%, a 2016. godine 33%, dok ona prema ovom istraživanju za 2017. godinu iznosi 34,29%. Ovakav trend kretanja gustoće populacije može se objasniti činjenicom da na gustoću populacije utječe količina hrane na lokalitetima, ali i klimatski uvjeti.

Urod bukve u jesen ima značajnu ulogu u produljenju sezone razmnožavanja mišolikih glodavaca, pa je brojnost populacije povećana u proljeće (BJEDOV i sur., 2016.). U razdoblju od 2015. do 2017. zabilježen je izostanak i nepravilnost uroda sjemena obične bukve sa samo jednom plodnom godinom (GAVRANOVIĆ i sur., 2018.) što objašnjava trend smanjenja gustoće populacije mišolikih glodavaca u odnosu na 2014. godinu. Dodatno 2014. godina bila je, po podacima Hrvatskog hidrometeorološkog zavoda izuzetno vlažna s čestim poplavama.

Iako nije potvrđeno našim istraživanjem, smatra se da određivanje stupnja kliconoštva i brojnosti same populacije mišolikih glodavaca ima važnu ulogu u procjeni rizika infekcije za životinje i ljude te bi ovaj aspekt trebao biti dodatno istražen (TURK i sur., 2003., TURK i sur., 2006., HABUŠ i sur., 2017.).

Morfološkim identificiranjem vrsta ustanovljeno je da je najučestalija životinja (obuhvaćena ovim istraživanjem) bio žutogrli miš (*A. flavicollis*) 56/186 (30,1%), potom slijedi šumski miš (*A. sylvaticus*) sa 50/186 (26,88%), poljski miš (*A. agrarius*) 38/186 (20,4%), šumska voluharica (*M. glareolus*) 33/186 (17,74%), livadna voluharica (*M. agrestis*) 4/186 (2,15%), obična voluharica (*M. arvalis*) 3/186 (1,61%) te rovka (*Sorex spp.*) sa 2/186 (1,07%). Dominantnost određene vrste u izlovu ovisit će o tipu staništa na kojem se postavljaju klopke. U prijašnjim istraživanjima najraširenija vrsta je bila *Apodemus agrarius* (ŠTIRTOF, 2009.; BORČIĆ i sur., 1982.). U novijem istraživanju prikazano je da je najbrojnija vrsta bila žutogrli miš (*A. flavicollis*) sa čak 53% od ukupnog broja uzoraka (BJEDOV i sur., 2016.). Za poljskog miša (*A. agrarius*) karakteristično da za vrijeme rasta vegetacije najčešće obitava na poljoprivrednim površinama, a preko jeseni migrira u šumu, dok žutogrli miš nastanjuje manje vlažna područja sa velikom količinom listinica i slabije razvijenim slojem grmlja (MARGALETIĆ i sur., 2008.). Poslije obilnog uroda žira u većini slučajeva dolazi do povećanja brojnosti populacije žutogrlog miša. Prema podacima Agrokлуба Hrvatska u 2016. godini hrast kitnjak je imao nadprosječan urod što onda možemo povezati sa povećanjem brojnosti žutogrlog miša u sljedećoj godini.

Tijekom ovog istraživanja iz pet (71,4%) od ukupno sedam vrsta malih sisavaca izdvojene su leptospire. Ovakav nalaz potvrđuje njihovu važnu ulogu u održavanju leptospira unutar endemskih područja Republike Hrvatske. U budućim istraživanjima potrebno je tipizirati izdvojene leptospire kako bi se dobio i uvid u eventualnu povezanost pojedinih serovara sa određenim vrstama glodavaca u različitim staništima.

Stupanj kliconoštva utvrđen tijekom ovog istraživanja iznosio je prosječno 10,75%. Utvrđena je velika raznolikost u postotku inficiranosti obzirom na geografske lokacije izlova (0-30%) što se poklapa sa rezultatima nekih prijašnjih studija. Tako je u dolinama rijeka Save i Drave dokazano je kliconoštvo od 7,0% i 8,9% (BORČIĆ i sur., 1982. ; BORČIĆ i sur. , 1983.). U istočnoj Slavoniji

ustanovljeno je kliconoštvo od 29,9% (ŠTRITOF, 2010.). MILAS i sur., 2002. ustanovili su kliconoštvo od 7,5%, dok su TURK i sur., 2003. ustanovili stupanj kliconošta od 7,0%. Raznoliki postotak inficiranih glodavaca utvrđen je i u ostalim državama Europe. U Njemačkoj je ustanovljeno prosječno kliconoštvo od 13,3 % no uz napomenu da je najveći stupanj kliconošta u tom istraživanju bio 21,2% i to u najvećoj pokrajini Sjevernoj Rajni – Vestfaliji koja je smještena u udolini rijeke Rajne (FISCHER i sur. 2018.). Na području grada Zurich-a u Švicarskoj prisustvo leptospira dokazano je u 12,6% glodavaca (ADLER i sur. 2001.).

