# Istraživanja Leptospira spp. u šumskim ekosustavima Europe

**Lopac, Marija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:132741

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

University of Zagreb Faculty of Forestry and Wood Technology

**ŠUMARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU**

**ŠUMARSKI ODSJEK**

**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ**

**UZGAJANJE I UREĐIVANJE ŠUMA S LOVNIM GOSPODARENJEM**

**MARIJA LOPAC**

# ISTRAŽIVANJA *LEPTOSPIRA SPP.* U ŠUMSKIM EKOSUSTAVIMA EUROPE

**DIPLOMSKI RAD**

**ZAGREB, 2016.**

**ŠUMARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU**

**ŠUMARSKI ODSJEK**

# ISTRAŽIVANJA *LEPTOSPIRA SPP.* U ŠUMSKIM EKOSUSTAVIMA EUROPE

**DIPLOMSKI RAD**

Diplomski studij: Uzgajanje i uređivanje šuma s lovnim gospodarenjem

Predmet: Zoonoze u šumskim ekosustavima

Ispitno povjerenstvo :

1. prof.dr.sc. Josip Margaletić
2. dr.sc. Marko Vucelja
3. dr.sc. Milivoj Franjević

Student: Marija Lopac

JMBAG: 0068216962

Broj indeksa: 546/14

Datum odobrenja teme: 11.4.2016

Datum predaje rada: 19.9.2016

Datum obrane rada: 23.9.2016

**Zagreb, rujan, 2016.**

## *DOKUMENTACIJSKA KARTICA*

| | |
|---|---|
| *Naslov* | Istraživanja *Leptospira spp.* u šumskim ekosustavima Europe |
| *Title* | Research of *Leptospira spp.* in forest ecosystems of Europe |
| *Autor* | Marija Lopac |
| *Adresa autora* | Nikole Jurišića 20,Senj |
| *Mjesto izrade* | Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu |
| *Vrsta objave* | Diplomski rad |
| *Mentor* | Prof. dr. sc. Josip Margaletić |
| *Izradu rada pomogao* | Dr. sc. Marko Vucelja |
| *Godina objave* | 2016 |
| *Obujam* | broj stranica : 71,broj tablica : 7,broj slika :22,broj grafičkih prikaza :2 ,broj navoda literature : 22 |
| *Ključne riječi* | Leptospira ,spiralna bakterija, leptospiroza,prirodna žarišta, serovar, serogrupa, glodavci, ekosustav, Europa, *Leptospira interrogans*, masena spektrometrija, ELISA, PCR, rtPCR |
| *Key words* | Leptospira, spiral bacteria, leptospirosis, natural foci, serovar, serogroup, small rodents, ecosystem, Europe, *Leptospira interrogans* mass spectrometry, ELISA, PCR, rtPCR |
| *Sažetak* | Spiralne bakterije iz roda Leptospira glavni su uzročnici akutne septokemijske zarazne bolesti leptospiroze. Glavni izvori zaraze su bolesne životinje, koje leptospire izlučuju urinom te tako kontaminiraju tlo, vegetaciju i vodu. Zbog različitih potreba serološki tipovi leptospira su svrstane u serološke skupine. Leptospiroza nije problem samo šumskih ekosustava nizinske Hrvatske već je i problematika Europe. Ovaj diplomski rad obuhvatit će areal rasrostiranja leptospiroze na europskom kontinentu, prirodna žarišta pojedinih serotipova leptospira, domaćine, utjecaj klimatskih prilika na pojavu leptospira te također kliničke karakteristike. Za izradu rada koristit će se dostupna znanstvena literatura. |

*Abstract*

Spiral bacteria from genus *Leptospira* are main cause of acute septicemic disease leptospirosis. Main sources of infection are sick animals, and they make contamination of soil,vegetation and water through urine. Because different needs leptospira serptypes are classify in serogroups. Leptospirosis isn't only problem of Croatia lowland forest ecosystems, but also problem of whole Europe. This thesis will include : areal of leptospirosis in Europe, natural foci of certain serotypes, hosts, influence of climatic conditions on occurrence of leptospira, and clinical characteristics. For this thesis will be used available scientific literature.

# SADRŽAJ


**1. UVOD** ..... 1

**2. PREDMET ISTRAŽIVANJA** ..... 3

**2.1. OPIS *LEPTOSPIRA SPP.*** ..... 3

**2.1.1. Struktura genoma *Leptospira spp.*** ..... 4

**2.2. KLASIFIKACIJA *LEPTOSPIRA SPP.*** ..... 4

**2.3. POVIJEST LEPTOSPIROZE** ..... 7

**2.4. REZERVOARI *LEPTOSPIRA INTERROGANS*** ..... 8

**2.5 PRIRODNA ŽARIŠTA LEPTOSPIROZE** ..... 14

**2.6. PATOGENEZA I DIJAGNOSTIKA** ..... 16

**2.7. DOKAZIVANJE LEPTOSPIRA U KLINIČKOM MATERIJALU** ..... 18

**2.7.1. Uzgajanje na hranjivim podlogama(metoda izdvajanja)** ..... 18

**2.7.2 Molekularna metoda** ..... 19

**2.7.3. Serološka metoda** ..... 20

**2.8. KLINIČKA SLIKA** ..... 21

**2.9. LIJEČENJE I PREVENCIJA LEPTOSPIROZE** ..... 22

**2.10. LEPTOSPIROZA KOD ŽIVOTINJA** ..... 23

**2.10.1. Leptospiroza divljači** ..... 24

**2.11. LEPTOSPIROZA U HRVATSKOJ** ..... 25

**3. CILJ RADA** ..... 30

**4. ANALIZA ZNANSTVENIH ISTRAŽIVANJA *LEPTOSPIRA SPP.*** ..... 30

**4.1. Turk, N., Milas, Z., Habuš, J., Štritof, Z., Mojčec, V., Modrić, Z., Starešina, V., Postic, D. (2008) : Identificiranje i tipiziranje Leptospira spp. primjenom metode raznolikosti dužine restrikcijskih fragmenata rDNK za gen 16S (RFLP) i gel elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE). *Infektološki glasnik, 28(4),* 173-182.** ..... 30

**4.2. Habuš, J., Cvetnić,Ž., Milas, Z., Štritof, Z., Balen-Topić, M., Margeletić, J., Turk, N. (2008) :Seroepidemiološko i seroepizootiološko istraživanje leptospiroze u Hrvatskoj tijekom 2007.. Infektološki glasnik, 28(4), 183-188** ..... 35

**4.3. Miklaušić, B., Pandak, N., Čabraja, I., Šiško, M. (2015): Utjecaj klimatskih elemenata na pojavnost leptospiroze u Brodsko-posavskoj županiji. Infektološki glasnik, 35(2-3), 67-73** 38

**4.4. Waggoner JJ, Balassiano I, Abeynayake J, et al. Sensitive Real-Time PCR Detection of Pathogenic Leptospira spp. and a Comparison of Nucleic Acid Amplification Methods for the Diagnosis of Leptospirosis. Lin B, ed. PLoS ONE. 2014;9(11):e112356. doi:10.1371/journal.pone.0112356.** ..... 41

**4.5. Calderaro, Adriana et al. "*Leptospira* Species and Serovars Identified by MALDI-TOF Mass Spectrometry after Database Implementation." *BMC Research Notes* 7 (2014): 330. *PMC*. Web. 13 Sept. 2016.** ..... 42

**4.6. Turk, N., Milas, Ž., Margaletic, J., Starešina, V., Slavica, A., Riquelme - Sertour, N., Bellenger, E., Baranton, G., Postic, D. : Molecular characterization of *Leptospira spp.* strains isolated from small rodents in Croatia. *Epidemiol. Infect. (2003), 130, 159–166.*** .....45

**4.7. Julien Dupouey, Benoît Faucher, Sophie Edouard, Hervé Richet ,Angeli Kodjo Michel Drancourt Bernard Davoust : Human leptospirosis: An emerging risk in Europe? *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 37(2) (2013)** .....47

**4.8. Poeppl W, Orola MJ, Herkner H, Müller M, Tobudic S, Faas A, Mooseder G, Allerberger F, Burgmann H. : High prevalence of antibodies against Leptospira spp. in male Austrian adults: a cross-sectional survey, April to June 2009 . Euro Surveill. 2013;18(25):pii=20509**.....51

**4.9. Hoffmeister, Bodo et al. "Differences in Clinical Manifestations of Imported versus Autochthonous Leptospirosis in Austria and Germany." The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 83.2 (2010): 326–335. PMC. Web. 28 Aug. 2016.** .....54

**5. RASPRAVA I ZAKLJUČAK**.....58

**6. LITERATURA**.....60

# POPIS SLIKA :

Slika 1 Ciklus leptospioze ..... 2
Slika 2 Prikaz aksijalnih niti kod roda Leptospira ..... 3
Slika 3 Apodemus agrarius -poljski miš ..... 9
Slika 4 Apodemus flavicollis- žutogrli miš ..... 10
Slika 5 Myodes glareolus-riđa voluharica ..... 12
Slika 6 Microtus arvalis -poljska voluharica ..... 13
Slika 7 Godišnja pojava leptospiroze prikazana je kao gradijent boja ..... 15
Slika 8 Leptospira interrogans otkrivena u jetrenom tkivu fotomikrografijom ..... 17
Slika 9 PCR metoda na uzorcima tkiva bubrega i urina ..... 19
Slika 10 Broj oboljelih u razdoblju 2005-2014 godine ..... 26
Slika 11 Mjesta gdje su izdvojeni pojedini sojevi ..... 31
Slika 12 Rezultati istraživanja putem serološke i genomske tipizacije ..... 34
Slika 13 Slučajevi leptospiroze tijekom 2007.godine u divljači i domaćih životinja ..... 36
Slika 14 Učestalost leptospiroze s obzirom na dob ..... 37
Slika 15 Učestalost pojave serovara L.interrogans u Brodsko-posavskoj županiji (2010. -2015.godina) ..... 39
Slika 16 Broj oboljelih i količina oborina prema godišnjim dobima u Brodskoj-posavskoj županiji (2010. - 2014.godine) ..... 40
Slika 17 Spektri 6 vrsta Leptospira dobiveni MALDI-TOF masenom spektrometrijom ..... 43
Slika 18 Polirane čelične mete koje se koriste u masenoj spektrometriji ..... 44
Slika 19 Filogenetsko stablo parcijalnih 16S rDNA sekvenci ..... 47
Slika 20 Stopa oboljelih od leptospiroze u Europi ..... 49
Slika 21 Stopa oboljelih na 100.000 stanovnika (Francuska) ..... 50
Slika 22 Rezultati testiranja na serovare Lepotospira spp. u 2009.godini ..... 53

**POPIS TABLICA :**

Tablica 1 Serološke skupine Leptospira spp.(Pérolat i sur., 1998.,Brenner i sur.,1999.). .....5
Tablica 2 Genotipsko klasificiranje leptospira .....6
Tablica 3 Prikaz značajnih serovara i njihovih rezervora/domaćina.....24
Tablica 4 Broj oboljelih/umrlih od leptospiroze u razdoblju 1998-2015.godine (HZJZ) .....27
Tablica 5 Prosječne godišnje temperature za Hrvatsku u razdoblju od 1998-2015.godine.....29
Tablica 6 Prosječna godišnja količina oborina za Hrvatsku u razdoblju od 1998-2015.godine.....29
Tablica 7 Slučajevi leptospiroze koji su liječeni u njemačkim/austrijskim kliničkim centrima.....54

**POPIS GRAFIČKIH PRIKAZA :**

Grafički prikaz 1 Odnos prosječne godišnje temperature i broja oboljelih/umrlih od leptospiroze u razdoblju 1998 -2015. godine.....27
Grafički prikaz 2 Odnos prosječne godišnje količine oborina i broja oboljelih/umrlih od leptospiroze u razdoblju 1998 -2015.godine.....28

*Zahvaljujem se prof.dr.sc. Josipu Margaletiću koji mi je pomogao pri odabiru teme, te pomoći i savjetima prilikom izrade rada.*

*Zahvaljujem se dr.sc. Marku Vucelji koji mi je pomagao ustupom podataka koji su mi bili veoma bitni za rad i koji mi je dao pokoji savjet za što bolju realizaciju ovoga rada.*

*Također zahvaljujem DHMZ-u koji mi je ustupio podatke vezane za godišnju količinu oborina i temperaturu na području Hrvatske.*

*Neizreciva hvala mojim roditeljima koji su podržali svaku moju odluku od upisa na šumarstvo pa sve do zadnjeg ispita, te koji su proživjeli svaki moj prolazak i pad .*

# 1. UVOD

Svaka zarazna bolest ili infekcija koju prirodno prenose životinje kralježnjaci na ljude i suprotno može se klasificirati kao zoonoze (WHO/PAHO,2003). Prijenosom zoonoze na čovjeka prirodni lanac infekcije završava, jer se bolest rijetko prijenosi s čovjeka na čovjeka ili natrag na životinju. U humanoj medicini bitna su dva pojma antroponoza[1] i amfiksenoza[2]. Ta dva pojma nastoje se obuhvatiti jedinstvenim pojmom zoonoze. Socijalne i demografske promjene doprinijele su da danas dosta znamo o zoonozama. Migracija životinja i globalna trgovina uzrokovale su da se zoonoze brže šire danas nego što se to prije događalo**.** Zoonoze postoje već stoljećima i opisano ih je preko 200. Uzrokovane su bakterijama, virusima, gljivicama, člankonošcima, rikecijama, praživotinjama, prionima, oblenjacima. Svake godine milijune ljudi razbole se od bakterijskih zoonoza koje se prenose hranom kao što je salmoneloza i kampilobakterija. Leptospiroza je globalno raširena zoonoza. Najveća žarišta leptospiroze nalaze se u Južnoj Americi. U Hrvatskoj nagli rast oboljelih od leptosiroze povezan je s gradacijom glodavaca, a posebno poljskih miševa.

Glodavci su rezervoari bolesti uzrokovanih:

- BAKTERIJAMA (leptospiroa,tularemija, Lymska borelioza, tuberkuloza, salmoneloza, kuga)
- VIRUSIMA I RIKECIJAMA ( HVBS, KME, bjesnoća)
- PARAZITIMA( kokcidoza, leishmanioza)
- GLJIVICAMA( dermatomikoza)
- PROTOZOAMA( sarkocistoza,amebijaza)

Kod prijenosa bolesti bitno je da patogeni uzročnik zoonoze mora imati sposobnost da u povoljnim uvjetima prenosi s životinje na čovjeka. Lagani prijelaz patogena s životinje na čovjeka, patogena čini opasnijim za čovjeka. Neke bolesti životinja imaju zoonotički potencijal[3] neke ne, ali sve zoonoze imaju za domaćina neku životinjsku vrstu. Uzročnik neke zoonoze može se prenijeti na indirektan i direktan način (inhalacija aerosola, slina, krv, feces, urin, hrana, voda, kontaminiranim predmetima, oralno, fizički kontakt, rana, putem vektora i putem

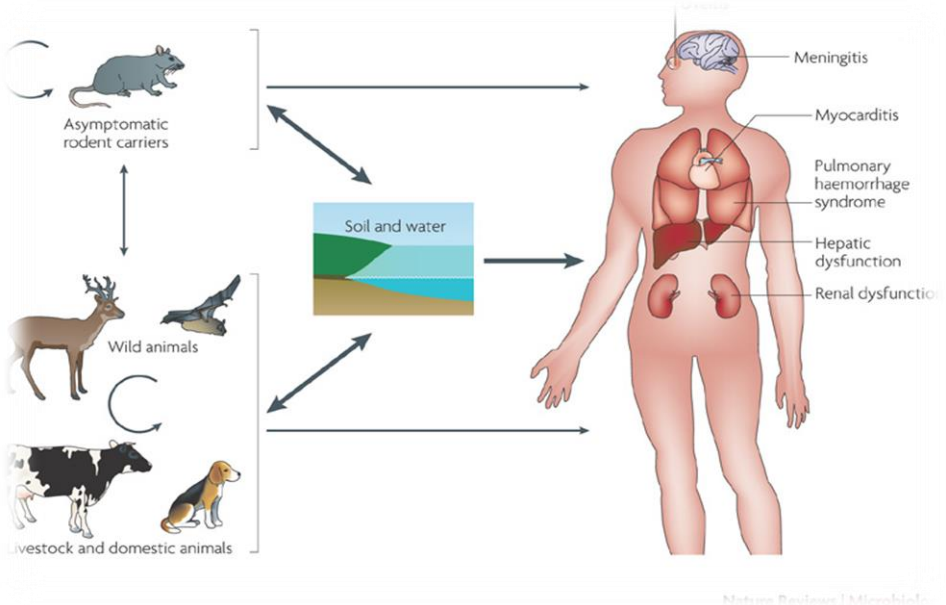
[1] ANTROPONOZA -bolest koje ljudi prenose na životinje
[2]AMFIKSENOZA- uzajamno prenošenje bolesti između ljudi i životinja
[3] ZOONOTIČKI POTENCIJAL- vjerojatnost da infekcija životinjskih kralježnjaka prenese se na čovjeka

kože) (Slika 1). Sitni glodavci su rezervoari koji služe uzročnicima bolesti da se trajno održavaju u prirodi. Oni su izvori bolesti drugim jedinkama i ljudima. Vektori (hematofagni insekti) uzročnika mogu prenijeti s mišolikih glodavaca na ljude ili životinje. Postoje geografska područja u kojima se putem svojih rezervoara trajno održavaju uzročnici zaraznih bolesti. U njima osim toga postoje vektori koji prenose uzročnika na životinje i ljude ukoliko borave na tom području. Ta geografska područja nazivamo prirodnim žarištima zarazne bolesti.

Najugroženije skupine ljudi prema WHO-u (Svjetska zdravstvena organizacija) su :

- ljudi koji rade s životinjama
- djeca i novorođenčad
- starija dobna skupina
- trudnice
- djelatnici poljoprivrednog i industrijskog sektora
- individue slabog imuniteta

Mjere zaštite od zoonoza : kontrola brojnosti glodavaca, suzbijanje glodavaca, dezinfekcija, tretiranje glodavaca posebnim lovkama, higijena ruku, izbjegavanje udisanja aerosola u prostorima u kojima su primijećeni glodavci, edukacija, korištenje repelenata i adekvatne odjeće prilikom odlaska u prirodu te pregledavanje po povratku.



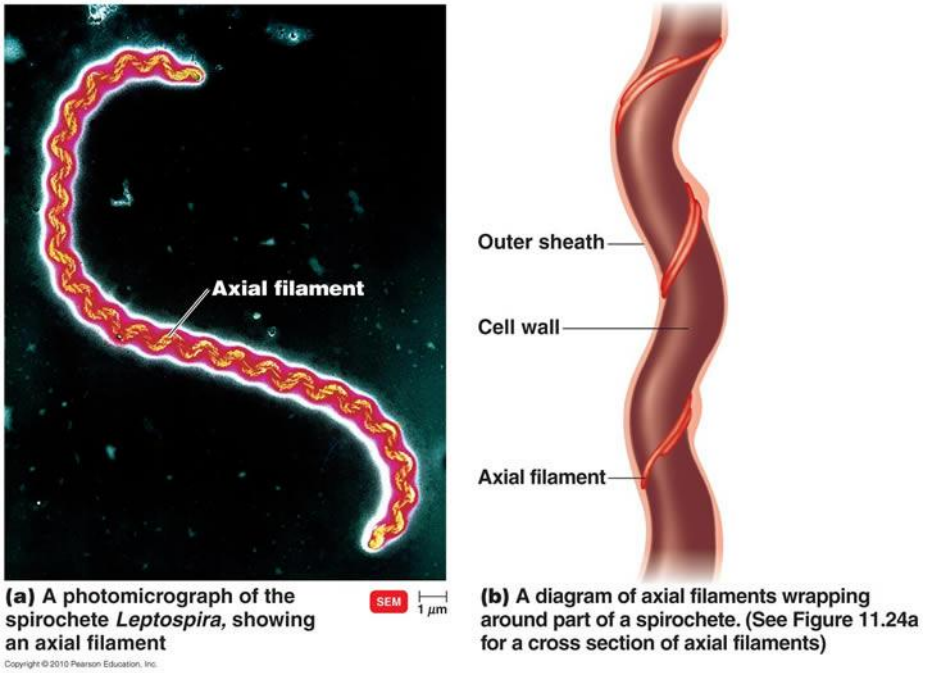

Slika 1 Ciklus leptospioze

*(Izvor: http://www.nature.com/nrmicro/journal/v7/n10/fig_tab/nrmicro2208_F2.html)*

# 2. PREDMET ISTRAŽIVANJA

## 2.1. OPIS *LEPTOSPIRA SPP*.

Porodica Spirochaetaceae objedinjuje tri roda koja su značajna za medicinu: *Treponema, Borrelia i Leptospira.* Glavna morfološka karakteristika ove porodice je upravo njen spiralni izgled. Ime roda Leptospira potječe od grčke riječi što znači tanak, te latinske riječi spira što znači spiralno. Spiralne bakterije pokreću se pomoću aksijalnih filamenata[4] (endoflagele, unutrašnja "flagela"). Između stanične stjenke i vanjske ovojnice bakterije cijelom se njezinom duljinom proteže aksijalni filament, koji joj omogućava kretanje rotirajućim pokretima. Aksijalne niti kreću od kraja stanice prema sredini, gdje se preklapaju (Slika 1). Razlika između aksijalnih filamenata i flagele je u tome, što su aksijalne niti uvijene oko stanice bakterije, a flagela se ne uvija. Upravo ova tri roda se razlikuju po broju aksijalnih filamenata. *Treponema* ima tri endoflagele, a *Leptospira* dvije. Navoji *Treponema* pravilno su raspoređeni i duži od navoja *Leptospira*.