U našem istraživanju u općini Velika Gorica ustanovljen je stupanj kliconošta od 30%. Ovakav visoki stupanj možemo pokušati objasniti položajem ovog lokaliteta. Naime to područje pripada u sliv rijeke Save te ima veliki poplavni potencijal, a vlažna područja omogućuju duži opstanak leptospira u okolišu izvan rezervoara. Provedeno istraživanje je premalog obujma da bi se moglo tvrditi da je ovo područje izuzetno rizično, no dobiveni rezultati upućuju da bi svakako trebalo napraviti longitudinalnu studiju koja bi pratila kliconoštvo te ostale biotičke i abiotičke čimbenike na istim lokalitetima ali kroz dulje vrijeme.

Vrsta mišolikih glodavaca u koje je utvrđen najveći stupanj kliconošta (25%) bila je livadna voluharica (*M. agrestis*). Ipak, ovaj rezultat treba uzeti sa zadržkom jer je uhvaćeno svega četiri jedinke ove vrste. Iz dosadašnjih istraživanja razvidno je se postotak kliconošta u različitim vrsta glodavaca može znatno razlikovati. Tako su BORČIĆ i sur., 1982., također uvrđili najveći stupanj kliconošta u livadne voluharice (31,6%); BRUDNJAK i sur., 1982. u žutogrlog miša (42,8%), a ŠTRITOF, 2010., u poljskog miša (50%). Ova neujednačenost u podacima kroz godine može se protumačiti fluktuacijama populacija mišolikih glodavaca, metodama izlova uzoraka i raznolikosti okoliša na pojedinim lokalitetima, te naravno o upotrijebljenoj metodi detekcije (serološke, bakteriološke ili molekularne metode).

Za razliku od većine prijašnjih, u ovome istraživanju nije ustanovljena korelacija između gustoće populacije i povećanog kliconošta u glodavaca. Ovakav rezultat može se objasniti izuzetno kompleksnom epizootologijom leptospiroze. Kako je već prije navedeno, na širenje ali i održavanje bolesti u prirodi utječu razni čimbenici kao na primjer klima, sastav tla, poplavnost područja, nadmorska visina, a možda i neki drugi, još neistraženi čimbenici.

## 6. Zaključci

1. Gustoća populacije mišolikih glodavaca izuzetno je promjenjiva i ovisi o mjestu i vremenu izlova. Prosječna gustoća populacije u ovom istraživanju iznosila je 30,76%.
2. Najbrojnija vrsta u izlovu tijekom ovog istraživanja je bila *Apodemus flavicollis* – žutogrli miš 56/186 (30,1%) što se možda može povezati sa natprosječnim urodom žira prethodne godine.
3. Stupanj kliconošta utvrđen metodom naciepljivanja i praćenja rasta iznosio je 4,83% (9/186), a metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu 10,75% (20/186). Veća osjetljivost lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu te činjenica da se njome mogu pretraživati i djelomično autolitični uzorci čine ovu metodu dobrim izborom u istraživanjima kliconošta u populaciji mišolikih glodavaca. Ipak, nemogućnost identifikacije dokazanog soja razlog je zašto metoda izdvajanjem ne može u potpunosti biti zamijenjena bržim i osjetljivijim molekularnim metodama.
4. Prisutstvo bakterija iz roda *Leptospira* utvrđeno je u pet od sedam pretraživanih vrsta što potvrđuje ulogu mišolikih glodavaca u održavanju endemskih žarišta leptospiroze.
5. Rezultati ovog istraživanja ne potvrđuju pozitivnu korelaciju između gustoće populacije i povećanog kliconošta u glodavaca, no ukazuju na pojedina geografska područja u kojima je učestalost infekcije u glodavaca relativno visoka (šira okolica Velike Gorice).
6. Visoki postotak inficiranih glodavaca na području okolice Velike Gorice možemo pokušati objasniti činjenicom da to područje pripada u sliv rijeke Save te ima veliki poplavni potencijal. Vlažna područja omogućuju duži opstanak leptospira u okolišu izvan rezervoara.
7. Ovo istraživanje je premalog obujma da bi se mogli odrediti svi čimbenici koji utječu na brojnost populacije glodavaca i postotak inficiranosti, no dobiveni rezultati upućuju na potrebu za longitudinalnom studijom koja bi pratila kliconošto te ostale biotičke i abiotičke čimbenike na istim lokalitetima ali kroz dulje vrijeme.

## 7. Literatura

1. ADLER, B. (2014): Current Topics in Microbiology and Immunology: *Leptospira* and Leptospirosis. Springer. 198-238.
2. ADLER, H., s. VONSTEIN; P. DEPLAES, C. STEIGER, R. FREI (2001): Prevalence of *Leptospira* spp. in various species of small mammals caught in an inner-city area in Switzerland. Epidemiol. Infect. 128, 107-109.
3. BABUDIERI, B. (1961): Laboratory Diagnosis of Leptospirosis. Bull. Wld. Hlth. Org. 24, 45.
4. BORČIĆ, B., H. KOVAČIĆ, Z. ŠEBEK, B. ALERAJ, N. TVRTKOVIĆ (1982): Small terrestrial mammals as reservoir of leptospires in Sava Valley (Croatia). Folia Parasitol. 29, 177-182.
5. BORČIĆ, B., H. KOVAČIĆ, Z. ŠEBEK, B. ALERAJ, N. TVRTKOVIĆ (1983): Small terrestrial mammals as reservoir of leptospires in Drava Valley. Vet. Arhiv 53, 41-49.
6. BJEDOV, L., P. SVOBODA, A. TADIN, J. HABUŠ, Z. ŠTRITOF, N. LABAŠ, M. VUCELJA, A. MARKOTIĆ, N. TURK, J. MARGALETIĆ (2016.): Utjecaj uroda sjemena obične bukve (*Fagus sylvatica* L.) na populacije sitnih glodavaca i pojavnosti hantavirusa u šumama nacionalnog parka „Plitvička jezera“ i parka prirode „Medvednica“; Šumarski list, 9-10: 455-464.
7. BÖSTROM U., L. HANSSON (1981): Small rodent communities on mires: implications for population performance in other habitats. Oikos 37, 216-240.
8. BRUDNJAK, Z., P. ZELENKA, M. ŠIBALIN (1956): Prilog poznavanju leptospiroze u konja. Vet. Arhiv 26, 165.
9. DELANY, M. J. (1974): The ecology of small mammals. Studies in biology 51, 29-44.

10. DIKKEN, H., E. KMETY (1978): Serological typing methods of leptospire. U: Methods in Microbiology. New York: Academic Press, 259-307. (Bergan T. i Norris J. R eds. Vol. 11).
11. 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.
12. FAINE, S., B. ADLER, C. BOLIN, P. PÉROLAT (1999): *Leptospira* and Leptospirosis, Second Edition, MediSci, Melbourne, Australia.
13. FISCHER S., A. MAYER-SCHOLL, C. IMHOLT C, N. G. SPIERLING, E. HEUSER, S. SCHMIDT, D. REIL, U. M. ROSENFELD, J. JACOB, K. NÖCKLER, R. G. ULRICH (2018): *Leptospira* Genomespecies and Sequence Type Prevalence in Small Mammal Populations in Germany. Vector Borne Zoonotic Dis. 18(4), 188-199.
14. GAVRANOVIĆ, A., S. BOGDAN, M. LANŠČAK, M. GRADEČKI-POŠTENJAK, I. ČEHULIĆ, M. IVANKOVIĆ (2018): Dinamika plodonošenja i morfološke značajke plodova odabranih provenijencija obične bukve (*Fagus sylvatica* L.) u Hrvatskoj / Knjiga sažetaka. Međ.znan. konf. "Šumarska znanost: sjećanje na prošlost, pogled u budućnost". Jastrebarsko, Hrvatska, 2018. str. 82-83.
15. GREENE, C. E. (2012): Leptospirosis. U: Infectious diseases of the dog and cat, fourth edition; Elsevier Saunders, Missouri; 431-447.
16. 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.
17. 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. Infektol. glasnik. 28, 183-188.