Slika 2 Prikaz aksijalnih niti kod roda Leptospira

(Izvor : http://classes.midlandstech.edu/carterp/courses/bio225/chap04/lecture3.htm)

[4] **Aksijalni filamenti**- snop kontraktilinih vlakana kod spiroheta, koji joj omogućuju zmijoliko kretanje

Leptospire su tanke, gram-negativne[5] spiralne bakterije koje karakterizira zavinuti krajevi poput kukica. Dužina ovog mikroorganizma je 6-20 μm, te promjera 0,1-0,15 μm. Mogu se uzgojiti na podlogama koje su bogate vitaminima, masnim kiselinama i životinjskim serumima. Teško se boje prema Gramu (Woese,1987.). Uz pomoću bojenja koje se temelji na impregnaciji srebrom, možemo ih vidjeti svjetlosnim mikroskopom (Fainé i sur .,1999.). Neobojane vidljive su jedino mikroskopom s tamnim vidnim poljem. One su veoma otporne te mogu preživjeti tjedan dana u vodi naročito ako je vodeni medij alkalan. Svaki serotip leptospire ima svoj specifični lipopolisaharid koji se nalazi u vanjskoj membrani.

### 2.1.1. Struktura genoma *Leptospira spp.*

Postupkom sekvenciranja utvrđeno je da su patogene i nepatogene leptospire filogenetski vrlo slične ostalim spiralnim bakterijama (Ren i sur.,2003 i Bulach isur., 2006.). Veličina genoma patogenih vrsta leptospira je 5000 kb, te se sastoji od dva kružna kromosoma CI i CII. *Leptospira biflexa* za razliku od patogenih ima još jedan dodatni kromosom veličine 74 kb. Različite genetske analize daju nam nove spoznaje o patogenezi, fiziologiji i virulenciji leptospira. Veliki broj gena leptospira je kloniran i analiziran u svrhu novih spoznaja ( npr. gen za popravak DNA te gen za sintezu aminokiselina i sl.).

## 2.2. KLASIFIKACIJA *LEPTOSPIRA SPP.*

U taksonomiji su dva tipa klasificiranja leptospira serološki i molekularni. Ova dva tipa klasificiranja se međusobno u potpunosti ne podudaraju. Bitno je napomenut da osnovni taksoni serovar i genomska vrsta u pojedinim slučajevima nisu u istom međuodnosu. Obje vrste klasificiranja su prihvaćene od strane "Pododbora za taksonomiju bakterija iz porodice Leptospiraceae" 2011.godine. Prilikom novih istraživanja potrebno je navest rezultate prema obje klasifikacije.

Prema **serološkoj klasifikaciji** rod *Leptospira* se dijeli na 2 vrste : *Leptospira interrogans* (uključuje sve patogene sojeve) i *Leptospira biflexa* (svi nepatogeni sojevi)(Kmety i

[5] **Bojanja po Gramu** (metoda uključuje plavoljubičasti kristal-violet i crveni karbol-fuksin).Gram -pozitvne se oboje u plavoljubičasto,a gram -negativne u crveno.Gram -negativne otpornije jer imaju dvostruku membranu.

Dikken,1993). Osnovna taksonomska jedinica je serovar, dok slični serovari su grupirani u serološke skupine. Nepatogeni sojevi žive slobodnim načinom života. *Leptospira interrogans* obuhvaća 200 serotipova, dok *Leptospira biflexa* 60 serotipova. Upravo leptospiroza uzrokovana je patogenim sojevima ove bakterije. Razlike između saprofitskih i parazitskih leptospira vidljive su iz testova kao što je: patogenost prema životinjama, rast u 8-azaguaninu (225 μg/ml) pri niskoj temperaturi, konverzija u kružnu formu kod 1M natrijevog klorida. Karakteristično za patogene vrste je da minimalna temperatura za njihov rast mora biti u rasponu od 13-15 $^0$C , dok kod saprofitskih od 5-10 $^0$C. Temperatura nije uvijek pravi način determiniranja patogenih i saprofitskih vrsta jer npr. serovar Icterohaemorrhagiae može također rasti pri temperaturi 10 $^0$C. Serološki sustav klasificiranja bazira se na utvrđivanju antigenih razlika između pojedinih sojeva leptospira. CAAT metoda (eng.cross agglutination adsorption) ili unakrižna aglutinacija - apsorpcija koristi se za utvrđivanje međusobne razlike lipopolisaharida vanjske ovojnice leptospira (Dikken i Kmety,1978.). Ovaj način klasificiranja do sada je utvrdio 300 serovara leptospira koji su svrstani u 29 seroloških skupina (Tablica 1.) (Feresu i sur.;1993., Pérolat i sur.,1998., Brenner i sur.,1999., Mgode i sur.,2006.).

Tablica 1 Serološke skupine Leptospira spp.(Pérolat i sur., 1998.,Brenner i sur.,1999.).

| **Genomska vrsta leptospira** | **Serološka skupina leptospira** |
|---|---|
| *Leptospira interrogans* | Icterohaemorrhagiae,Canicola,Pomona,Australis,Autumnalis,Pyrogenes, Grippotyphosa,Djasiman,Hebdomadis,Sejroe,Bataviae,Ranarum,Louisiana,Mini, Sarmin |
| *Leptospira noguchii* | Panama,Autumnalis,Pyrogenes,Louisiana,Bataviae,Tarassovi,Australis,Shermani, Djasiman, Pomona |
| *Leptospira santarosai* | Shermani,Hebdomadis,Tarassovi,Pyrogenes,Autumnalis,Bataviae,Mini, Grippotyphosa,Sejroe, Pomona,Javanica,Sarmin,Cynopteri |
| *Leptospira meyeri* | Ranarum,Semaranga,Sejroe,Mini,Javanica |
| *Leptospira wolbachii* | Codice |
| *Leptospira biflexa* | Semaranga,Andamana |
| *Leptospira fainei* | Hurstbridge |
| *Leptospira borgpetersenii* | Javanica,Ballum,Hebdomadis,Sejroe,Tarassovi,Mini,Celledoni,Pyrogenes,Bataviae, Australis, Autumnalis |
| *Leptospira kirschneri* | Grippotyphosa,Autumnalis,Cynopteri,Hebdomadis,Australis,Pomona,Djasiman, Canicola, Icterohaemorrhagiae,Bataviae |
| *Leptospira weilii* | Celledoni,Icterohaemorrhagiae,Sarmin,Javanica,Mini,Tarassovi,Hebdomadis, Pyrogenes,Manhao,Sejroe |
| *Leptospira inadai* | Lyme,Shermani,Icterohaemorrhagiae,Tarassovi,Manhao,Canicola,Panama,Javanica |
| *Leptospira alexanderi* | Manhao,Hebdomadis,Javanica,Mini |

**Molekularni sustav klasificiranja** temelji se na stupnju genomske sličnosti između pojedinih sojeva leptospira. Genotipska klasifikacija temelji se na razlici u genomu a ne na patogenosti, stoga u istoj vrsti može biti patogen ili nepatogen. Prva genotipska klasifikacija utemeljena je na DNA-DNA hibridizacijskoj metodi (Nielsen i sur.,1989.). Osim hibridizacije za utvrđivanje razlika u genomu koristi se: ribotipiziranje (Pérolat i sur.,1990.), sekvenciranje, filogenetska analiza (Paster i sur.,1991, Slack i sur.,2006., Cerqueira i sur.,2009.) te lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (Mérien i sur., 2005., Fearnley i sur., 2007.). Prema ovoj klasifikaciji razlikujemo: patogene, nepatogene ili saprofite, te prijelazne/intermedijalne vrste, čija patogenost ovisi o samoj okolini i imunitetu domadara (Tablica 2). Na temelju molekularne analize 1999. godine definirane su vrste *L.broomii, L.licerasiae i Leptospira genomospecies 1,3,4 i 5* (Brenner i sur.,1999; Levett i Haake,2009). Kasnije *L.genomospecies 1,2,4, i 5* imenovane su u nazive koje danas znamo (Tablica 2.)

Tablica 2 Genotipsko klasificiranje leptospira

| Patogene vrste leptospira | Prijelazne vrste leptospira | Saprofitske vrste leptospira |
|---|---|---|
| *L.interrogans* | *L. inadai* | *L.biflexa* |
| *L.kirschneri* | *L.broomii* | *L.wolbachii* |
| *L.borgpetersenii* | *L.fainei* | *L.meyeri* |
| *L.santarosai* | *L.wolffii* | *L.genomospecies 3** |
| *L.noguchii* | *L.licerasiae* | *L.genomospecies 4** |
| *L.weilii* | | *L.genomospecies 5** |
| *L.alexanderi* | | |
| *L.genomospecies 1 ** | | |
| *L.kmetyi* | | |

**L.genomospecies 1= L. alstonii sp.nov.*
**L.genomospecies 3 =L.vanthielii sp.nov.*
**L.genomospecies 4 = L.terpstrae sp.nov.*
**L.genomospecies 5 =L.yanagawae sp.nov.*

## 2.3. POVIJEST LEPTOSPIROZE

Leptospiroza se spominje puno ranije nego što je uspostavljen i izoliran njen uzročnik. Simptomi današnje leptospiroze odgovaraju simptomima bolesti koja se pojavila među beračima riže u drevnoj Kini. Njemački liječnik Adolf Weil prvi je opisao 1886. godine simptome zarazne bolesti za koju nije znao uzročnika. Bolest je uzrokovala žuticu, zatajenje bubrega i otjecanje slezene (Weil, 1886.). Danas teži oblik leptospiroze nosi naziv po njemu (Weil-ov sindrom). U preparatu tkiva bubrega pacijenta koji je umro od Weil-ove bolesti Stimson 1907. godine uočio je mikroorganizam kojeg je opisao kao bakteriju sa zavinutim krajevima (Stimson,1907). Stimson je ovu bakteriju nazvao *Spirochaeta interrogans*. Inada i Ido 1915. godine u Japanu uzorkovali su krv nakon što je nekolicina japanskih vojnika oboljelo od žutice. U uzorkovanoj krvi pronašli su mikroorganizam kojeg su nazvali *Spirocheta icterohaemorrhagiae* (Inada i sur. 1915 i Inada i Ido 1915). U svojim daljnjim istraživanjima Inada i suradnici su uzgojili, opisali uzročnika, otkrili načine infekcije i širenja leptospiroze. Nagađa se da je serovar Icterohaemorrhagiae unesen u zapadnu Europu iz Euroazije u 18. stoljeću sa zapadnom migracijom sivog štakora (*Ratus norvegicus*) (Alston i Broom, 1958). Uloga štakora u širenju infekcije kod ljudi otkriven je 1917. godine (Klarenbeek, Schüffner, 1933). Od 1934-1960. godine prijavljeno je niz infekcija diljem europskih farmi: Nizozemska, Francuska, Švicarska, Italija, Bugarska, Mađarska. U to vrijeme leptospiroza je predstavljala veliki ekonomski i higijenski problem (FAO/WHO/OIE, 1980). Zaražene svinje u Mađarskoj, Bugarskoj i Italiji u tom razdoblju bile su zaražene serotipovima Pomona i Tarassovi. Povijesni izvori navode da simptomi zatajenja bubrega, žutice pojavili su se među Indijancima 1620. godine. Takva zarazna bolest bila je pogubna za veći dio populacije i izazvala je veliku smrtnost među Indijancima. Smatra se da glavni krivci za veliku smrtnost Indijanaca bili su upravo Europljani koji su u svojim brodovima transportirali zaražene glodavce. Glodavci su svojim urinom kontaminirali zemlju, vodu, i hranu Indijanaca. Simptomi bolesti su zabilježeni također u Prvom i Drugom Svjetskom ratu. U Hrvatskoj leptospiroza je opisana po prvi puta u pasa 1926.godine (Babić,1927.), a kod čovjeka 1935.godine (Antunović i Mikačić,1935.).

## 2.4. REZERVOARI *LEPTOSPIRA INTERROGANS*

Životinje koje su izliječene od leptospiroze kao i bolesne su značajan izvor zaraze za čovjeka ali i za druge životinje. One u urinu bilo zaražene ili zdrave nedugo nakon ozdravljenja sadrže leptospire. Izbacivanjem urina kontaminiraju tlo, vodu, predmete i sl. Na taj način su potencijalno opasne za čovjeka. Miševi doživotno izlučuju leptospire urinom[6], pa ih možemo nazvati rezervoarima.

Česti domaćini (rezervoari) leptospira :

- *Apodemus agrarius*-poljski miš
- *Apodemus flavicollis* -žutogrli miš
- *Mus musculus* - kućni miš
- *Myodes glareolus* -šumska voluharica
- *Microtus arvalis*-poljska voluharica
- *Crocidura sp.* -poljska rovka

**Osnovne karakteristike rezervoara *Leptospire interrogans*:**

*Apodemus agrarius* (Pallas, 1771.) - poljski miš, prugasti poljski miš, prugasti miš

- **Areal rasprostiranja** : istočni dio srednje Europe i istočna Europa, južni i središnji Sibir. Visinski dolazi do 1800 m.

- **Morfološka obilježja:** Prepoznatljiv je po crnoj prugi na sredini leđa koja je 2-3 mm široka. Tijelo mu je do 123 mm dugačko, a rep do 89 mm dugačak (2/3 trupa). Dlaka na leđima mu je žuto-smeđa do tamno crveno smeđa. Donja strana sivo- bijela. Rep mu je dvobojan. Vanjska dlaka mu je rjeđa i kraća nego kod ostalih europski *Apodemus* (vrsta). Od ostalih *Apodemus* (vrsta ) razlikuje se relativno malom glavom, te kratkom i tankom njuškom.

[6] LEPTOSPIRURIJA-izlučivanje leptospira mokraćom

- **Razmnožavanje:** Spolno zreli sa 8 tjedana. Gravidnost i osamostaljenje mladunaca traje 18-21 tjedan. Poljski miš ima najveću stopu prirasta, ali najkraću sezonu parenja. Pare se od travnja do rujna (na južnom djelu areala traje do listopada), a kasnije tek povremeno. Maksimalna starost kod životinja u prirodi 18 mjeseci, dok u laboratoriju 4 i po godine.

- **Prehrana :** Hrani se biljnom hranom i hranom životinjskog podrijetla. Biljna se sastoji od voćki i sjemenja. Od životinjske hrane voli mekušce, kolutićavce, žabe, male kralježnjake, kukce.

- **Nastambe i ponašanje :**
  Za razliku od ostalih *Apodemus* vrsta rijetko nastanjuje nadzemna skrovišta. Poljski miš kopa hodnike, a ponekad ih spaja s hodnicima drugih sitnih sisavaca. Dnevne su životinje te komuniciraju zvučnim signalima, žljezdanim izlučevinama.



Slika 3 *Apodemus agrarius* -poljski miš

*(http://www.megapixel.cz/foto/87910)*

*Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834.) - žutovrati šumski miš, žutogrli miš, veliki šumski miš

- **Areal rasprostiranja** : Rasprostire se od Velike Britanije, kroz veći dio Europe do Urala. Visinski se rasprostire do 2000 m n.v. Voli bukove i hrastove šume bez ili s vrlo malo prizemnog rašća(šikare, čistine, obronci).

- **Morfološka obilježja :**Na grlu ima žutu poprečnu ili okruglu mrlju koja ga čini različitim od svoje vrste. Ima intenzivnu bijelu boju na trbušnoj strani i izraženo smeđe obojano krzno na leđnoj strani s jasno istaknutom granicom na bočnim stranama. Rep mu je dulji od trupa (tijelo 105 mm, rep 109 mm).



*Slika 4 Apodemus flavicollis- žutogrli miš*

(Izvor : http://www.kul.pl/gal_11655.html)

- **Razmnožavanje:** Parenje počinje od veljače pa do listopada**.** Ima 2-3 legla godišnje. Ženka je gravidna 24-25 dana (broj mladi 4-9). Prosječno živi 18 mjeseci. Gradacija svake 3 godine ovisno o urodu sjemena, prirodnim neprijateljima te okolišu.

- **Prehrana:** Hrani se s hranom životinjskog( pauci, kukuljice leptira, stonoge, mekušci muhe, uši, puževi i sl.), i biljnog podrijetla (žirove i sjeme ostalih vrsta). Spremaju hranu u spremišta ili u napuštene prohode krtica, šupljine drveća, ispod kamena i sl.

- **Ponašanje :** Prilično su agresivna vrsta. Aktivni su 1-2 sata nakon sumraka.

*Myodes glareolus* (Schreber, 1780.) - šumska voluharica, riđa voluharica

- **Areal rasprostiranja** : Rasprostire se većim dijelom Europe, visinski do 2400m. Obitava u bjelogoričnim i crnogoričnim šumama, u sloju prizemnog rašća, na rubovima šuma, močvarama, grmlju, parkovima, i sl.

- **Morfološka obilježja** :Krzno mu je crvenkasto na leđima, bokovi su mu smećkasti, trbuh bjelkast, rep jasno dvobojan, noge bijele do sive boje. Šumska voluharica je najdugorepija voluharica od svih europskih voluharica(rep: 37-72 mm). Tijelo joj je dugačko 80-135 mm.

- **Razmnožavanje** : Sezona razmnožavanja od veljače do listopada. Ženke su spolno zrele sa 2 mjeseca, a gravidne su 16-35 dana. Broj legla godišnje 2-3(max).

- **Prehrana** : Prehrana šumske voluharice sadrži zelene dijelove biljaka, sjemenke ali i insekte, gljive, mahovine, kora. Razlikujemo prehranu u jesen/zima, te prehranu u proljeće/ljeto. U jesen i zimu hrani se sjemenjem, dok u ljeto i proljeće zelenim dijelovima biljke te životinjskom hranom. Od listopada do travnja hrani se korom drveća. Stvara štete na jasenu, topoli, vrbi, lužnjaku , bukvi ,boru i sl.

- **Nastamba i ponašanje**: Kopa podzemna skloništa koja su samo par cm ispod tla. Skloništa se sastoje od prostranog gnijezda, proširenja, slijepih prolaza. Dnevna je životinja.



Slika 5 *Myodes glareolus*-riđa voluharica

(Izvor : http://www.flickriver.com/photos/asbimages-/popular-interesting/)

*Microtus arvalis* (Pallas, 1779.) - poljska voluharica, obična poljska voluharica, mali voluhar

- **Areal rasprostiranja :** Obitava na povišenim terenima, otvorenim područjima, poljima, livadama ,rubovima šume, voćnjacima, vinogradima i rasadnicima. Ne voli prevlažne travnjake sa višom vegetacijom. Visinska rasprostranjenost do 3000 m n.v. Više im odgovaraju nagnuti tereni od ravnijih jer su na njima u proljeće manje izloženi oborinskim i ocjednim vodama.

- **Morfološka obilježja:** Na leđima je tamno siv, smeđa do žutosiva ali bez crvenkastim tonova. Uši su mu neprimjetne i zaokružene. Unutrašnja ušna resica kraća nego kod livadne voluharice

- **Razmnožavanje :** Nakon 11-13 dana od okota mogu biti sposobne za razmnožavanje. Ženka je gravidna 19-21 dan (broj legala 4). Razmnožavanje od ožujka do listopada. Gradacija 3-4 godine, a masovna pojava svakih 10-11 godina.
- **Prehrana:** Hrani se: sočnim biljkama, klicama, korijenjem, korom, sjemenjem, gomoljima, mahovinom. Osim biljne hrane uzima i hranu životinjskog podrijetla (kukci). Oštećuje najviše mlade biljke upravo zbog toga što voli sočniju hranu(mladi

jasen, hrast, javor, bor, smreku itd.). Koru glođe ukoliko dođe do jako oštrih zima. Ljeti se najviše zadržava na poljoprivrednim zemljištima gdje i radi najveće štete. U jesen napušta poljoprivredne površine i migrira u šumske ekosustave.

- **Nastamba i ponašanje:** Voli zakorovljene i neuređene terene. Kopa podzemne hodnike ( 20 cm dubine ) i tamo se gnijezdi. Poljska voluharica zimi je najviše aktivna noću, dok ljeti danju.



*Slika 6 Microtus arvalis* -poljska voluharica

*(* Izvor *: http://www.natgeocreative.com/photography/1301995)*

*Crocidura sp*. -poljska rovka

Poljska rovka je mali sisavac srodnik ježeva i krtica. Tijelo mu je pokriveno smeđom dlakom. Aktivna je noću. Ima kratke nožice koje su prilagođene za kopanje tunela, ali također koristi tunele koje iskopaju miševi i voluharice. Hrani se kukcima, povremeno glistama ili gujavicama. Njuška mu je izdužena, rep slabo obrastao te ima male oči.



Slika 7 *Crocidura suaveolens* - poljska rovka

(Izvor : http://www.pbase.com/milv/image/91750483)

## 2.5 PRIRODNA ŽARIŠTA LEPTOSPIROZE

Prirodna žarišta leptospiroze to su područja koja svojim povoljnim edafskim, klimatskim i hidrološkim prilikama odgovaraju pojavi leptospiroze. Na njenu pojavu naravno utječe očuvanost prirodnih staništa rezervoara i čimbenika koji pogoduju održavanju određenih serovara leptospira i širenju infekcije. Leptospiroza je bolest prirodno-žarišnog tipa kod koje su se osnovne patobiocenoze formirale prije nego što je čovjek poremetio ravnotežu mijenjajući stanišne uvijete. Suživot glodavaca i serovara leptospira veoma je bitan u ciklusu održavanja leptospira. Topla i vlažna staništa posebno odgovaraju leptospirama.

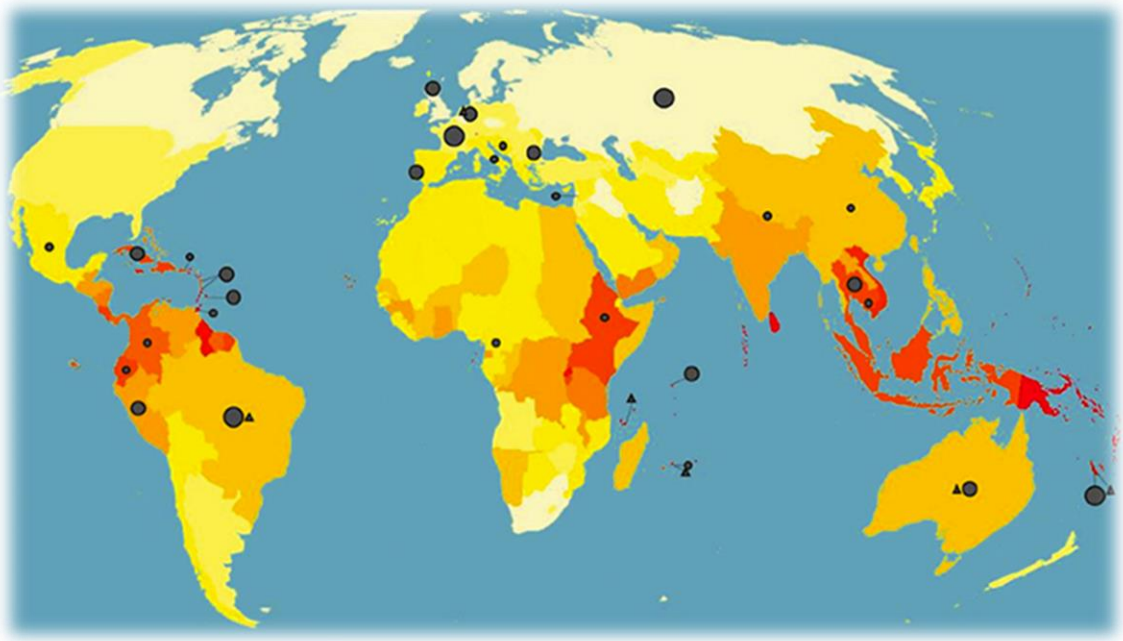
Tako možemo razlikovati tri tipa žarišta:

1. Stara (arhaična) žarišta : žarišta koja su nastala bez čovjekovog utjecaja, a vezana su uz divlje životinje (glodavci)

2. Sinantropna žarišta : u osnovi razvila su se iz arhaičnih jer su životinje zbog prehrane preselile se iz svojih staništa u blizinu čovjeka ili uz njegove nastambe

3. Antropourgična žarišta: žarišta nastala isključivo pod utjecajem čovjeka. Nastala su uzgajanjem domaćih životinja, ali i kućnih ljubimaca. Čovjek je s time omogućio prijenos zarazne bolesti

Topla i vlažna klima pogoduju duljem preživljavanju leptospira u prirodi. Epidemija leptospiroze povezana je s jakim kišama i poplavama. Leptospiroza je najčešća u zemljama tropskog pojasa posebice zemljama u razvoju. Također česta je u zemljama umjerene klime gdje se pojavljuje kao sezonska bolest vezana za proljeće i jesen.



Slika 7 Godišnja pojava leptospiroze prikazana je kao gradijent boja

(Izvor : http://news.yale.edu/2015/09/17/global-burden-leptospirosis-greater-thought-and-growing)

## 2.6. PATOGENEZA I DIJAGNOSTIKA

Patogeneza dolazi od grčke riječi pathos (bolest) i genesis (razvoj). Možemo je definirati kao proces nastajanja bolesti. Odvija se kroz tri faze : infekcija, inkubacija i pojava simptoma. Mehanizam patogeneze leptospira nije još uvijek dobro istražen niti razjašnjen, zbog sposobnosti leptospira da se prilagode uvjetima okoline u kojoj se nalaze. Prema dosadašnjim istraživanjima dokazana je razlika u proteinima leptospira koje se uzgajaju in vivo i in vitro uvjetima (Nally i sur.,2001.). Upravo ovo je razlog slabog razumijevanja patogeneze.

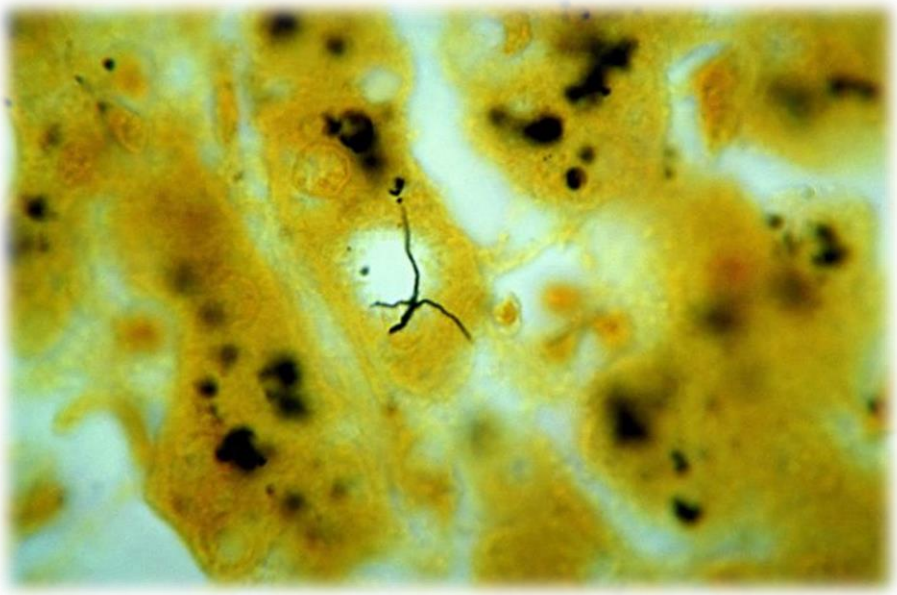
Sposobnost leptospira da izazovu bolest (virulencija) ovisit će o nizu čimbenika:

1. sposobnosti prianjanja
2. pokretljivosti
3. površinskim proteinima
4. tvorbi toksina

Leptospira obično ulazi u tijelo čovjeka preko posjekotina, ranica, ogrebotina ponekad i putem sluznice (usna šupljina, nos, oči). Uz sitne glodavce rezervoari leptospira mogu biti različite životinje: svinje, konji, psi, lisice, jeleni, divlje svinje i sl. Rezervoari svojim urinom izlučuju leptospire te na taj način kontaminiraju tlo, vodu, hranu. Čovjek se zarazi direktnim kontaktom(urinom ili tkivom zaražene životinje) ili indirektnim kontaktom(putem vode stajačice koja je kontaminirana urinom). Također čovjek koji konzumira vodu i hranu koja je kontaminirana također se može zaraziti. Kod patogenosti ključan je odnos domaćin-serovar. Neki serovari su više patogeni za pojedine domaćine, a za neke manje.

Prvi stadij infekcije je prianjanje leptospira na stanicu domaćina, preko oštećene kože ili sluznice. Prianjanje i prodiranje omogućavaju vezujući proteini(fibronektin) koji se nalaze na površini patogena. Osim prianjanja bitan je i čimbenik pokretljivosti. On iznimno bitan u početnoj fazi infekcije. Pomoću kemotaksije patogene leptospire imaju sposobnost kretanja prema hemoglobinu. Ulaskom leptospira u krv započinje faza leptospiremija (bakterijemija). Krv kao medij (pH 7,2-7,4) posebno pogoduje umnožavanju leptospira. Inkubacija kod leptospiroze je promjenjiva. Može trajati u okviru od 4-20 dana. Leptospire putem krvi cirkuliraju kroz bubrege, jetru, pluća (Slika 9). Tokom razdoblja bakterijemije (prisustvo bakterija u krvi) i kolonizacije tkiva pojavljuju se prvi znakovi akutne leptospiroze koji se razlikuju po serovaru i domaćinu. U ovom razdoblju započinje proizvodnja aglutinirajućih

protutijela (Fainé i sur., 1999.). Kako raste količina protutijela tako leptospire pomalo nestaju iz cirkulacije, te se skladište u proksimalne bubrežne kanaliće gdje protutijela nema. Leptospire se mogu izolirat iz urina, krvi, i cerebrospinalne tekućine za vrijeme prve faze bolesti. Kada završi faza leptospiremije, odnosno kada se leptospire počinju zadržavati u bubrezima započinje faza povremenog ili stalnog izlučivanja leptospira urinom (leptospirurija). Leptospire u domaćinu mogu izazvat ozbiljna oštećenja. Tijekom stvaranja antitijela tj.imunosnih rekacija dolazi do oslobađanja strukturnih dijelova leptospira koji uzrokuju proizvodnju upalnih citokina, te pomoću njih dolazi do upale i oštećenja određenog organa. Osim toga može doći do oštećenja krvnih žila. Oštećenjem krvnih žila dolazi do smanjenja protoka krvi kroz organe. Kao posljedice ishemije može se pojaviti: nekroze bubrežnih kanalića, oštećenja jetre i pluća, oštećenje posteljice, upale moždane ovojnice, upala središnjeg živčanog sustava i sl. Zbog toga možemo reći da leptospiroza kao bolest se može veoma zakomplicirati. Građa lipopolisaharida leptospira(odnosno serovaru) je ključna kod leptospiroze. Lipopolisaharidi će utjecati na tijek i ishod bolesti. Humoralni odgovor je veoma bitan kod obrane od leptospira. On se zasniva na stvaranju specifičnih antitijela protiv određenog antigena, odnosno specifičnih lipopolisaharida vanjske ovojnice leptospira. Pošto su simptomi slični drugim infekcijama (hepatitisu, gripi, virusnom meningoencefalitisu, infekcijama uzrokovane spiralnim bakterijama) bolesniku treba učiniti : test hemokulture, serološko testiranje s razmakom 3-4 tjedna, jetrene probe, biokemijske pretrage i kompletnu pretragu krvne slike.



Slika 8 *Leptospira interrogans* otkrivena u jetrenom tkivu fotomikrografijom

*(Izvor: http://www.public-domain-image.com/free-images/science)*

## 2.7. DOKAZIVANJE LEPTOSPIRA U KLINIČKOM MATERIJALU

### 2.7.1. Uzgajanje na hranjivim podlogama(metoda izdvajanja)

Materijal se mora obvezno uzrokovat prije početka antibiotske terapije. Kao što je prethodno rečeno leptospire se mogu izdvojiti iz krvi u početnoj fazi ili septikemijskoj fazi bolesti. Uzima se što manja količina krvi (jedna kap krvi u 5-10 ml hranjive podloge). Iz urina se mogu izdvojiti nakon 7-10 dana bolesti. Kiseli pH iz urina treba neutralizirat s $CaCO_3$, te ga centrifugirati kako bi se leptospire koncentrirale. Nakon centrifuge dobije se sediment koji se nacijepi na hranjivu podlogu. Da ne bi došlo do kontaminacije podloge s ostalim bakterijama koje se nalaze u urinu uz sediment dodaje se fluorouracil koji to sprječava. Hranidbena podloga se provjerava svaki tjedan (rast može trajat i do 13 tjedana).

Leptospire se mogu uzgojiti na sljedećim hranjivim podlogama :

- Fletcher-ova hranidbena podloga (polutekuća hranidbena podloga)
- Ellinghausen, McCullough, Johnson, Harrisova hranidbena podloga (EMJH) – tekuća hranidbena podloga
- Korthof-ova hranidbena podloga

Serumski albumin (goveđi-"Tween 80" ili kunićji) koristi se za obogaćivanje hranjive podloge, jer ima puferski kapacitet, detoksikacijski efekt te povećava adheziju uzoraka. Optimalna temperatura za rast i razmnožavanje leptospira je 28-30 $^0$C, dok optimalna pH vrijednost 7,2 do 7,6. Kao svakom živom organizmu leptospirama za rast neophodni su biogeni elementi (makroelementi i mikroelementi) : ugljik, dušik, kalcij, magnezij, željezo. Osim biogenih elemenata potrebni su im vitamini B1 i B12. Kao osnovni izvor ugljika koriste masne kiseline dugih lanaca, a kao izvor dušika koriste amonijeve soli. Leptospire ne mogu apsorbirati ugljikohidrate i aminokiseline, pa zbog toga koriste masne kiseline i amonijeve soli kao izvore dušika i ugljika (Baseman i Cox, 1969.). Osnovna razlike između saprofitskih i parazitskih leptospira upravo je u njihovom metabolizmu i uvjetima rasta. Kao što je već navedeno minimalna temperatura rasta patogenih leptospira je 13-15 $^0$C, dok saprofitskih 5 -10 $^0$C. Osim razlike u rastu bitna razlika je i u metabolizmu saprofitskih i parazitskih leptospira. Parazitske leptospire mogu samo sintetizirat purinske baze, dok saprofitske purinske i pirimidinske baze. Ovo su osnovne činjenice koje trebamo znati prilikom uzgoja leptospira na hranjivim podlogama.

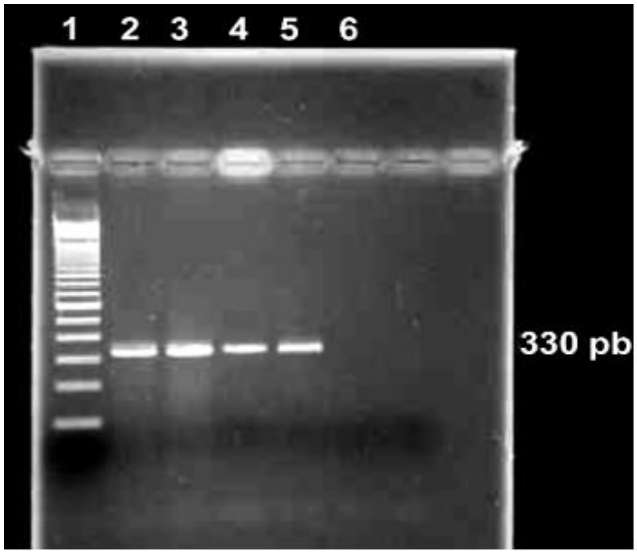
### 2.7.2 Molekularna metoda

Za razliku od prethodne metode ovom metodom leptospire se mogu dokazat i nakon uzimanja antibiotika.

Postoje 2 metode :

- dokazivanje specifične sekvence njihove DNK lančanom reakcijom polimeraze ( Polymerase chain reaction- PCR)
- lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu ( Real Time PCR).

Pod PCR-om podrazumijevamo umnožavanje kratkog dijela DNK u veliki broj identičnih kopija. PCR metoda temelji se na dokazivanju prisutnosti DNK leptospira u uzorku. (Brown i sur., 1995., Merien i sur., 1995., Levett i sur., 2005., Slack i sur., 2006.). Prisutnost se dokazuje u urinu, krvi, likvoru ili uzorcima tkiva. Lančana reakcija polimeraze odvija se u posebnom uređaju koji automatski kontrolira promjene temperature tokom amplifikacije (umnožavanja jedne kratke DNK sekvence). Uređaj hladi i zagrijava epruvete s time i smjesu u njoj. Kod PCR metode potreban je mali broj bakterija u uzorku. Kod molekularnog dijagnosticiranja koristimo početnice za leptospire kojima se ne umnožava DNK ostalih bakterija. Upravo zbog toga kontaminiranost uzorka (s drugim bakterijama) manje utječe na molekularnu metodu, nego na metodu uzgajanja na hranjivoj podlozi (izdvajanje). Ova metoda je veoma brza, dostupna i može se veoma lako specificirat uzročnik. Negativna odlika ove metode je da ovom metodom nije moguće odredit infektivni serovar što je veoma bitno.




Slika 9 PCR metoda na uzorcima tkiva bubrega i urina

(*Izvor:http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822003000200010)*

### 2.7.3. Serološka metoda

Serološka metoda se najviše upotrebljava kod dijagnosticiranja leptospira u uzorku. Metoda se temelji na dokazivanju antitijela u krvi. Antitijela se mogu dokazati između petog i sedmog dana bolesti. Osnovna serološka metoda je mikroskopski aglutinacijski test (MAT). MAT se temelji na dokazivanju aglutinacijskih antitijela u serumu (IgM i IgG antitijela). Postoji kvantitativni i kvalitativni dio testa. Kvantitativnim dijelom testa određuje se titar protutijela za svaki pojedinačni antigen u panelu antigena. Samo jedan serovar ili više njih može predstavljat istu serološku skupinu u panelu antigena. Ujedno panel se sastoji od referentnih sojeva, različitih serovara leptospira. Rezultate dobivene MAT metodom očitavamo pomoću mikroskopa s tamnim poljem. Da bi serum bio pozitivan u njemu mora biti više od 50% leptospira. S MAT metodom možemo odrediti infektivni serovar za razliku od prethodnih metoda. Nedostatak ove metode je njena subjektivnost, zahtjevnost, te nemogućnost razlikovanja rezidualnog titra od titra koji nastaje u infekciji.

Osim MAT metode u serološke metode spadaju:

- imunoenzimni test,
- reakcija vezanja komplemenata,
- neizravna inhibicija hemaglutinacija i sl.

Na imunoenzimskom (ELISA) ili lateks - aglutinacijskom (makroskopskoj) testu temelje se brzi dijagnostički testovi. Putem imunoenzimskog testa može se utvrditi prisutnost IgM antitijela za lipopolisaharide vanjske ovojnice leptospira (Abdoel i sur., 2011.). Veliki problem ovih testova je njihova visoka cijena i nemogućnost identifikacije infektivnog serovara. Danas znanstvena istraživanja usmjerena su k razvoju ELISA testova za otkrivanje IgG antitijela s rekombinantnim vanjsko - membranskim proteinima LipL32 i Loa 22 (Chalayon i sur., 2011.). Lateks -aglutinacija ima sposobnost otkrivanja IgM i IgG antitijela u serumu.

## 2.8.KLINIČKA SLIKA

Leptospiroza se može pojaviti u lakšem i težem obliku. Inkubacija leptospiroze 2-20 (obično 7-13) dana.

Bolest ima 2 karakteristične faze:

Leptospiremija nastupa u **prvoj faza** i nastupa naglo. Popraćena je glavoboljom, jakim bolovima u mišićima, visokom temperaturom i zimicom. Nakon 3-4 dana pojavljuju se subkonjuktivna krvarenja. Heptomegalija i splenomegalija (povećana jetra i slezena) nisu česte. Prva faza traje 4-9 dana s zimicama i temperaturom koja raste preko $39^0$ C. Nakon toga slijedi normalizacija tjelesne temperature. **Druga faza** naziva se imunološka faza a pojavljuje se između 6 i 12 dana bolesti. U ovoj fazi pojavljuju se serumska protutijela. Opet se pojavljuje temperatura i ostali simptomi prve faze bolesti. Uz to može se razviti meningitis, dok optički neuritis, iridociklitis (upala šarenice i cilijarnog tijela) i periferna neuropatija (oštećenje perifernih živaca) se rijetko pojavljuju. Leptospiroza je jako opasna za trudnice jer može uzrokovat pobačaj. Prethodni simptomi su znakovi lakšeg oboljenja.