18. HABUŠ, J. (2013): Genska sljedivost patogenih bakterija roda *leptospira* u prirodnom žarištu leptospiroze / doktorska disertacija. Zagreb: Veterinarski fakultet, 2013. , 26-30 str.
19. HABUŠ, J., Z. PERŠIĆ, S. ŠPIČIĆ, S. VINCE, Z. ŠTRITOF, Z. MILAS, Z. CVETNIĆ, M. PERHARIĆ, N. TURK (2017): New trends in human and animal leptospirosis in Croatia, 2009-2014. *Acta Tropica* 168, 1–8.
20. HAMOND, C., G. MARTINS, W. LILENBAUM (2012): Subclinical leptospirosis may impair athletic performance in racing horses. *Trop. Anim. Health Prod.* 44, 1927–1930.
21. 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.
22. HENNEBERRY, R. C., C. D. COX (1970): Beta-oxidation of fatty acids by *Leptospira*. *Can. J. Microbiol.* 16, 41-45.
23. HOANG K. L., N. VAN CUONG, R. TAKHAMPUNYA, B. T. KIET, J. CAMPBELL, L. N. THEM, J. E. BRYANT, B. TIPPAYACHAI, N. VAN HOANG, S. MORAND, V. B. HIEN, J. J. CARRIQUE-MAS (2015): How important are rats as vectors of Leptospirosis in the Mekong Delta of Vietnam? *Vector-borne and zoon. Dis.* 15(1), 56-64.
24. JOHNSON, R. C., W. G. HARRIS (1967): Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire. Growth at low temperatures. *J. Bacteriol.* 94, 27-31.
25. KMETY, E., H. DIKKEN (1993): Classification of the Species *Leptospira interrogans* and History of its Serovars. University Press, Groningen, The Netherlands.
26. KO, A. I., M. GALVAO REIS, C. M. RIBEIRO DOURADO, W. D. JOHNSON, L. W. RILEY (1999): Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet* 353, 820-825.
27. KORPIMAKI, E., C. J. KREBS (1996): Predation and population cycles of small mammals. *Bioscience* 46, 754-764.

28. LEVETT, P. N. (2001): Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 14, 296–326.
29. LEVETT, P. N. (2007): Leptospirosis. U: Medical Microbiology. Mosby Elsevier Health Science.
30. 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.
31. MAZURKIEWICZ, M. (1981): Spatial organization of a bank vole population in years of small and large numbers. Acta Theriol. 26,31-45.
32. 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.
33. MILAS, Z. (2012): Leptospiroza. U: Veterinarski priručnik, Medicinska naklada, Zagreb. 2516-2523 str.
34. 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.
35. 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.
36. PARK, Y. K., S. K. PARK, Y. K. RHEE, S. K. KANG (1990): Leptospirosis in Chonbuk province of Korea in 1987. Korean J. Intern. Med. 5, 34-43.
37. PARKER, S. P. (1990): Grizmek's Encyclopedia of Mammals. Volume 3. McGraw-Hill Publishing Company: New York

38. PICARDEAU, M. (2017): Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? Nat. Rev. Microbiol. 15, 297-307.
39. 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.
40. ŠTRITOF, Z. (2010): Molekularna epizootiologija leptospiroze u mišolikih glodavaca / doktorska disertacija. Zagreb: Veterinarski fakultet, 17. 12. 2010., 88 str.
41. TRUEBA, G., S. ZAPATA, K. MADRID, P. CULLEN, D. HAAKE (2004): Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. Int. Microbiol. 7, 35–40.
42. TRUCCOLO, J., F. CHARAVAY, F. MERIEN, P. PÉROLAT (2002): Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis. Antimicrob. Agents Chemoter. 46, 848-853.
43. 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.
44. TURK, N., MILAS, Z., MOJCEC, V., RUZIC-SABLJIC, E., STARESINA, V., STRITOF, Z., HABUS, J., POSTIC, D. (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.
45. VUGRINEC, M. (2018): Utvrđivanje proširenosti bakterije *Francisella tularensis* u populaciji mišolikih glodavaca / diplomski rad. Zagreb: Veterinarski fakultet, 2018., 21-27 str.