**Teži oblik ili ikterična leptospiroza** dobila je naziv po njemačkom liječniku Adolfu Weil-u koji je 1886. godine prvi puta opisao ovu bolest. Ikteričnu leptospirozu prati žutica nastala zbog intravaskularne hemolize (razaranje eritrocita unutar krvožilnog sustava). Osim žutice pojavljuje se uremija, anemija, vrućica i poremećaj svijesti. Početak Weil-ovog sindroma sličan je lakšem tipu leptospiroze. Ali zbog razaranja kapilara pojavljuje se krvarenje iz nosa (epistaksa), petehije (potkožno krvarenje u obliku okruglih pjega), purpura (upala malih kapilara), ekhimoza (krvni podlijevi). Bolest također može biti popraćena s vrlo niskom razinom trombocita u krvi, pa se javlja problem zgrušavanja krvi (trombocitopenija). Oštećenje bubrega i jetre vidljivo je od 3-6 dana. Oštećenje jetre je minimalno ali oštećenje bubrega uključuje uremiju (povišenje koncentracije ureje u krvi), piuriju (prisutnost leukocita u urinu ), proteinurija (izbacivanje bjelančevina preko urina). **Bilirubin** je glavni produkt raspada crvenih krvnih zrnaca. Jetra je zaslužna za razgrađivanje bilirubina, te se on razgradnjom pretvara u žuč (bilijarni trakt -žučni mjehur-tanko crijevo). Povećana razgradnja crvenih krvnih zrnaca (eritrocita) uzrokuje povećanje bilirubina. Povećanje bilirubina dolazi do njegovog brzog kretanja što naravno jetra ne može podnijeti, te dolazi do razaranja stanica jetre. Kod lakšeg oboljenja smrtnost ne postoji dok u ikteričnim smrtnost se kreće od 5-10 %. Smrtnost ovisi o životnoj dobi (> 60 godina = veća smrtnost).

## 2.9. LIJEČENJE I PREVENCIJA LEPTOSPIROZE

**LJEČENJE :** Oboljelima od leptospiroze propisuje se strogo mirovanje do nestanka groznice. Ukoliko dođe do zatajenja bubrega i jetre isključuje se normalno hranjenje, a uvodi se intravenozna prehrana. Kada se stanje bubrega i jetre normalizira pristupa se uvođenju normalne prehrane. Antibiotici su jedino učinkoviti ako se primjene u početku bolesti. Djeluju na uklanjanje leptospira iz krvi. Jedino streptomicin i doksiciklin mogu ukloniti leptospire iz bubrega . Za ikterični oblik leptospiroze koristi se penicilin ili ampicilin. U srednje teškim oboljenjima amoksicilin, doksiciklin ili ampicilin.

**PREVENCIJA LEPTOSPIROZE :**

Prevencija leptospiroze je izuzetno važna. Ona obuhvaća :

- deratizaciju
- utvrđivanje zaraženih voda i terena
- kloriranje vode za piće
- zaštita vode i hrane od kontakata sa zaraženim životinjama
- higijena pranja ruku
- higijena kućnih ljubimaca
- nošenje zaštitne odjeće i obuće prilikom provođenja vremena u prirodi
- pokrivanje posjekotina i ogrebotina prije kontakta sa zemljom, vodom blatom koji bi mogli biti kontaminirani
- izbjegavanje kupanja u rijekama i potocima gdje se kupa stoka
- cijepljenje životinja

## 2.10. LEPTOSPIROZA KOD ŽIVOTINJA

S obzirom na odnos između uzročnika bolesti i životinje, životinje se dijele na :

- rezervoare bolesti
- slučajne domaćine
- evolucijske domaćine

Kod rezervoara nakon infekcije najčešće ne dolazi do razvoja bolesti ili je bolest blažeg oblika. Leptospire kod rezervoara trajno naseljavaju bubrežne kanaliće, i one postaju kliconoše (Faine i sur., 1999). Upravo najznačajniji rezervoari su mišoliki glodavci. Evolucijski domaćini imaju blage simptome bolesti, jer prilagodba određenog serovara nije završena za tu životinju. Pa tako u evolucijske domaćine spadaju: goveda (Hardjo i Pomona), svinja ( Pomona, Tarassovi, Bratislava), konji (Bratislava) i sl. Dali će životinja biti slučajan ili evolucijski domaćin sve ovisi o pojedinom serovaru leptospire (Tablica 3). Različiti serovari se prilagođavaju infekciji i suživotu s određenim životinjama, koje postaju kasnije njihove kliconoše. Životinje mogu biti primarni domaćini leptospira. Bolest kod primarnih domaćina razvija se kao kronična, a s time životinja postaje kliconoša.

Kod pasa bolest je javlja 7-20 dana nakon zaraze, te je tijek bolesti veoma brz. Bolesni psi ne jedu ili veoma slabo jedu, povučeni su, povraćaju, mirni su. U početku bolesti mogu imat zatvor, dok kasnije se pojavljuje proljev. Također kao i ljudi imaju visoku temperaturu i žuticu. Leptospire se naseljavaju u bubrezima te izazivaju kroničnu upalu bubrega.

Kod svinja leptospiroza očituje se kao opća akutna sepsa popraćena s žuticom. U prasadi i mladih svinja simptomi su vidljivi, dok kod starijih svinja uglavnom je neprimjetna. Svinje se veoma lako oporave. Leptospiroza kod svinja može uzrokovat pobačaj, ali ako ne dođe do njega mladunčad nedugo nakon prasenja ugiba.

Također u mačaka leptospiroza je slabo primjetna, ali ukoliko dođe do jače infekcije može doći do ozbiljnih problema s bubrezima ( jake upale). U konja je jako česta leptospiroza. Simptomi su isti kao i kod ostalih životinja. Konji često dobiju jaku upalu očiju koja može potrajat, a oporavak može trajati i do dvije godine. Naposljetku zbog jake upale konj može trajno izgubiti vid. Leptospiroza kod goveda uzrokuje: pobačaj, žuticu, krvavu mokraću, upala bubrega i

vimena te prestanak produkcije mlijeka. Starija goveda su otpornija od teladi, dok telad teže obolijeva.

Tablica 3 Prikaz značajnih serovara i njihovih rezervora/domaćina

| Serovar (*L.interrogans*) | Primarni rezervoari Domaćini (evolucijski) | Ostali domaćini (slučajni) |
|---|---|---|
| Bratislava | svinja,štakor,žutogrli miš | krava,konj |
| Autumnalis | rakun | krava,pas |
| Icterohaemorrhagiae | štakor,svinja | krava,konj,svinja,zamorac, lisica,jež,rakun,miševi |
| Pomona | tvor,krava,svinja,poljski miš | konj,ovca,koza,jelen,lisica, rakun,miševi,jež |
| Canicola | pas | krava,konj,svinja,rakun,štakor, jež,voluharice |
| Bataviae | pas,štakor,patuljasti miš | krava,voluharice,jež |
| Hardjo | krava | svinja,konj,ovca |
| Grippotyphosa | zamorac,poljski miš,rakun,tvor,poljska voluharice | krava,svinja,ovca,koza,zec, vjeverica,lisca,miševi,štakor, jež |
| saxkoebing | kućni miš,žutogrli miš | svinja,govedo,pas i sl. |
| sejroe | kućni miš | govedo,jelen,svinja, i sl. |

### 2.10.1. Leptospiroza divljači

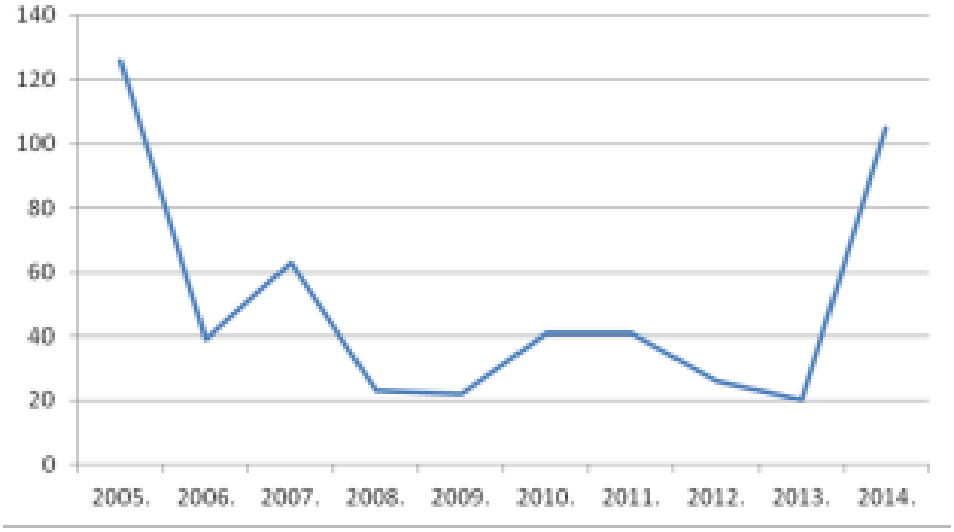
Leptospiroza kao oboljenje divljači raširena je diljem Europe. Divljač kao i glodavci su značajni prirodni rezervoari leptospira. U Hrvatskoj dokazana su protutijela leptospira u jelena običnog, srne, divlje svinje, lisice, smeđeg medvjeda, zeca i bizamskog štakora. Divljač koja prednjači po broju zaraženih uzoraka uzetih prilikom istraživanja su lisica i divlja svinja. Istraživanjem u periodu od 2002 do 2011 godine uzeto je 215 uzoraka krvi divljih svinja i 59 uzoraka krvi lisica. Uz uzorke krvi uzrokovalo se i tkivo bubrega također u istoj količini. Za dokazivanje leptospira u kliničkom materijalu korištena je serološka metoda (MAT), te metoda uzgajanja na hranjivim podlogama (Korthof-ova i EMJH hranjiva podloga). Od 215 uzoraka divljih svinja 75 uzoraka

je bilo pozitivno. Najučestaliji serovari koji su dokazani u uzorcima su: Australis (37,33%), Grippotyphosa (10,67%), i Tarassovi (6,67%) (Milas i sur., 2013). Kod lisica od 59 uzoraka 34 uzorka bila su pozitivna na leptospirozu. Kao i kod divlje svinje najviše protutijela pronađeno je za serovar Australis. Osim serovara Australis također su pronađena protutijela za serovare Sejroe i Grippotyphosa. (Milas i sur., 2013). Uzrok velikog broja zaraženih lisica je u tome što su lisice glavni predatori voluharica. Jedna lisica može sama tijekom jedne godine smanjiti populaciju voluharica za 200-290 jedinki /ha (O'Mahony 1999). Dok divlja svinja zbog rovanja i valjanja smanjuje broj hodnika, pa se na taj način i zarazi. Kod divljači do sada se sa sigurnošću nije moglo ustvrditi dali je pobačaj bio posljedica leptospiroze. Leptospiroza je utvrđena kod divljači uzimanjem uzoraka krvi, tkiva, dijelova organa (nakon odstrela). Često tek nakon uzimanja uzoraka bi se ustvrdilo da je divljač bolesna ili da je preboljela leptospirozu, te se ne zna dali je životinja pokazivala simptome ili ne.

## 2.11. LEPTOSPIROZA U HRVATSKOJ

Hrvatska zauzima prvo mjesto po broju oboljelih od leptospiroze u Europi (1,83 % oboljelih na 100.000 stanovnika) (Balen, Topić i sur.,2010.). Na globalnoj razini Hrvatska zauzima 13 mjesto po broju oboljelih (Pappas i sur.,2008.). Veliki broj oboljelih od leptospiroze možemo objasniti upravo s činjenicom da Hrvatska spada u arhaična prirodna žarišta lepotspiroze. Hrvatska odgovara leptospirama po hidrološkim, klimatskim i edafskim uvjetima. Ovi uvjeti te postojanje njihovih prirodnih rezervoara omogućava održavanje životnog ciklusa leptospira. U razdoblju 1998. do 2012. godine od leptospiroze u Hrvatskoj je prosječno godišnje obolijevalo 70 ljudi (HZJZ 2013). Od leptospiroze u tom razdoblju umrlo je ukupno 18 ljudi odnosno 1,5 godišnje. Leptospiroza u Hrvatskoj prati se posljednjih 50-ak godina. Bolest u Hrvatskoj se pojavljuje endemski i to u dolinama naših velikih rijeka (Sava i Drava), u sjeverozapadnoj i središnjoj Hrvatskoj, te u dolini Neretve. U Hrvatskoj leptospiroza najviše je uzrokovana serovarovima iz skupina: *Australis, Sejroe, Grippotyphosa, Pomona* i *Icterohaemorrhagiae*. Serovar Australis u Hrvatskoj je izoliran iz četri vrste mišolikih glodavaca : *Apodemus agrarius, Apodemus sylvaticus, Apodemus flavicollis, Myodes glareoulus*. Serološkim istraživanjima tijekom 2007. godine dokazano je da u ljudskim i životinjskim izolatima najviše se pojavljuju serovari Australis i Grippotyphosa (Habuš,2008.). U ostalim Europskim zemljama (Njemačka, Francuska i Italija) infekciju kod ljudi najviše uzrokuju serovarovi iz serološke skupine *Icterohaemorrhagiae*. Smeđi štakor je osnovni rezervoar serovara Icterohaemorrhagiae i

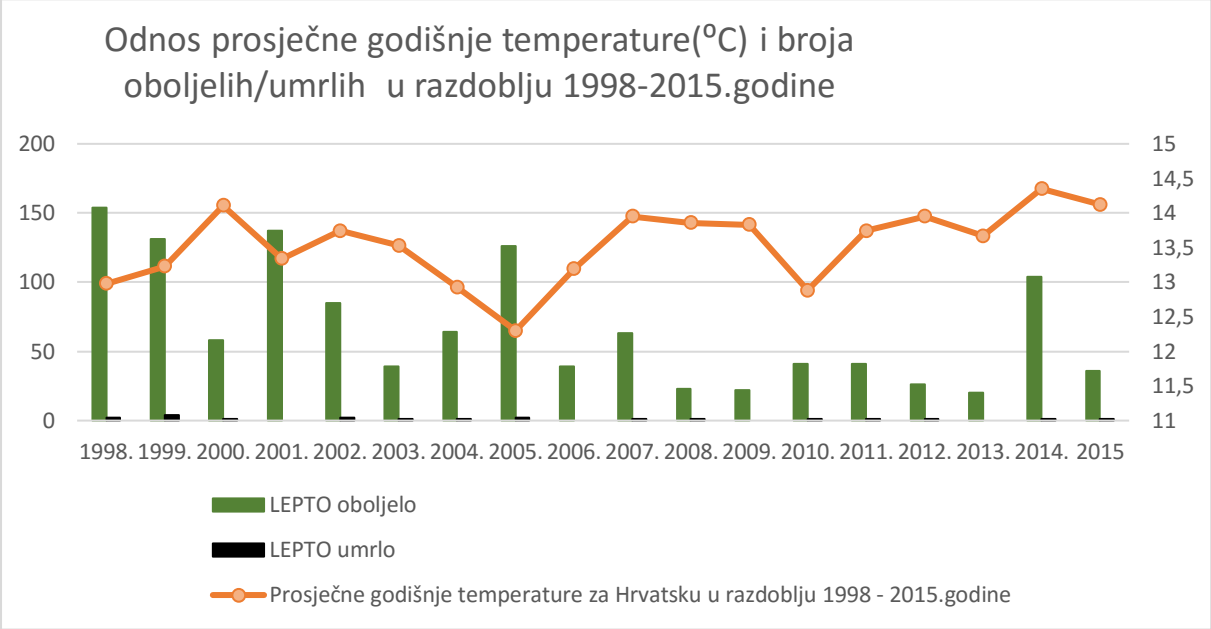
Coppenhageni, te glavni pokazatelj sinantropnog žarišta leptospiroze. Stoga iz ovoga možemo zaključiti da glavni prenositelj leptospiroze u ostalim Europskim zemljama je smeđi štakor. Pošto Hrvatska spada u arhaična prirodna žarišta glavni izvori infekcije u Hrvatskoj su mišoliki glodavci. Dosadašnja istraživanja u Hrvatskoj dokazala su povezanost između smeđeg štakora (*Rattus norvegicus*) i serovara Icterohaemorrhagiae, poljske voluharice (*Microtus arvalis*) i serovara Grippotyphosa, poljskog miša (*Apodemus agrarius*) i serovara Pomona, kućnog miša (*Mus musculus*) i serovara Sejroe.(Habuš,2008). Leptospirozu možemo definirati kao sezonsku bolest. Najviše se javlja u ljeto i jesen (Cvetnić i sur. 2002, Margaletić i sur. 2002, Turk i sur.2003). Broj oboljelih od leptospiroze podudara se s kulminacijom glodavaca. Kulminacija glodavaca nastupa svake 3-4 godine(2001,2005,2007).




Slika 10 Broj oboljelih u razdoblju 2005-2014 godine

Kulminacija glodavaca povezana je s urodom sjemena (naročito žira i bukvice), dobrim uvjetima podneblja (topla jesen i proljeće, blaga zima, umjereno ljeto s umjerenim oborinama), te malim broj prirodnih neprijatelja. Prema DHMZ 2014.godina bila je najtoplija godina ne samo u Hrvatskoj i Europi, nego i u cijelom svijetu. Urod žira u 2013.godini bio je veoma obilan naročito u Spačvanskom bazenu. Toplo vrijeme, veliki urod sjemena uzrokovali su povećanje populacije ali i s time povećanje oboljelih od leptospiroze (Slika 10). U svrhu diplomskog rada dobiveni su podatci DHMZ-a o prosječnim količinama oborina i prosječnim godišnjim temperaturama za razdoblje od 1998 – 2015. godine. Uz podatke o godišnjim temperaturama i oborinama zbog usporedbe korišteni su podaci HZJZ o broju oboljelih/umrlih od leptospiroze za razdoblje 1998-2015.godine.

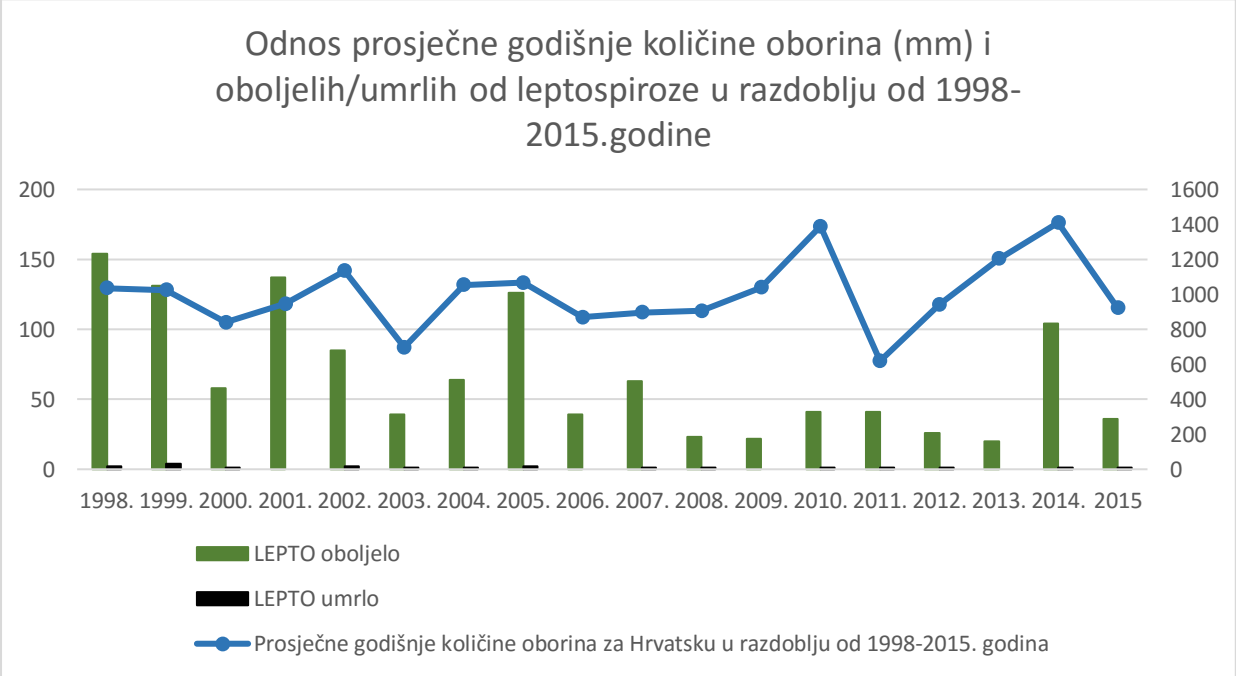
Grafički prikaz 1 Odnos prosječne godišnje temperature i broja oboljelih/umrlih od leptospiroze u razdoblju 1998 -2015. godine




Tablica 4 Broj oboljelih/umrlih od leptospiroze u razdoblju 1998-2015.godine (HZJZ)

| Godina | Oboljeli | Umrli |
|---|---|---|
| 1998 | 154 | 2 |
| 1999 | 131 | 4 |
| 2000 | 58 | 1 |
| 2001 | 137 | |
| 2002 | 85 | 2 |
| 2003 | 39 | 1 |
| 2004 | 64 | 1 |
| 2005 | 126 | 2 |
| 2006 | 39 | |
| 2007 | 63 | 1 |
| 2008 | 23 | 1 |
| 2009 | 22 | |
| 2010 | 41 | 1 |
| 2011 | 41 | 1 |
| 2012 | 26 | 1 |
| 2013 | 20 | 0 |
| 2014 | 104 | 1 |
| 2015 | 36 | 1 |

Grafički prikaz 2 Odnos prosječne godišnje količine oborina i broja oboljelih/umrlih od leptospiroze u razdoblju 1998 -2015.godine




Prema izvješću HZJZ 1998, 1999, 2005 i 2014. godina su godine s najviše oboljelih od leptospiroze. Temperatura za 2014.godinu je bila izrazito visoka kao i količina oborina (Grafički prikaz 1 i 2.). Kao što je već navedeno kulminacija glodavaca nastupa svake 3-4 godine (2001.2005 ,2007 ..). Posljedica svih tih čimbenika je veliko povećanje oboljelih od leptospiroze(Tablica 4). Česta kiša i toplije vrijeme pogoduje preživljavanju leptospira. Mogu preživjeti u stajaćim vodama(barama) i vodama do 183 dana. Jako suha klima i suho vrijeme im ne pogoduje. Pa primjerice temperatura 45-55 $^{o}$C ih ubija u roku od 10-60 minuta. Najviše leptospiroza kod ljudi povezana je s kišnim razdobljem odnosno poplavama. Poplave uzrokuju bijeg glodavaca iz svojih skrovišta, ali također brže širenje i održavanje leptospira. Kao što je već rečeno poplave jako pogoduju leptospirama. Ljeti leptospiroza je česta zbog aktivnosti ljudi (rekreacija u prirodi), dok u jesen zbog čestih oborina. Iz grafičkih prikaza vidljivo je kako s povećanjem oborina proporcionalno raste broj oboljelih. Temperatura je bitna za razvoj i rast leptospira, dok poplavama glodavci bježe iz svojih skrovišta pa na taj način ih šire. Oba čimbenika su veoma bitna.

Tablica 5 Prosječne godišnje temperature za Hrvatsku u razdoblju od 1998-2015.godine

| Godina | Daruvar | Osijek | Zagreb | Rovinj | Varaždin | Zadar | Gospić | Dubrovnik | Rijeka | Split | sume | suma/10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1998 | 10,7 | 11,3 | 11,2 | 14 | 10,6 | 15,6 | 9,1 | 16,6 | 14,2 | 16,5 | 129,8 | 12,98 |
| 1999 | 11,1 | 11,5 | 11,6 | 14,2 | 10,8 | 15,6 | 9,4 | 17,1 | 14,4 | 16,6 | 132,3 | 13,23 |
| 2000 | 12,1 | 12,9 | 12,7 | 14,7 | 12,1 | 16,3 | 10,5 | 17,2 | 15,3 | 17,3 | 141,1 | 14,11 |
| 2001 | 11,1 | 11,4 | 11,7 | 14,3 | 11,1 | 15,7 | 9,7 | 17 | 14,8 | 16,6 | 133,4 | 13,34 |
| 2002 | 11,9 | 12 | 12,3 | 14,4 | 11,9 | 15,8 | 9,9 | 17,4 | 14,8 | 17 | 137,4 | 13,74 |
| 2003 | 11,2 | 11,3 | 11,8 | 14,4 | 11,1 | 15,9 | 9,8 | 17,4 | 15,1 | 17,3 | 135,3 | 13,53 |
| 2004 | 10,6 | 11 | 11,2 | 13,9 | 10,5 | 15,4 | 9,2 | 16,8 | 14,2 | 16,5 | 129,3 | 12,93 |
| 2005 | 10 | 10,4 | 10,7 | 13,1 | 10 | 14,8 | 8,5 | 16 | 13,6 | 15,9 | 123 | 12,3 |
| 2006 | 11 | 11,5 | 11,8 | 14 | 11 | 15,4 | 9,5 | 16,6 | 14,6 | 16,5 | 131,9 | 13,19 |
| 2007 | 11,9 | 12,4 | 12,6 | 14,6 | 11,9 | 16,1 | 10,2 | 17,3 | 15,3 | 17,2 | 139,5 | 13,95 |
| 2008 | 11,8 | 12,5 | 12,3 | 14,4 | 11,8 | 16 | 10,4 | 17,3 | 14,9 | 17,2 | 138,6 | 13,86 |
| 2009 | 11,9 | 12,3 | 12,4 | 14,6 | 11,5 | 15,9 | 10,2 | 17,4 | 15,1 | 17 | 138,3 | 13,83 |
| 2010 | 10,8 | 11,3 | 11,3 | 13,5 | 10,4 | 15,2 | 9,4 | 16,6 | 13,9 | 16,4 | 128,8 | 12,88 |
| 2011 | 11,2 | 11,7 | 12,1 | 14,4 | 11,2 | 16,2 | 10 | 17,7 | 15,3 | 17,6 | 137,4 | 13,74 |
| 2012 | 11,8 | 12,3 | 12,5 | 14,6 | 11,7 | 16,1 | 10,3 | 17,6 | 15,2 | 17,4 | 139,5 | 13,95 |
| 2013 | 11,5 | 12,1 | 11,9 | 14,5 | 11,2 | 15,9 | 10 | 17,5 | 14,8 | 17,3 | 136,7 | 13,67 |
| 2014 | 12,3 | 12,8 | 12,9 | 15,2 | 12,3 | 16,5 | 10,9 | 17,7 | 15,5 | 17,4 | 143,5 | 14,35 |
| 2015 | 11,9 | 12,6 | 12,6 | 14,9 | 11,7 | 16,3 | 10,2 | 17,9 | 15,6 | 17,5 | 141,2 | 14,12 |

Tablica 6 Prosječna godišnja količina oborina za Hrvatsku u razdoblju od 1998-2015.godine

| Godina | Daruvar | Osijek | Zagreb | Rovinj | Varaždin | Zadar | Gospić | Dubrovnik | Rijeka | Split | sume | suma/10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1998 | 1103,5 | 684 | 1026 | 810,8 | 950,6 | 964 | 1256 | 1051,3 | 1805 | 712 | 10362,6 | 1036,26 |
| 1999 | 1162,1 | 873,1 | 924,2 | 719 | 808,2 | 937 | 1406,7 | 1019,7 | 1443 | 943 | 10236,5 | 1023,65 |
| 2000 | 651,4 | 317 | 721,2 | 754 | 586,8 | 782 | 1367,6 | 934,9 | 1696 | 580 | 8391,3 | 839,13 |
| 2001 | 1000,2 | 944,5 | 822,3 | 537,6 | 725,4 | 826 | 1206 | 983,4 | 1507 | 899 | 9451,5 | 945,15 |
| 2002 | 904,9 | 653,8 | 979,8 | 1218 | 725,8 | 1196 | 1661,2 | 1362,4 | 1717 | 922 | 11340,3 | 1134,03 |
| 2003 | 640,6 | 516,5 | 594,1 | 550,3 | 559,7 | 588 | 1098,7 | 879,2 | 1021 | 522 | 6969,9 | 696,99 |
| 2004 | 1037,7 | 865,4 | 918,2 | 767,6 | 899,5 | 801 | 1356,3 | 1317,1 | 1577 | 991 | 10530,8 | 1053,08 |
| 2005 | 968,7 | 973,7 | 906 | 835,8 | 890,9 | 964 | 1412,3 | 1275,5 | 1433 | 1003 | 10662,9 | 1066,29 |
| 2006 | 775,3 | 632,1 | 744,2 | 725,5 | 762,2 | 688 | 1203,2 | 1190,4 | 1305 | 657 | 8682,4 | 868,24 |
| 2007 | 979,6 | 620,9 | 857,5 | 670,8 | 903,9 | 678 | 1119,4 | 958,3 | 1417 | 752 | 8957,9 | 895,79 |
| 2008 | 796,9 | 628,7 | 744,2 | 845,8 | 723,1 | 734 | 1323,7 | 872,3 | 1631 | 750 | 9049,4 | 904,94 |
| 2009 | 680,9 | 544,6 | 768,8 | 919 | 804 | 1009 | 1433,1 | 1590 | 1647 | 993 | 10389,2 | 1038,92 |
| 2010 | 1312,1 | 1038 | 1060 | 1423 | 1200,3 | 1110 | 1789,8 | 1721,8 | 2115 | 1126 | 13895,8 | 1389,58 |
| 2011 | 532,7 | 422,2 | 517 | 560,4 | 481,2 | 509 | 683,3 | 826,2 | 1077 | 584 | 6192,8 | 619,28 |
| 2012 | 788,9 | 599,2 | 761,1 | 678,8 | 750,6 | 921 | 1279,4 | 1202,5 | 1696 | 738 | 9415,2 | 941,52 |
| 2013 | 886,7 | 767,3 | 1053 | 984 | 1101,9 | 1187 | 1599,7 | 1594,5 | 2105 | 768 | 12047,2 | 1204,72 |
| 2014 | 1248,5 | 809,4 | 1318 | 1282 | 1312,2 | 1365 | 1866,3 | 1620,4 | 2066 | 1209 | 14096,3 | 1409,63 |
| 2015 | 924,2 | 686,3 | 887,1 | 536 | 965,4 | 948 | 1306,4 | 1123,4 | 1040 | 799 | 9215,5 | 921,55 |

# 3. CILJ RADA

Cilj ovog diplomskog rada je proučiti i opisati istraživanja koja su vezana za vrste iz roda *Leptospira*. *Leptospira spp.* obuhvaća patogene, saprofitske i prijelazne vrste leptospira. Za humanu medicinu najvažnije su patogene leptospire jer uzrokuju oboljenje kod ljudi (leptospirozu). Osim europskih istraživanja rad će sadržavati i istraživanja koja su provođena i u Hrvatskoj.

# 4. ANALIZA ZNANSTVENIH ISTRAŽIVANJA *LEPTOSPIRA SPP.*

## 4.1. Turk, N., Milas, Z., Habuš, J., Štritof, Z., Mojčec, V., Modrić, Z., Starešina, V., Postic, D. (2008) : Identificiranje i tipiziranje Leptospira spp. primjenom metode raznolikosti dužine restrikcijskih fragmenata rDNK za gen 16S (RFLP) i gel elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE). *Infektološki glasnik, 28(4),* 173-182.

Leptospiroza u Hrvatskoj je prvi put ustanovljena kod životinja odnosno u pasa 1926. godine, a kasnije 1935. godine kod ljudi. Osnovni izvor zaraze su divlje i domaće životinje bolesne od leptospiroze koje u okoliš izlučuju leptospire urinom. Različite serološke-tipizacijske i molekularne metode primjenjuju se kod identifikacije i analize leptospira. MAT (mikroskopska aglutinacija) metoda temelji se na identifikaciji antigena sojeva. Uz MAT metodu koristi se i križni aglutinacijski test zasićenja s kunićjim hiperimunim serumima (CAAT). Serološke metode su subjektivnog karaktera, pa se uz serološke metode koriste i molekularne metode.

⇒ METODE IDENTIFIKACIJE I REZULTATI ISTRAŽIVANJA

U svrhu ovog istraživanja korišteni su izolati domaćih i divljih životinja iz kontinentalnog dijela Hrvatske. Kao metode identifikacije korištene su serološka metoda mikroskopske aglutinacije (MAT), molekularne metode; raznolikost dužine restrikcijskih fragmenata rDNK za gen 16S (RFLP) i gel elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE). Uzorci su uzeti u nizinskog području uz naše velike rijeke Savu i Dravu. Prvo se koristila MAT metoda s kojom su se odredile serološke skupine. Nakon određivanje seroloških skupina za detaljniju identifikaciju koristila

se molekularna metoda s kojom je ustanovljena genomska vrsta primjenom metode raznolikosti dužine restrikcijskih fragmenata gena za 16S rDNK (PCR-RFLP). Pojedini serovar identificirao se primjenom metode gel elektoforeze u pulsirajućem polju (PFGE).



Slika 11 Mjesta gdje su izdvojeni pojedini sojevi

Pretraženi su sljedeći izolati :

- četiri su izdvojena iz bubrega mačaka (ČEMINAC M-1, VARDARAC M-5, N-BOLMAN M-5 i M-1303)
- tri iz krvi ili bubrega pasa (Švrćo 62/96,58/96 i PAS-493)
- dva iz bubrega sitnih glodavaca (HB-38 iz kućnog miša, LG-36 iz bubrega poljske voluharice)
- dva iz bubrega svinja ( D-67 i C-502)
- po jedan iz zeca (R-25/75) i po jedan iz bubrega teleta (TELE II)

Sojevi D-67 i C-502,VARDARAC M-5 i M-1303, ČEMINAC M-1 izdvojeni su u Baranji, te Švrćo 62/96, 58/96 i PAS-493 i soj N-BOLMAN M-5 izdvojeni su s područja Zagreba i okolice. Na području Velike Gorice izdvojen je soj TELE II, dok sojevi HB-38 i LG-36 u okolici Koprivnice. Kod Đurđenovca (Osijek) izdvojen je soj R-25/75 (Slika 11).

MAT metoda izvedena je u mikrotitracijskoj ploči s ravnim dnom miješanjem 50 µL bakterijske kulture i 50 µL serijskih razrjeđenja hiperimunih referentnih seruma u duplikatima. S fiziološkom otopinom (razrjeđenja 100-12 800) razrijeđeni su hiperimuni serumi. Nakon 2 sata

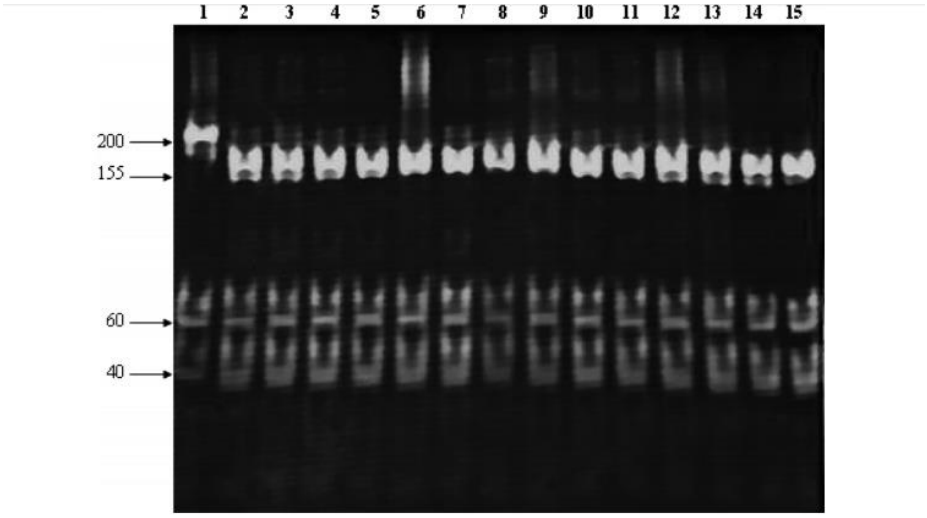
inkubacije očitala se aglutinacija putem mikroskopa s tamnim vidnim poljem. Pripadnost određenog soja u serološku skupinu ustvrdila se ako aglutinacija s odgovarajućim hiperimunim serumom za tu skupinu bila prisutna i u razrjeđenju od 400 ili većem . Kada se izvršila MAT metoda cilj istraživanja je bilo dobiti termolizate leptospira. Postupak dobivanja termolizata započinje s centrifugom 2 mL bakterijske kulture, a nakon toga talog se mora resuspendirat s fosfatnim puferom (eng. Phosphate Buffer Sline-PBS). Kada je izvršeno centrifugiranje i odvajanje nadtaloga, talog se ponovno resuspendira sa 100 µL redestilirane vode. U termobloku talog se kuhao na $100^0$C 10 min. Ovim postupkom su se dobili termolizati koji su kasnije pohranjeni u zamrzivač na $-20^0$ C . Termolizati potrebni su za dobivanje početnih 330 bp rDNK gena 16 S.

Početnih 330 bp rDNK gena 16 S dobiveni su inkubacijom 5µL termolizata s mješavinom reagensa i Taq - polimeraze s početnicama LEPTOA (5' -GGCGGCGCGTCTTAAACATG - 3′ ) i LEPTOB (5 ′- TTCCCCCCATTGAGCAAGATT- 3′ ) u aparatu PTC-100 (Programmable Thermal Controller Peltier-Effect Cycling) pri temperaturi 60°C. Restrikcijski enzimi[7] koji su korišteni prilikom istraživanja su *Mn/*I i *Dde*I. Oba restrikcijska enzima zasebno (*Mn/*I i *Dde*I.) u količini od 10 µL s pripadajućim puferom i po 20 µL PCR- proizvoda se inkubiralo u vodenoj kupelji pri 37°C (2 sata 30 min). Elektroforezom na 12 % -tnom akrilamidnom gelu su se provjerili restrikcijski proizvodi. Nakon toga izvršilo se bojanje etidijevim bromidom snimile su se fotografije gela pod UV – svijetlom. Vrpce na gelu analizirane su usporedbom s kontrolama i određene su genomske vrste izolata. Prema standardnom protokolu izvršena je ekstrakacija DNK. Putem restrikcijskih enzima *Not*I i *SgrA*I izvršena je restrikcija DNK plakova, a zatim se dio bloka uklopio u 1 % -tni agarozni gel. S DRII apartom izvedena je PFGE (eng. Pulsed-field gel electrophoresis) migracija. Pomoću ritma električnog impulsa izvelo se razdvajanje DNK odsječka. Putem molekularnog markera (Concatemerized λ bacteriophage genome) odredila se veličina DNK vrpci na gelu. Na kraju gelovi su se fotografirali pod UV svijetlom (gelovi se prethodno moraju obojati etidijevim bromidom), te se analiziraju. Pod istim serovarom leptospira smatrali bi se izolati i referentni sojevi s identičnim restrikcijskim profilom dobivenih s dvaju različitih restrikcijskih enzima. Pomoću MAT metode ustanovljeno je da pet sojeva pripada serološkoj skupini *Pomona*, po dva soja serološkoj skupini *Bataviae, Canicola* i I*cterohaemorrhagiae*, te po jedan soj serološkoj skupini *Grippotyphosa* i *Australis*. Svi sojevi koji su istraživani imaju isti restrikcijski profil također i referentni kontrolni sojevi *L.kirschneri i L.interrogans* sensu stricto. Zaključeno je da u onim profilima koji su dobiveni

[7] Restrikcijski enzimi -enzimi koji su sposobni odvajaju molekulu DNA na mjestu specifičnog redosljeda baza

restrikcijom s *Mn*/I ne uočava se razlika između genomskih vrsta (*L.kirschneri i L.interrogans* sensu stricto). Soj oko kojeg se dvojilo je LG-36. Ovaj soj je određen da pripada skupini Grippotyphosa. Pošto serovar Grippotyphosa može doći i u genomskoj skupini *L.kirschneri i L..interrogans* sensu stricto izvršena je mikrorestrikcija s enzimom *Ddel*I kako bi se ustvrdila razlika. Uspoređivani su različiti restrikcijski profili genomske vrste *L.interrogans* sensu stricto i vrste *L.kirschneri*. Nakon usporedbe dokazano je da svi ispitivani sojevi pripadaju genomskoj skupini *L.interrogans* sensu stricto(Slika 12).

Slika 12. prikazuje gel elektroforezu na 12% -tnom akrilamidnom gelu odsječaka početnih 330 bp rDNK za gen 16S sojeva leptospira nakon restrikcije s *Dde*I. Prva kolona predstavlja pozitivnu kontrolu *L.kirschneri*, dok druga kolona pozitivnu kontrolu *L. interrogans* sensu stricto.