## 8. Sažetak

### **Prevalencija bakterija iz roda *Leptospira* u populaciji mišolikih glodavaca**

Leptospiroza je (re)emergentna zarazna bolest mnogih domaćih i divljih životinja i čovjeka uzrokovana patogenim bakterijama iz roda *Leptospira*. To je tipična bolest prirodno žarišnog tipa čija je epizootiologija i epidemiologija usko vezana uz pojedine životinjske vrste koje nose i izlučuju pojedine serovare leptospira u okoliš. Glavni izvor leptospira predstavljaju mišoliki glodavci i štakor (rezervoari leptospiroze) koji od leptospiroze ne oboljevaju, a predstavljaju doživotne kliconoše. Ciljevi ovog istraživanja bili su utvrditi učestalost infekcije u mišolikih glodavaca te utvrditi osjetljivost pojedinih metoda koje u tu svrhu možemo rabiti. Bubrezi 186 mišolikih glodavaca izlovljenih na sedam izdvojenih lokaliteta unutar endemskih područja leptospiroze Republike Hrvatske pretraženi su paralelno metodom izdvajanja i metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu. Metodom renokulture ustanovljeno je 9/186 pozitivnih uzoraka (4,83%), a lančanom reakcijom polimerazom 20/186 (10,75%). Veća osjetljivost lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu te činjenica da se njome mogu pretraživati i djelomično autolitični uzorci čine ovu metodu dobrim izborom u istraživanjima kliconoštva u populaciji mišolikih glodavaca. Ipak, nemogućnost identifikacije dokazanog soja razlog je zašto metoda izdvajanjem ne može u potpunosti biti zamijenjena bržim i osjetljivijim molekularnim metodama. Prisutstvo bakterija iz roda *Leptospira* utvrđeno je u pet od sedam pretraživanih vrsta što potvrđuje ulogu mišolikih glodavaca u održavanju endemskih žarišta leptospiroze. Najviši stupanj kliconoštva (30%) utvrđen je na širem području Velike Gorice. Ovakav rezultat može se pokušati objasniti činjenicom da to područje pripada u sliv rijeke Save i da ima veliki poplavni potencijal, a vlažna područja omogućuju duži opstanak leptospira u okolišu. Kako bi se dodatno istražili biotički i abiotički čimbenici koji utječu na brojnost populacije mišolikih glodavaca i postotak inficiranosti leptospirama trebalo bi provesti longitudinalnu studiju koja bi pratila kliconoštvo te ostale čimbenike na istim lokalitetima ali kroz dulje vrijeme.

*Ključne riječi:* *Leptospira*, mišoliki glodavci, Real Time PCR, renokultura

## 9. Summary

### **Prevalence of *Leptospira* spp. in population of small rodents**

Leptospirosis is a (re) emerging zoonosis of many domestic and wild animals and humans, caused by pathogenic bacteria from the genus *Leptospira*. It is a naturally foci disease with epizootiology and epidemiology closely linked to carrier species that excrete certain serovars of *Leptospira* to the environment. The main reservoirs of leptospira are rats and small rodents that do not suffer from clinical disease and are lifelong carriers. The aim of this study was to determine the shedding rate in small rodents in areas where leptospirosis appears endemic and to determine the sensitivity of methods used to detect the frequency of rodent infections. Renal culture and real-time polymerase chain reaction (qPCR) were used to test kidney specimens of 186 animals, trapped in seven endemic regions of Croatia. Using the isolation method we obtained nine positive samples (4,83%), while 20 (10,75%) positive samples were detected by qPCR. Molecular methods had higher sensitivity and we were able to obtain positive result even on autolyzed samples. However, due to the fact that serological determination cannot be achieved by molecular methods, isolation is still considered important in this kind of epidemiological investigations. During this investigation *Leptospira* spp. were detected in five out of seven small rodents species with the highest degree of shedding (30%) detected in the Velika Gorica municipality. Those findings can be because this area belongs to the river Sava basin and have high flooding potential and humid areas allow longer survival of leptospira in the environment. Further longitudinal studies are needed in order to identify all abiotic and biotic factors that can affect the density of rodent population and shedding rates.

*Key words:* *Leptospira*, small rodents, Real Time PCR, isolation

## 10. Životopis

Rođena sam u Našicama 5. srpnja 1992. godine. Pohađala sam osnovnu školu J. J. Strossmayera u Đurđenovcu. Upisujem srednju Poljoprivrednu i veterinarsku školu u Osijeku, smjer Veterinarski tehničar, gdje sam maturirala 2011. Iste godine upisujem Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom fakultetskog obrazovanja volontiram sa konjskim pacijentima te na Klinici za zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta. Radila sam administrativne poslove u Laboratoriju za leptospire Veterinarskog Fakulteta u trajanju od 6. mjeseci preko studentskog servisa. Terensko sručnu praksu u trajanju od 2 mjeseca odradila sam u Sloveniji na Veterinarskom fakultetu u Ljubljani, klinici za reprodukciju farmskih životinja. Preko programa Erasmus+ provela sam 3 mjeseca u Belgiji na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Ghentu, gdje sam sudjelovala na kliničkim rotacijama s preživačima, konjima i malim životinjama.