Slika 12 Gel elektroforeza na 12%-tnom akrilamidnom gelu

Kolone 3-15 ispitivani uzorci:

- 3 – ŠVRĆO 62/96
- 4 – 58/96
- 5 – ČEMINAC M-1
- 6 – D-67
- 7 – VARDARAC M-5
- 8 – N-BOLMAN M-5
- 9 – R-25/75
- 10 – TELE II
- 11 – C-502
- 12 – PAS-493
- 13 – HB-38
- 14 – M-1303
- 15 – LG-36

Makrorestrikcijom čitave genomske DNK pretraživanih izolata i gel elektroforezom u pulsirajućem polju ustanovljeno je osam različitih serovara. Kod **makrorestrikcije** korišteni su restrikcijski enzimi *Not*I i *SgrA*I. Kod restrikcije s enzimom *Not*I ustanovljeno je da: izolat ŠVRĆO 62/96 ima sličan restrikcijski profil s referentnim serovarom Copenhageni, profil izolata 58/96 je sličan s serovarom Icterohaemorrhagiae, izolati TELEII i IC-502 imaju slične profile s serovarom Pomona, izolat ČEMINAC M-1 i D-67 imaju sličan profil serovarom Bataviae i sl. Zbog malih razlika u molekularnoj masi *SgrA*I enzim rezultira s većim brojem odsječaka koji nisu jasno odijeljeni, pa je usporedba otežana. Kod izolata M-1303 (mačka) učinjena je korekcija. Prema prijašnjim rezultatima određen je serovar Jalna (serološka skupina *Australis*), a prema novim rezultatima određen je serovar Lora (*Australis*).Također izolat D-67 (krmača) prije je svrstan u serološku skupinu *Tarassovi* (serovar Tarassovi), a prema novim rezultatima serološku skupinu *Bataviae* (Bataviae) i sl. Rezultati dobiveni elektroforezom u pulsirajućem polju poklapaju se s rezultatima dobivenih serološkom determinacijom, odnosno serovari koji su ustanovljeni odgovaraju pojedinoj serološkoj skupini. Serološkom i genetskom tipizacijom (RFLP I PFGE) identificirano je 8 serovara genomske vrste *L.interrogans* sensu stricto : Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Bataviae, Pomona, Lora, Grippotyphosa, Pomona Kennewicki. U Hrvatskoj (naročito uz naše najveće rijeke Savu i Dravu) postoji velika genetska raznolikost leptospira unutar genomske vrste *Leptospira interrogans* sensu stricto.

| Izolat / Isolate | Serološka skupina / Serogroup | Serovar / Serovar | Genomska vrsta / Genomic species |
|---|---|---|---|
| ŠVRĆO 62/96 (pas / dog) | *Icterohaemorrhagiae* | Copenhageni | *L. interrogans* s. s. |
| 58/96 (pas / dog) | *Icterohaemorrhagiae* | Icterohaemorrhagiae | *L. interrogans* s. s. |
| PAS-493 (pas / dog) | *Canicola* | Canicola | *L. interrogans* s. s. |
| ČEMINAC M-1 (mačka / cat) | *Bataviae* | Bataviae | *L. interrogans* s. s. |
| VARDARAC M-5 (mačka / cat) | *Pomona* | Pomona | *L. interrogans* s. s. |
| N-BOLMAN M-5 (mačka/cat) | *Pomona* | Pomona | *L. interrogans* s. s. |
| M-1303 (mačka / cat) | *Australis* | Lora | *L. interrogans* s. s. |
| D-67 (svinja – krmača / sow) | *Bataviae* | Bataviae | *L. interrogans* s. s. |
| C-502 (svinja – tovljenik / pig – fatling) | *Pomona* | Pomona | *L. interrogans* s. s. |
| HB-38 (kućni miš / house mouse) | *Canicola* | Canicola | *L. interrogans* s. s. |
| LG-36 (poljska voluharica / field vole) | *Grippotyphosa* | Grippotyphosa | *L. interrogans* s. s. |
| R-25/75 (zec / hare) | *Pomona* | Pomona Kennewicki | *L. interrogans* s. s. |
| TELE II (tele / calf) | *Pomona* | Pomona | *L. interrogans* s. s. |

Slika 12 Rezultati istraživanja putem serološke i genomske tipizacije

## 4.2. Habuš, J., Cvetnić,Ž., Milas, Z., Štritof, Z., Balen-Topić, M., Margeletić, J., Turk, N. (2008) :Seroepidemiološko i seroepizootiološko istraživanje leptospiroze u Hrvatskoj tijekom 2007.. Infektološki glasnik, 28(4), 183-188

Veterinarski fakultet u Zagrebu 2007. godine zaprimio je 113 seruma pacijenata za koje se sumnjalo da boluju od leptospiroze. Mikroskopskom aglutinacijom su pretraženi serumi s 12 različitih serovara leptospiroze (Poi, Bataviae, Hardjo, Pomona, Canicola, Grippotyphosa, Serjoe, Australis, Saxkoebing, Ballum, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi). Za signifikantni titar protutijela u serumu (četverostruko povećanje titra) uzeta je granična vrijednost ≥ 1:500 (WHO/ILS 1:200 do 1:800 ovisno o epidemiološkoj situaciji). Tijekom 2007. godine dva puta u godini pretraživala se krv bikova, ovnova, jarčeva, pastuha koji služe za umjetno oplodnju. Također pretraživala se krv sumnjivih životinja za koje se sumnja da imaju leptospirozu (lisice i ostala divljač). Kod životinja signifikantni titar pri određivanju pozitivnih reakcija iznosio je ≥ 1:100 (sukladno Pravilniku o mjerama za suzbijanje i iskorjenjivanje leptospiroze). Od 1212 kopitara kod 196 utvrđen je titar protutijela ≥ 1:100. Najviše kopitara oboljelo je od serovara : Australis, Pomona i Grippotyphosa. Kod svinja najčešći serovari su Australis i Pomona, a kod goveda Grippotyphosa, Hardjo i Hardjobovis i sl. (Slika 13). Sumnjivi ljudski serumi zaprimljeni su iz središnje i sjeverozapadne Hrvatske. U 24 pacijenta ustanovljen je titar ≥ 1:500. Kod 24 oboljela ustanovljeno je 9 različitih serovara. Najviše ljudi bilo je zaraženo serovarima: Australis (6/24), Grippotyphosa (5/24) i Icterohaemorrhagiae (4/24). Ostali serovari koji su utvrđeni: Bataviae (3), Pomona (2), Saxkoebing (1), Sejroe (1), Tarassovi (1) i Poi (1). Dobna struktura oboljelih kretala se od 40-60 godina (Slika 14). Prema spolnoj strukturi od 24 oboljela bilo je 22 muškarca (91.67 %) i 2 žene (8,33%).

| Vrsta /Species | Broj pretraženih uzoraka / Number of tested samples | Broj (%) pozitivnih uzoraka / Number of positive samples | Najčešći vjerojatni infektivni serovar / Most frequent presumptive serovar |
|---|---|---|---|
| Kopitari / Equidae | 1212 | 196 (16.17) | Australis<br>Pomona<br>Grippotyphosa |
| Psi / Dogs | 20 | 2 (10.00) | Koaglutinati* |
| Svinje / Pigs | 15524 | 1397 (8.99) | Australis<br>Pomona |
| Goveda / Cattle | 9867 | 295 (2.98) | Grippotyphosa<br>Hardjo<br>Hardjo-bovis |
| Koze / Goats | 1639 | 24 (1.46) | Pomona<br>Grippotyphosa |
| Ovce / Sheep | 16278 | 46 (0.28) | Grippotyphosa<br>Australis |
| Divljač / Game** | 100 | 0 (0.00) | – |
| Lisice / Foxes | 70 | 36 (51.43) | Australis<br>Sejroe |
| UKUPNO / TOTAL: | 44710 | 1996 (4.46) | Australis<br>Grippotyphosa |

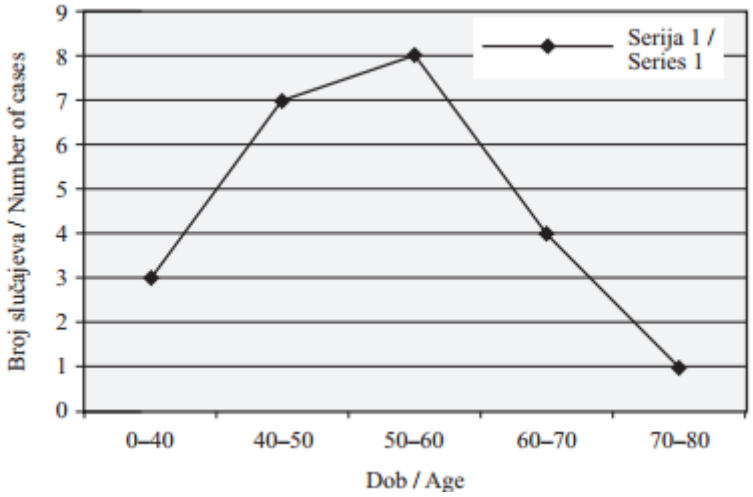
* Zbog pojave koaglutinata nismo bili u mogućnosti odrediti vjerojatni infektivni serovar / We were not able to determine probable infectious serovar due to coagglutination

** Srna, jelen, muflon, čagalj / roe deer, red deer, muflon, jackal

Slika 13 Slučajevi leptospiroze tijekom 2007.godine u divljači i domaćih životinja

Problematika ovog istraživanja je u tome da za većinu pacijenata dostavljeno je samo jedan serum, što znatno otežava dijagnostiku. Samo za 23 pacijenta poslan je parni serum. S obzirom da se protutijela javljaju između 4-6 dana bolesti bilo bi poželjno da se pošalje barem tri seruma što je veoma rijetko. Ljudi se inficiraju bakterijama iz roda *Leptospira* neizravnim ili izravnim kontaktom s urinom bolesnih životinja. Stočari, veterinari, mesari, laboratorijsko osoblje ima izravan kontakt s tjelesnim izlučevinama životinja, pa se na taj način **izravno inficiraju**. Dok rudari, poljoprivrednici, ribiči, kupači, sportaši, šumari većinu vremena provode u okolišu i putem okoliša se inficiraju s leptospirama. Takav način zaraze putem okoliša koji je kontaminiran urinom se naziva **neizravnim** načinom zaraze. Iako je prijenos leptospiroze među ljudima vrlo rijedak, on se može dogoditi. Čovjek se može inficirati urinom bolesnog čovjeka, majčinim mlijekom, spolnim putem, te intrauternim putem. Poznavanjem poveznica između rezervoara/domaćina pojedinih serovara olakšano je određivanje mogućeg izvora infekcije. Pojava glodavaca ovisi o mnoštvu faktora. Godine u kojima je brojnost mišolikih glodavaca izuzetno visoka naziva se "mišja godina". Ovim istraživanjem pomoću seroloških pretraživanja ljudi i životinja tijekom 2007. godine utvrđeno je da kod ljudi i životinja najviše se pojavljuje serovar Australis i Grippotyphosa (vezani za mišolike glodavce). Ovom činjenicom možemo zaključiti da u Hrvatskoj glavni izvori infekcija za ljude su zapravo mišoliki glodavci, a manje domaće i divlje životinje. Osim glodavaca također domaće i divlje životinje mogu biti

prenosnici bolesti. Usporedbom učestalosti pojavljivanja pojedinih serovara prije i 2007. godine može se zaključiti da je vidljiv blagi porast učestalosti serovara Australis, a smanjena pojava serovara Sejroe i Saxkoebing. Smanjenje prijenosa leptospiroze putem domaćih i divljih životinja djelomično je postignuto provođenjem posebnih mjera iskorjenjivanja i suzbijanja leptospiroze. S time se smanjila učestalost pojave pojedinih serovara koji su povezani s domaćim životinjama. Veliki broj glodavaca i arhaični tip prirodnog žarišta onemogućuje iskorjenjivanje leptospiroze naročito kod životinja u ekstenzivnim uzgojima s pašnim načinom držanja.




Slika 14 Učestalost leptospiroze s obzirom na dob

## 4.3. Miklaušić, B., Pandak, N., Čabraja, I., Šiško, M. (2015): Utjecaj klimatskih elemenata na pojavnost leptospiroze u Brodsko-posavskoj županiji. Infektološki glasnik, 35(2-3), 67-73

Cilj ovog istraživanja je bilo je dokazat kako oborine, vlažnost zraka i temperatura zraka utječu na povećanje oboljelih od leptospiroze na području arhaičnog žarišta leptospiroze. Tijekom istraživanja korišteni su podaci DHMZ za razdoblje od 2010. do 2015. godine. Također korišteni su podaci "Odjela za infektivne bolesti u Slavonskom Brodu" o oboljelima tijekom tog razdoblja.

Kriteriji za analizu podataka oboljelih su bili :

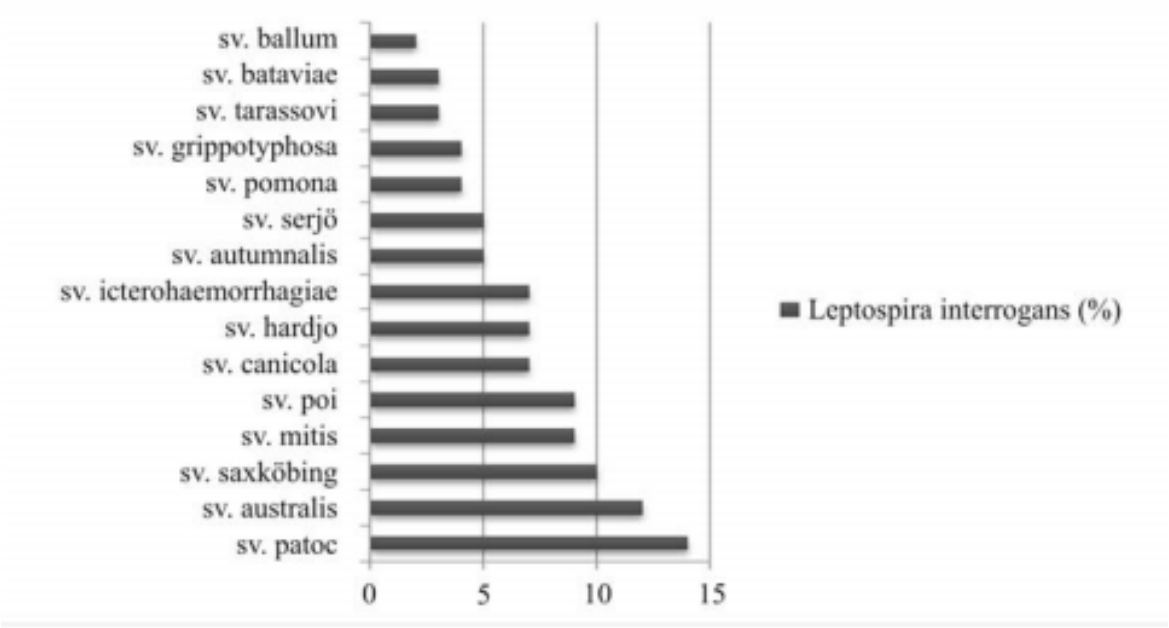
- epidemiološki podaci o nedavnom kontaktu s glodavcima, plivanje u stajačicama ili boravak u prirodi
- dali je bolest počela u razdoblju ili nakon razdoblja povećanja oborina
- minimalno 5 dana febrilnog stadija bolesti s glavoboljom, mijalgijom i prostracijom uz barem jedan simptom leptospiroze (osip, anurija, oligurija, konjuktivitis, poremećaj ritma srca, zatajenje srca i sl.)

Za dokazivanje leptospiroze korišteni su klasični testovi :

- mikroskopska aglutinacija (MAT)
- PCR metoda
- imunokromatografski "brzi test" na *Leptospire* (SD BIOLINE *Leptospira interrogans* IgM Rapid Test)

Pozitivnim na leptospirozu smatrali su se uzorci s najmanje četverostrukim porastom titra protutijela ili/i oni kojima je prva serologija bila negativna za sve serovare, a u drugoj kontroli su imali povećan titar protutijela za endemsko područje. (≥1:500 granična vrijednost prema WHO za endemsko područje leptospiroze). Unutar razdoblja od 5 godina hospitalizirano je 58 bolesnika koji su liječeni zbog sumnjanja na leptospirozu. Najviše obolijevaju muškarci (86%) zbog njihove prirode zanimanja (šumari, poljoprivrednici, stočari i sl.). Najviše oboljelih pripadalo je srednjoj životnoj dobi (31-65 godina). Najmlađi oboljeli imao je 16 godina, a najstariji 65 godina. Bolest je bila veoma teška kod 31 bolesnika (53). Jedan bolesnik imao je

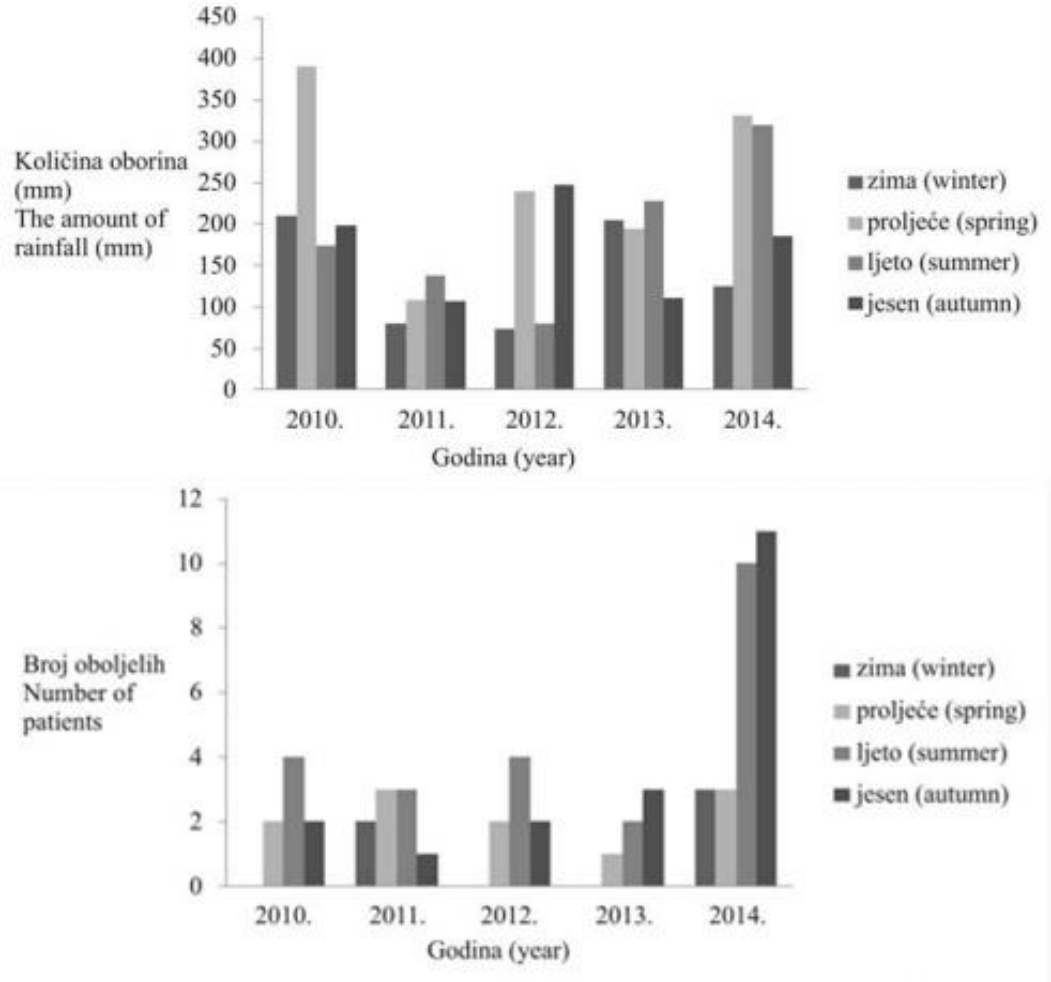
trombocitopeniju i leziju jetre s hiperbilirubinemijom i pneumonitisom. Bolest kod nekih očitovala se kroz zatajenje većeg broja organa (7 bolesnika). Dva bolesnika su umrla zbog zatajenja većeg broja organa. Osim zatajenja četiri bolesnika imala su hepatorenalni sindrom, dok pet oboljelih hiperbilirubinemiju. Uz hiperbilirubinemiju dva pacijenta imala su akalkulozni kolecistitis. Najzastupljeniji serovari koji su identificirani: Patoc (13%), Australis (12%), Saxkobing (10%), Mitis (9%), Poi(9%) (Slika 15).




Slika 15 Učestalost pojave serovara *L.interrogans* u Brodsko-posavskoj županiji (2010. - 2015.godina)

Prema podatcima DHMZ-a najveća količina padalina u razdoblju 2010.-2015. godine pala je 2010.godine (974,5 mm). Godišnje doba s najvećom količinom oborina je proljeće (391,2 mm). Iste godine zabilježen je porast oboljelih od leptospiroze na području Brodsko-posavske županije. Najveći broj oboljelih u 2010.godini zabilježen je u proljeće nakon povećane količine oborina. Ukupna količina oborina u 2014.godini bila je veća od očekivanog (962,9 mm). Također najveća količina oborina bila je u proljeće (331.4 mm)(Slika 16). Poplave 2014. godine uzrokovane velikom količinom oborina utjecale su na veliko povećanje oboljelih od leptospiroze. Bitno je naglasiti da prema istraživanju temperatura i vlaga zraka nisu pokazale nikakav utjecaj na povećanje oboljelih. Leptospiroza kod ljudi povezana je s kišnim razdobljem. Tijekom kišnih razdoblja dolazi do indirektnih i direktnih kontakata s mišolikim glodavcima i ostalih životinjama, koje tijekom poplava i kišnih razdoblja bježe iz svojih prirodnih staništa.

Ljeti je veća mogućnost infekcije zbog aktivnosti ljudi. Pojava leptospiroze može biti povezana i s urbanizacijom. Čovjek gradnjom naselja i vikendica utječe na tok rijeka, stoga promjena toka rijeka može biti uzrok poplava tijekom kišnih razdoblja. Prema ranijim podacima u razdoblju od 1995. do 2005.godine na području Brodsko-posavske županije došlo je do promjene učestalosti pojavljivanja pojedinog serovara. U ovom razdoblju najviše zastupljen serovara je Australis (20%), a slijedi ga Pomona (15%) i Saxkobing (10%). Ovo istraživanje je dokazalo vezu između kišnih razdoblja i pojave leptospiroze. Možemo reći da broj oboljelih proporcionalno raste s povećanjem količine oborina (Slika 16). Brodsko-posavska županija je endemsko područje leptospire, ali uostalom nizinsko područje pa se velika količina oborina zadržava na površini tla. Ovakvi uvjeti pogoduju održavanju leptospira, pa je zbog toga učestalost oboljelih veoma visok. Prema podatcima istraživanja broj oboljelih od leptospiroze je najveći tijekom jeseni i ljeta, ali oboljelih ima i tijekom cijele godine.




Slika 16 Broj oboljelih i količina oborina prema godišnjim dobima u Brodskoj-posavskoj županiji (2010. - 2014.godine)

## 4.4. Waggoner JJ, Balassiano I, Abeynayake J, et al. Sensitive Real-Time PCR Detection of Pathogenic Leptospira spp. and a Comparison of Nucleic Acid Amplification Methods for the Diagnosis of Leptospirosis. Lin B, ed. PLoS ONE. 2014;9(11):e112356. doi:10.1371/journal.pone.0112356.

Bakterije iz roda *Leptospira* klasificirane su u saprofitske i patogene vrste. Kliničke metode za identifikaciju patogenih leptospira još uvijek nisu dobro razvijene. Trenutne metode dijagnostike leptospiroze su testovi bakterijske kulture i metoda mikroskopske aglutinacije (MAT). Metoda kulture zahtjeva do četiri tjedna da bi se došli do nekih rezultata, dok kod MAT metode potrebno je uzimanje dva do tri seruma kako bi se potvrdila leptospiroza. MAT metodom potrebno je ustanoviti četverostruko povišenje titra protutijela u drugom serumu u odnosu na prvi što potvrđuje bolest. Prvi serum može biti negativan jer se uzima u početku bolesti kada još protutijela nema. Danas su razvijene mnoge molekularne metode dijagnostike. Molekularne metode dijagnostike mogu dati preciznu identifikaciju *Leptospira,* ali i definirati dijagnozu. Mnogi molekularni testovi su isključivo dizajnirani samo za otkrivanje patogenih vrsta *Leptospira.* PCR u realnom vremenu može identificirati patogene i nepatogene vrste iz roda *Leptospira* za razliku od ostalih metoda. PCR u realnom vremenu u ovom istraživanju uključen je u složeno (multipleksno) testiranje za dijagnozu malarije, leptospiroze i denga groznice (termin za metodu testa nediferencirane febrilne bolesti -UFI test). Multiplex PCR-om može se ispitati prisustvo ili odsustvo više mikroorganizama, te se koristi više početnica (eng. primers).

⇒ METODE ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je bio usporediti UFI test i rtPCR (Real Time PCR). U ovom istraživanju su korišteni posebne početnice koje su razvijene za UFI test, a koriste se kod patogenog rtPCR-a. Ove početnice ciljaju predio od *Leptospira* i to gen 16S (RP) rRNA. Patogeni rtPCR kombinira *Leptospira* primere iz UFI testa s novim hidroliznim probama. Proba se veže za ciljani predio nakon čega polimeraze sintetiziraju lanac počevši od primera uklanjajući probu koja joj se naiđe na putu. Za dizajniranje patogene probe sekvence koja su se podudarale s sekvencama *L. biflexa* i razlikovale od sekvence *L.interrogans* su otklonjene su iz usklađenja od 704 sekvence Leptospira gena 16 S rRNA. One su ponovno usklađene kao nepatogene sekvence putem Megalign softvera. U to usklađivanje uključene su sve sekvence za : *L.biflexu* (n:=12) te 22 sljedeće sekvence: *L. meyeri* (n = 15); *L. wolbachii* (n = 2); L. *vanthielii* (n = 2); *L. idonii* , *L.*

*terpstrae* i L. *yanagawae (* n=1). Preostale 670 sekvenca su ponovo usklađene. Patogene i nepatogene sekvence su usklađene korištenjem BLAST softvera.

Prilikom istraživanja korištena su 65 klinička uzorka (63 seruma i 2 plazme) za koje se sumnja da su zaražena leptospirozom. Uzorci su prikupljeni u razdoblju 2009. do 2013. godine u Brazilu. MAT metodom analizirana su 55 uzorka. Ekstrakcija DNA se izvela odmah u Brazilu prije otpremanje na testiranje. DNA je ekstrahirana pomoću DNeasy krvi i kitova tkiva. Sve izvađene nukleinske kiseline su pohranjene na -80 °C.

Tijekom istraživanja uzorci su ispitani :

- UFI testom,
- patogenim rtPCR,
- referentnim genom 16S rtPCR-om tokom jednog ciklusa zamrzavanja-odmrzavanja.

⇒ REZULTATI

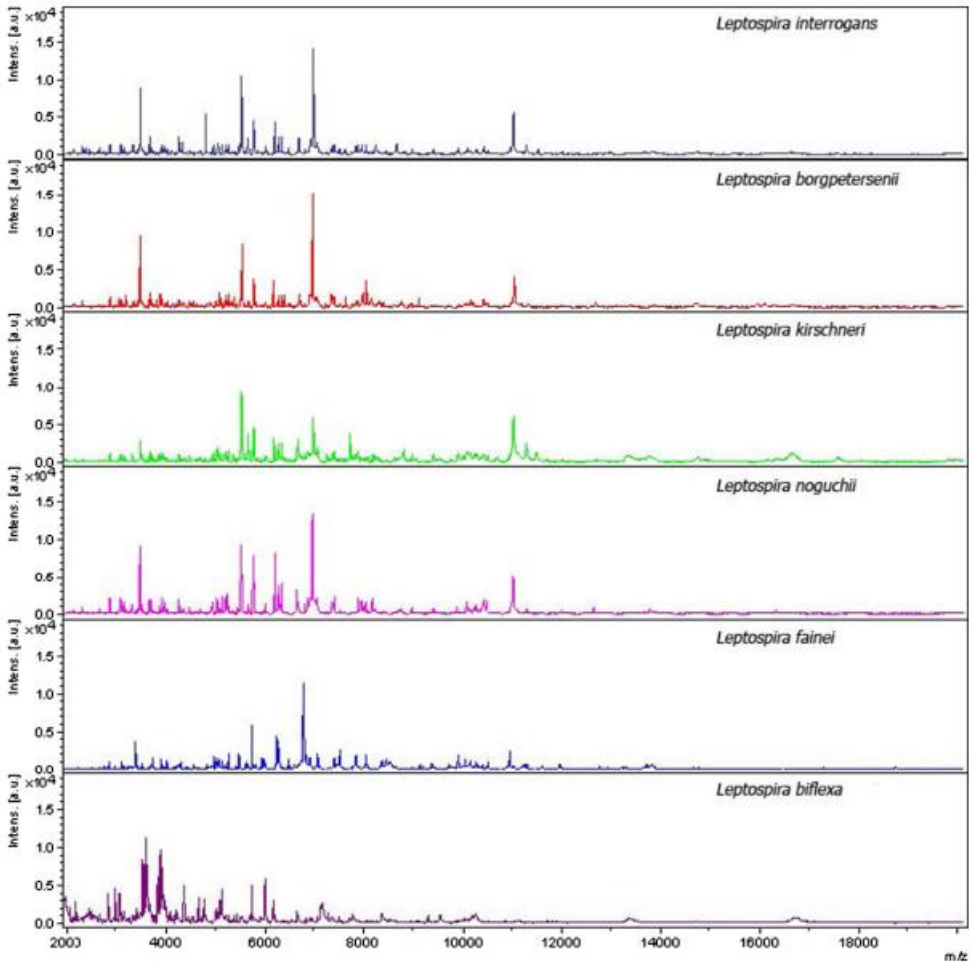
Pomoću UFI testa dokazano je da su svi uzroci su bili pozitivni na leptospire. Također otkriveno je da nije bilo ko-infekcije na malariju ili denga virus. Putem patogenog rtPCR -a 62 uzorka bila su pozitivna. Rezultati dobiveni putem ove dvije metode nisu puno odstupale jedna od druge. Istraživanjem se dokazalo da s metodom rtPCR s referentnim genom 16S najmanje je dokazano leptosptospira (samo u 24 uzorka).

## 4.5. Calderaro, Adriana et al. "*Leptospira* Species and Serovars Identified by MALDI-TOF Mass Spectrometry after Database Implementation." *BMC Research Notes* 7 (2014): 330. *PMC.* Web. 13 Sept. 2016.

MALDI tehnika masene spektrometrije povezana je s TOF [8]analizatorima koji mjere masu intaktnih peptida. MALDI tehnika temelji se na tome tako da se uzorak pomiješa sa spojem koji apsorbira UV zračenje (matrica). Matrica može biti sinapinska kiselina ili α-cijano-4-hidroksi-trans-cimetne kiseline. Leptospiroza uzrokovana je s više od 230 serovara patogene vrste. Cilj ovog istraživanja je omogućiti primjenu MALDI-TOF (MS) baze podataka s saprofitskim, patogenim i prijelaznim sojevima leptospira kao osnovni alat u dijagnostici i tipizaciji sojeva.

[8] Time of flight analizator (TOF) - ubrzava ione iz ionizatora pomoću homogenog električnog polja(lakši ioni brži)

Dvadeset referentnih sojeva leptospira je analizirano pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije. Analiza proteinskog spektra provedena je putem "Clin ProTools" softvera. Prema rezultatima istraživanja spektri dobiveni analizom referentnih sojeva grupirani su u 6 glavnih skupina koje odgovaraju analiziranim vrstama, naglašavajući da svaka vrsta ima svoj specifični proteinski profil. MALDI-TOF masena spektrometrija ima široku primjenu. Može identificirati patogene i nepatogene vrsta leptospira (Slika 17).




slika 17 Spektri 6 vrsta *Leptospira* dobiveni MALDI-TOF masenom spektrometrijom

Svaka metoda identifikacije *Leptospira* bitna je da se odredi izvor zaraze, te da se ustanovi dijagnoza. Metoda masene spektrometrije tehnika MALDI-TOF prvi puta je primijenjena na *Brachyspira* sojeve kod ljudi i životinja. Ova metoda se može primijeniti i kod *Borrelia spp*. Istraživanje je izvršeno u sklopu " Referentnog regionalnog laboratorija za leptospirozu" koji je u sklopu talijanskog Ministarstva zdravstva. Nastojalo se analizirati već postojeću paletu patogenih, nepatogenih i prijelaznih sojeva leptospira koje kruže Italijom. Također svrha je bila

dokazati da i masenom spektrometrijom također možemo identificirati pojedine vrste leptospira. Svi ispitivani sojevi uzgojeni su na EMJH hranjivoj podlozi pri temperaturi od $30^0$C. Kultivacija je trajala 7 dana. Sojevi pripadaju patogenim vrstama *L.interrogans, L.kirschneri, i L.borgpetersenii.*

- **MALDI-TOF MS analiza**

Nakon 7 dana rasta bakterije su izbrojene mikroskopijom. Alikvota[9] od 1 ml koja sadrži najmanje $1x10^6$ leptospira po ml korištena je za dobivanje ekstrakcije etanol/mravlje kiseline. Dobiveni ekstrakti umrljani su 40 puta na metu (eng. target plate) poliranog čelika MPS-96.

Nakon što su mrlje osušene premazane su s 1 µl matrice odnosno s α-cijano-4-hidroksicinaminskom kiselinom (HCCA), koja je otopljena u 50%-tnom cerij amonijevom nitratu (CAN) i 2,5% trifluoroctenoj kiselini. Nakon kristalizacije uzorka, uzorak se pobuđuje laserom. U ovom istraživanju korišten je Microflex LT maseni spektrometar koji je opremljen s dušikovim laserom. Prije svakog mjerenja instrument je kalibriran pomoću BTS testa (Bacterial Test Standard). Laser pobuđuje smjesu pri čemu dolazi do isparavanja matrice. Matrica prenosi molekule uzorka u plinsku fazu, pri čemu ujedno indirektno uzorak isparava. Ioni uzorka se stvaraju uslijed razmjene elektrona i protona između uzorka i pobuđene matrice.




Slika 18 Polirane čelične mete koje se koriste u masenoj spektrometriji

[9] **Alikvot** je volumen tekućine koji je točno poznati dio nekog većeg volumena(uzima se pipetom iz odmjerne tikvice).

Za svaki soj koji pripada ovim 6 vrstama leptospira (*L. interrogans , L. kirschneri , L. borgpetersenii , L. biflexa , L. noguchii i L. fainei*) MSP spektri (Main Spectrum Profile) dobiveni su pomoću MALDI-Biotyper programa, te su stavljeni u bazu Bruker Daltonics. Spektri koji su dobiveni uspoređeni su s spektrima koji se već nalaze u Brucker bazi.

## 4.6. Turk, N., Milas, Ž., Margaletic, J., Starešina, V., Slavica, A., Riquelme - Sertour, N., Bellenger, E., Baranton, G., Postic, D. : Molecular characterization of *Leptospira spp.* strains isolated from small rodents in Croatia. *Epidemiol. Infect. (2003), 130, 159–166.*

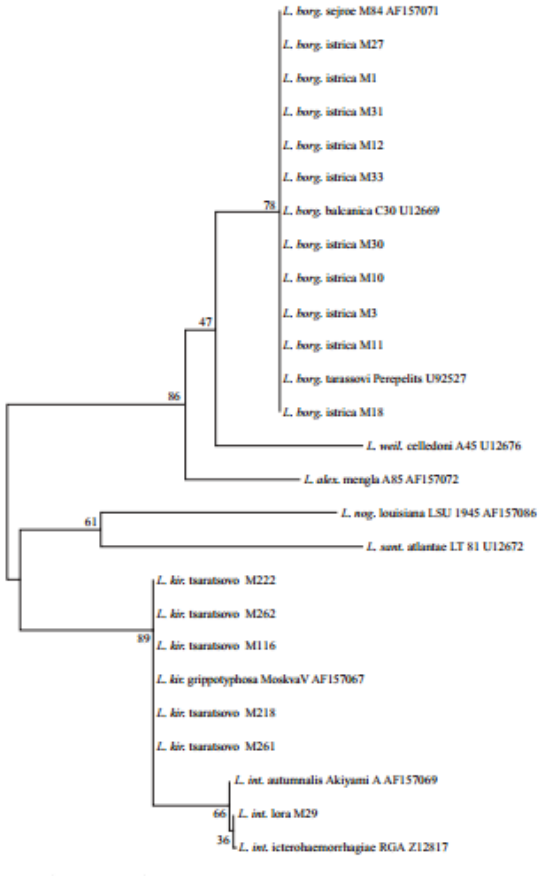
Leptospiroza u Hrvatskoj po prvi puta je opisana 1935 godine. Hrvatska spada u prirodna žarišta leptospiroze. Temelj ovog istraživanja bio je dokazati prisutnost pojedinih serovara u mišolikim glodavcima na području Hrvatske. Postoje različiti načini identifikacije i karakterizacije leptospira. U novije vrijeme CAAT metoda ili unakrižna aglutinacija- apsorpcija (eng. cross-agglutination absorption test) s zečjim antiserumom, te mikroskopski aglutinacijski test (MAT) služili su za razvrstavanje novijih otkrivenih serovara na prostoru Republike Hrvatske. Zbog dugotrajnosti i subjektivnosti CAAT metode za sigurniju klasifikaciju sojeva *Leptospira* koristi se genetska metoda.

Referentni sojevi leptospira koji su korišteni tijekom istraživanja pripadaju kolekciji iz dvije ustanove: WHO Collaboration Centre for Leptospires-Institut Pasteur (Pariz,Francuska), te Koninklijk Instituut voor de Tropen (KIT) iz Amsterdama-Nizozemska. U sklopu istraživanja izolirana su 16 izolata iz bubrega 227 sitnih glodavaca u razdoblju od ožujka do listopada 2000. godine. Sitni glodavci uhvaćeni su Sherman-ovim živim klopkama na području : Karlovca, Velike Gorice, Popovače, Kutine, Stare i Nove Gradiške, Nove Kapele, Vinkovaca, Otoka, Vrbanje, i Gunje. Sitni glodavci su determinirani i razvrstani. Izolati su se uzgajali u 5 ml Korthof-ovom tekućem mediju prije uzgajanja u EMJH tekućem mediju pri temperaturi od 30°C, kako bi dobili gustoću koja je prikladna za aglutinacijsku reakciju s 23 standardna antiseruma. Aglutinacije su provedene miješanjem jednakih količina dobro uzgojenih kultura i serijski razrijeđenih hiperimunih referentnih seruma proizvedenih u zečevima. Prilikom čitanja aglutinacije korišten je mikroskop s tamnim poljem.

Primeri (početnice) koji su korišteni kod amplifikacije prvih 330 bp 16 S rDNA gena su: LEPTOA (5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3') s položajem 38-57 i LEPTOB (5'-TTCCCCCCATTGAGCAAGATT- 3') s položajem 367-347. Unutrašnji primer sekvenciranja koji je korišten je LEPTOC (5'-CAAGTCAAGCGGAGTAGCA-3'), te RS4 (5'-TCTTAACTGCTGCCTCCCGT-3' ). Postupak sekvenciranja izvršen putem Genome Express-a. Za identifikaciju serovara koristila se metoda pulsirajuće gel elektroforeze (PFGE). Elektroforeza se koristi u molekularnoj biologiji kako bi se razdvojili fragmenti DNA molekule. Za cijepanje DNK molekule na fragmenate korištena su dva restrikcijska enzima SgrAI ili NotI. U procesu gel (1% agarozni gel) elektroforeze DNK fragmenti se razdvajaju po dužini. Dužina DNK fragmenata procijenjena je usporedbom s λ bakteriofagnim genomom s rasponom 50-1000 kb (Lambda PFG Ladder). Nakon što su gelovi obojani etidijevim bromidom snimljeni su na UV-transiluminatoru. Izolati s identičnim restrikcijskim fragmentima s oba enzima određena su kao isti serovar leptospire.

⇒ REZULTATI

Prema rezultatima istraživanja od 227 tkiva bubrega ukupno dobiveno je 16 leptospiralnih izolata od mišolikih glodavaca : *Mus musculus* (10 ), *Apodemus flavicollis* (2) i *Apodemus agrarius* (4). Rezultati PFGE analize pokazali su da 10 leptospiralnih izolata koji potječu od vrste *Mus musculus* imaju sličnosti sa serovarom Istrica serogrupa *Sejroe*, dok 5 izolata (4 *Apodemus agrarius* i 1 *Apodemus flavicollis*) slični su serovaru Tarassovi serogrupa *Pomona*. Jedan izolat iz *Apodemus flavicollis* pokazivao je sličnost sa serovarom Lora iz serogrupe *Australis*. Sličnosti izolata s određenim serovarom utvrđeni su na temelju kretanja molekularne veličine uzorka ("banding pattern"). Djelomičnim sekvenciranjem 16S rDNA gena otkrilo je pripadnost sojeva različitim vrstama leptospira : *L. borgpetersenii, L. kirschneri, L. interrogans* (Slika 19).




Slika 19 Filogenetsko stablo parcijalnih 16S rDNA sekvenci

## 4.7. Julien Dupouey, Benoît Faucher, Sophie Edouard, Hervé Richet ,Angeli Kodjo Michel Drancourt Bernard Davoust : Human leptospirosis: An emerging risk in Europe? *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 37(2) (2013)

Postoje dva tipa nadzora leptospiroze:

- aktivni – skup, vremenski ograničen i složen. Učinkovit je jer daje detaljne i precizne informacije
- pasivni - jeftiniji, temelji se na dobrovoljnim izvještajima ali nije siguran

Dijagnostički sustavi između zemalja Europske Unije se znatno razlikuju. U ovom istraživanju korišteni su podaci dobiveni iz Europskog centra za prevenciju bolesti i kontrolu, a kao dodatan izvor informacija korištene su internetske stranice PubMed i Promed . U 2010. godini u 25

europskih zemalja potvrđeno je 588 slučajeva leptospiroze. Leptospiroza je Europi veoma rijetka s obzirom na broj oboljelih po 100.000 stanovnika (Slika 20.). Razlog tome je što Europa nije dio tropskih zemalja, te su higijenski uvjeti na visokoj razini.

Stopa oboljelih od leptospiroze u pojedinim zemljama Europe :

- Rumunjska (0,84/100.000 stanovnika)
- Slovačka(0.50/100.000 stanovnika)
- Slovenija ( 0,44/100.000 stanovnika)
- Irska (0,38/100.000 stanovnika)
- Češka (0,38/100.000 stanovnika)

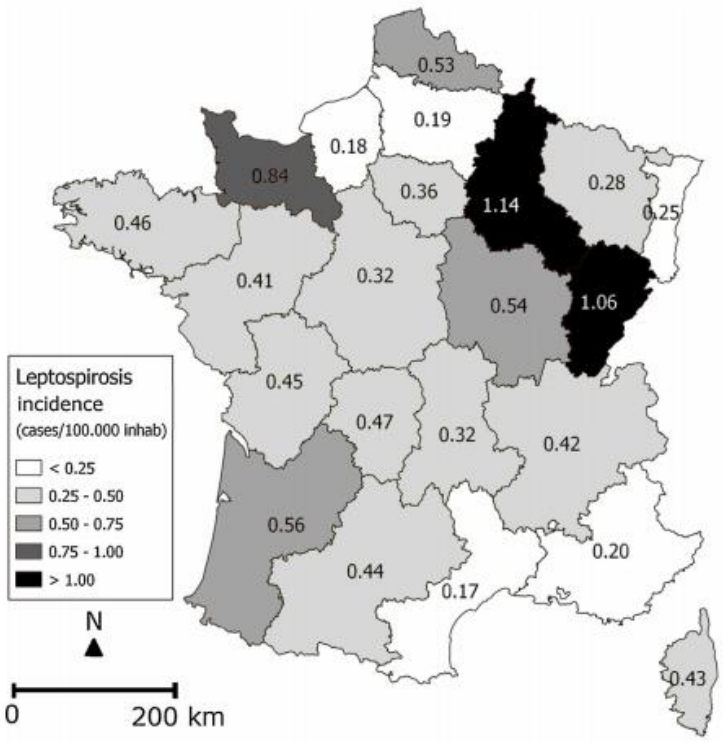
U Europi epidemije leptospiroze vezane su za jake poplave, velika događanja u sportu (maraton) i ostala društvena događanja. Za leptospirozu možemo reći da je sezonska bolest. Pojavljuje se u srpnju i listopadu, a svoj maksimum doživljava u kolovozu. Najučestaliji serovari su Icterohemorrhagiae, Grippotyphosa i Pomona. Najviše oboljeli su muškaraci (M/Ž = 4:1), dok dob oboljelih se kreće od 15 do 64 godine. Možemo reći da je leptospiroza učestalija kod muškaraca zbog zanimanja. Tijekom poplava 2012. godine u Danskoj prijavljena je mala epidemije leptospiroze. Osim slučajeva uzrokovanih poplavama sve više prijava potječe iz urbanih sredina Njemačke, Rusije i Francuske. Glavni prenositelji oboljenja su štakori. Posljednja Njemačka istraživanja navode da 84 % leptospiroze je autohtonog podrijetla, a ostatak je vezan za putovanja i avanture.

| Country | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Albania | ND | ND | ND | ND | 0.4 | 0.2 | ND | ND | ND | ND | ND |
| Austria | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.11 | 0.13 | 0.11 | 0.11 |
| Belarus | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Belgium | 0.2 | 0.3 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.08 | 0.05 | 0.07 | 0.08 |
| Bosnia and Herzegovina | 0.7 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Bulgaria | 0.4 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.4 | 0.6 | 0.26 | 0.21 | 0.12 | 0.15 | 0.15 |
| Croatia | 1.3 | 3.1 | 1.9 | 0.9 | 1.8 | 2.8 | 0.9 | ND | ND | ND | ND |
| Cyprus | ND | ND | ND | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Czech Republic | 0.1 | 1 | 0.9 | 0.2 | 0.2 | 0.5 | 0.18 | 0.23 | 0.16 | 0.31 | 0.38 |
| Denmark | 0.1 | 0.1 | 2.4 | 0.1 | 0.3 | 0.1 | 0.09 | 0.15 | 0.15 | 0.04 | 0.11 |
| Estonia | 0.3 | 0.6 | 0.1 | 0.1 | 0.6 | 0.8 | 0.45 | 0.15 | 0.15 | 0.08 | 0.08 |
| Finland | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.04 | 0.15 | 0.23 | 0 |
| France | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.3 | 0.52 | 0.55 | 0.32 | 0.06 |
| Germany | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0 | 0.1 | 0.1 | 0.06 | 0.2 | 0.08 | 0.11 | 0.09 |
| Greece | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.4 | 0.3 | 0.3 | 0.14 | 0.12 | 0.11 | 0.28 | 0.21 |
| Hungary | 0.9 | 0.6 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.27 | 0.31 | 0.15 | 0.09 | 0.09 |
| Iceland | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | ND | ND | ND |
| Ireland | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.43 | 0.51 | 0.66 | 0.56 | 0.38 |
| Italy | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.04 | 0.08 | 0.07 | 0.06 | 0.03 |
| Latvia | 1.4 | 1.6 | 0.9 | 0.4 | 0.6 | 0.3 | 0.22 | 0.09 | 0.13 | 0.22 | 0.09 |
| Lithuania | 0.6 | 0.5 | 0.8 | 0.4 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 0.18 | 0.06 | 0.15 | 0.15 |
| Luxembourg | 0 | ND | ND | ND | ND | ND | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Malta | 0 | 0.5 | 0 | 0.3 | 0.8 | 0.7 | 0.25 | 0.25 | 0.49 | 0.73 | 0.24 |
| Montenegro | 0.2 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Netherlands | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.14 | 0.23 | 0.23 | 0.15 | 0.18 |
| Norway | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | ND | ND | ND |
| Poland | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| Portugal | 0.4 | 0.8 | 0.4 | 0.7 | 0.5 | 0.3 | 0.33 | 0.36 | 0.14 | 0.3 | 0.27 |
| Republic of Moldova | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Romania | 1.6 | 1.4 | 1.5 | 1.1 | ND | 2.1 | 1.79 | 1.37 | 0.93 | 0.59 | 0.84 |
| Russia | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Serbia | ND | ND | ND | ND | 0.5 | 0.6 | 0.4 | ND | ND | ND | ND |
| Slovakia | 0.8 | 0.8 | 0.7 | 0.3 | 0.4 | 0.6 | 0.41 | 0.32 | 0.43 | 0.3 | 0.5 |
| Slovenia | 0.2 | 0.3 | 1 | 0.4 | 0.6 | 0.4 | 0.25 | 0.35 | 0.3 | 0.1 | 0.44 |
| Spain | 0 | 0.1 | 0.1 | 0 | 0 | 0.1 | 0 | ND | ND | ND | ND |
| Sweden | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.02 | 0.01 | 0.07 | 0.04 | 0.04 |
| Switzerland | 0.1 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Turkey | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | ND | ND | ND | ND |
| Ukraine | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| United Kingdom | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0 | 0.1 | 0.1 | 0.09 | 0.13 | 0.12 | 0.09 | 0.07 |

Slika 20 Stopa oboljelih od leptospiroze u Europi

- **LEPTOSPIROZA U FRANCUSKOJ**

  Svi slučajevi leptospiroze u Francuskoj prijavljuju se u Nacionalni referentni centar (Pasteur institut). Na teritoriju kojima upravlja Francuska (Karibi, Polinezija, La Réunion, Francuska Gvajana i sl.) 10-100 puta je veća incidencija leptospiroze nego u Francuskoj. Stopa oboljelih u Francuskoj Gvajani je 5/100.000 stanovnika. Francuska je među 5 zemalja s najviše oboljelih od leptospiroze. Incidencija u 2011. godini iznosila je 0,37/100.000 stanovnika, odnosno 230 slučajeva. Najučestaliji serovar kod oboljelih u 2011.godini je Icterohemorrhagiae (36% od 230 slučajeva). Štakori su osnovni rezervoari ovog serovara. Osim ovog serovara drugi najučestaliji je Grippotyphosa (21%). Leptospiroza u Francuskoj se smatra oboljenjem koje je vezano za određena zanimanja (profesionalna oboljenja) kao što su uzgajivači riba, poljoprivrednici, radnici na kanalizaciji, te zanimanja vezana za vodotoke i rijeke.




Slika 21 Stopa oboljelih na 100.000 stanovnika (Francuska)

U regiji Marseille 2011.godini došlo je do povećanja oboljelih od leptospiroze (0,22/100.000 stanovnika). U razdoblju 2001-2003. godine godišnji broj slučajeva je bio malen ( 0,12/100.000 stanovnika). Razlog povećanog broja oboljelih je povećanje broja štakora u toj regiji. Broj štakora je povećan zbog akumulacije smeća i oborina.

- **REZERVOARI**

Najvažniji serovari leptospire koje uzrokuju oboljenja kod čovjeka su : Icterohemorrhagiae (35% slučajeva), Grippotyphosa (20%) te Australis (10%). Glavni domaćin serovara Icterohemorrhagiae je štakor. Kod serovara Grippotyphosa domaćini su voluharice i ostali mišoliki glodavci, dok Australis koristi ježeve kao glavne domaćine. Glodavci su najvažniji za prijenos leptospiroze. Što su glodavci bliži ljudima to je veći vjerojatnost oboljenja. U lipnju 2001. godine prijavljeno je 5 slučajeva leptospiroze kod tinejdžera. Svi su se kupali u kanalu na području Rocheforta. Istraživanjem je dokazana prisutnost glodavaca oko kupališta. Glodavci (bizamski štakor, smeđi štakor, barska nutrija) koji su pronađeni svojim su urinom vjerojatno prenijeli leptospire u kanal. U Francuskoj 2006.godine provedeno je istraživanje na području luke Toulon. Od 52 uhvaćena štakora 10 je bilo pozitivno na

leptospire, a od 9/10 tesitranih pozitivno je bilo na *Leptospira interrogans*. Topla zima u Njemačkoj (2006-2007.godina) uzrokovala je povećanu brojnost voluharica, a s time izbijanje zaraze. Zaražene voluharice bile su zaražene serovarom Grippotyphosa. Europa s obzirom na broj oboljelih od leptospiroze je još uvijek stabilna. Iako je u većini Europe prevladavajući serovar Icterohemorrhagiae, identifikacija mora biti sigurna i točna zbog postupka liječenja oboljenja. Najveći problem je upravo širenje leptospiroze u urbanim sredinama zbog rasta broja štakora, koji je uzrokovan gomilanjem smeća.

### 4.8. Poeppl W, Orola MJ, Herkner H, Müller M, Tobudic S, Faas A, Mooseder G, Allerberger F, Burgmann H. : High prevalence of antibodies against Leptospira spp. in male Austrian adults: a cross-sectional survey, April to June 2009 . Euro Surveill. 2013;18(25):pii=20509

Istraživanje je provedeno na 400 zdravih odraslih osoba. Titar antitijela određen je na temelju mikroskopske aglutinacije korištenjem palete od 14 kultura serovara leptospira. Od 400 seruma 18 je isključeno iz testiranja jer su bili neprikladni za testiranje. Preostali uzorci (382 uzorka) pripadali su profesionalnim vojnicima (166 uzorka) i civilima (216). Leptospiroza je najčešća u tropskim područjima ali također je pronalazimo i u umjerenim područijma. Bolest je dosad bila problem tropskog područja ali sve veće promjene u klimi postaje problem razvijenih zemalja. Danas leptospiroza je pod nadzorom Europske unije. U Austriji godišnje od leptospiroze obolijeva osam do jedanaest ljudi stoga možemo reći da je incidencija veoma mala. Visoki je udio blažih oblika leptospiroze što je veliki problem kod procijene prave stope infekcije. Ovim istraživanjem se nastojalo utvrditi učestalost pojave antitijela protiv *Leptospira spp.* u zdravih osoba.

- METODE ISTRAŽIVANJA

  Serumi sudionika pohranjen je na -20$^{o}$ C do testiranja u "Nacionalnom referentnom laboratoriju za leptospiroze". Serumi su ispitivan na paleti 14 kultura referentnih serovara koji služe kao antigeni u testu mikroskopske aglutinacije. Paleta serovara sastoji se od : Australis serovara Ballico; Autmnalis serovara Akiyani; Bataviae

serovara Swart; Bratislava serovara Jez Bratislava; Canicola serovar Hond Utrecht IV; Copenhageni serovar M20; Grippotyphosa serovar Moskva V; Hardjo serovar Hardjoprajitno; Hebdomadis serovar Hebdomadis; Pomona, serovar Pomona; Pyrogenes, serovar Selanim; Saxkoebing, serovar Mus 24; Tarassovi, serovar Mitis Johnson; i Wolffii, serovar 3705. U prvom dijelu ispitivanja MAT metodom, dvostruko razrijeđen svaki serum (1:25 i 1:50) korišten je za prvu provjeru. Serumi koji su bili pozitivni nakon prve provjere titriraju se do razrjeđenja od 1:1600. Pozitivna i negativna kontrola uključena je kod prvog i drugog testiranja za svaki serum. Kao zadnje ispitivanje bilo je postaviti najviše razrjeđenje seruma na kojem se dogodila 50 %-tna aglutinacija. Titar antitijela 1 :100 smatra se kao dokaz da je bilo izlaganja leptospirama.

- REZULTATI

Od 400 sudionika osamnaest su ispitanika isključeno je iz analize, zbog nečistoće seruma. Dob ispitanika kretala se od 18 do 57 godina. Najviše je bilo muškaraca 97,1 %, te žena (2.9%). Od 382 sudionika 166 je profesionalnih vojnika te 216 je civila. MAT metodom utvrđeno je da od 382 sudionika 88 je bilo pozitivno na jedan ili više serovara *Leptospira spp.* U uzorcima identificirano je 10/14 serovara na koje su uzorci testirani. Treba se uzeti u obzir da pojedini vojnici su izvršavali svoju dužnost izvan Austrije. Leptospiroza je vrlo rijetka u Austriji. U Austriji 2011. godine prijavljeno je 9 slučaja leptospiroze (0,13/100.000 stanovnika), što je veoma nizak broj. Bez obzira na nizak broj prijava ovim istraživanjem je utvrđeno veoma visoki broj seropozitvnih osoba. Najrizičnije skupine su profesionalni vojnici, lovci, šumari i ostala zanimanja koja mogu imati kontakt s zaraženim tlom, vodom i sl. Prethodno istraživanje iz 2000. godine obuhvaćalo je 149 lovaca iz jugoistočne Austrije. Istraživanje je izvedeno na isti način kao i ovo. Od 149 lovaca 10 % je bilo seropozitivno. U rizičnu skupinu također spadaju sportaši. U Njemačkoj 1998.godine povećala se stopa oboljenja od leptospiroze. Kao uzrok povećanja u Austriji možemo navesti putovanja u Njemačku.

Osim toga putovanja u jugoistočnu Aziju gdje je leptospiroza veoma endemična, također može povećati stopu leptospiroze. Prema istraživanju iz 2000.godine kao dominantni serovar u Austriji bio je Bratislava (73%), nakon čega slijedi Hardjo (20%). Ovim istraživanjem (2009.godina) utvrđeno je kako dominantan serovar u Austriji je Canicola (71%), Hardjo (51%), Copenhageni (22%) i Bratislava (12,5%) (Slika 22.). Canicola i Copenhageni, ali i Bratislava, česti su serovari kod pasa. Istraživanjem nije se moglo utvrditi

dali je seropozitivnost povezana s posjedovanjem pasa, odnosno dali je ona uzrokovana boravkom u ruralnim ili urbanim sredinama. Ovim istraživanjem utvrđeno je povećanje stope leptospiroze u Austriji u posljednjih deset godina. Blage infekcije leptospiroze najčešće ostaju nezapažene, odnosno dolazi do krive dijagnoze. Zbog krive dijagnoze dolazi do male stope leptospiroze u Austriji.

**TABLE 2**

Distribution of 14 serovars of *Leptospira* in 88 healthy Austrians testing positive for antibodies against *Leptospira* spp., Austria, April–June 2009

| | Canicola | Hardjo | Copenhageni | Bratislava | Tarassovi | Pyrogenes | Saxkoebing | Grippotyphosa | Pomona | Bataviae | Wolffii | Australis | Autumnalis | Hebdomadis |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Canicola | 63 | 31 | 17 | 8 | 7 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hardjo | | 45 | 15 | 2 | 7 | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Copenhageni | | | 19 | 2 | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Bratislava | | | | 15 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tarassovi | | | | | 10 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pyrogenes | | | | | | 4 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Saxkoeing | | | | | | | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Grippotyphosa | | | | | | | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pomona | | | | | | | | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Bataviae | | | | | | | | | | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Wolffii | | | | | | | | | | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Australis | | | | | | | | | | | | 0 | 0 | 0 |
| Autumnalis | | | | | | | | | | | | | 0 | 0 |
| Hebdomadis | | | | | | | | | | | | | | 0 |

The numbers may not sum up in the totals (shown in grey) because some serum samples were positive for multiple serovars.

Slika 22 Rezultati testiranja na serovare *Lepotospira spp*. u 2009.godini

## 4.9. Hoffmeister, Bodo et al. “Differences in Clinical Manifestations of Imported versus Autochthonous Leptospirosis in Austria and Germany.” The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 83.2 (2010): 326–335. PMC. Web. 28 Aug. 2016.

Leptospiroza može se manifestirati kao vrlo teško do vrlo blago oboljenje. Na vrlo teška oboljenja otpada 5-10% slučajeva. Teže oboljenje od leptospiroze naziva se Weil-ov sindrom. Njega karakterizira: žutica, zatajenje bubrega, krvarenje, te stopa smrtnosti 5-15 %. U zemljama kao što je Kina, Peru, Indija sve više prisutni su teški anikterični oblici koje karakterizira : teška plućna krvarenja, sindrom akutnog respiratornog distresa. Stopa smrtnosti je do 50 % i veća nego kod Weil-ovog sindroma. Austrija i Njemačka su zemlje u kojima je incidencija leptospiroze veoma niska. Godišnja incidencija leptospiroze u Njemačkoj je 0,06/100.000 stanovnika. Međunarodna putovanja u druge zemlje svijeta dovela su do povećanja incidencije u Austriji i Njemačkoj. U periodu od 1998-2008. godine u Njemačkoj i Austriji zabilježena su 24 uvezene i 35 autohtonih slučaja leptospiroze. Osnovni cilj ovog istraživanja je bio istražiti da li postoje razlike između autohtonog i uvezenog oboljenja od leptospiroze. Oboljeli tokom perioda 1998 – 2008. godine liječeni su u 5 njemačkih i 1 austrijskom kliničkom centru. Ovi slučajevi uključeni su u istraživanje.

Tablica 7 Slučajevi leptospiroze koji su liječeni u njemačkim/austrijskim kliničkim centrima

| Austrija | Oboljeli (Austrija) | Njemačka | Oboljeli (Njemačka) |
|---|---|---|---|
| **Grad** | | **Grad** | |
| Graz | 4 | Berlin | 26 |
| | | Hamburg | 7 |
| | | Munich | 3 |
| | | Hannover | 6 |
| | | Freiburg | 13 |

⇒ METODE ISTRAŽIVANJA

Oboljenje od leptospiroze je utvrđeno na temelju određenih smjernica po " Nacionalnom Njemačkom institutu za nadziranje bolesti Robert Koch". Te smjernice su : barem jedan klinički simptom (vrućica, simptomi nalik gripi, disfunkcija bubrega, žutica, kašalj, meningitis, krvarenje, miokarditis i sl.) uz laboratorijsku potvrdu pozitivne kulture, pozitivan PCR, serokonverzija (četverostruki porast titra antitijela u uzastopnim uzorcima) ili pozitivan ELISA test. Ovi testovi se mogu potvrditi dodatnim testiranjem MAT metodom (mikroskopska aglutinacija) i CFT (test fiksacije komplementa). Testom fiksacije komplementa se mjeri protutijelo koje se troši u serumu ili likvoru. Uzorak se inkubira s poznatim količinama komplementa i antigenom (cilj za protutijelo). Stupanj fiksacije komplementa ukazuje na količinu tog antigena u uzorku. Simptomi svakog pacijenta su dobro istraženi. Kod Weil-ovog sindroma definirana su tri osnovna simptoma prema kojima se može prepoznati teži oblik oboljenja: žutica, ARF (akutno zatajenje bubrega), krvarenja.

Slučajevi prilikom istraživanja kategorizirali su se prema težini :

- blaga/asimptomatska kod bolesnika s subkliničkom bolesti
- umjerena/ samo -ograničavajuća kod bolesnika s sistemskim febrilnim oboljenjem
- teška/opasna po život u bolesnika s jednim ili više neovisnih čimbenika za smrt

Istraživanje je provedeno na 59 odraslih bolesnika : 8 žena (14%) i 51 muškarac (86%). Dob se kretala od 18 – 71 godine . Od ukupno oboljelih 24(41%) bolesnika oboljelo je izvan Austrije/ Njemačke, a 35 (59%) u svojoj domovini. Bez obzira na dob i spol vrijeme pojave simptoma je podjednako (nema statistički značajne razlike). Eventualne razlike između dobnih skupina temelje se na tome da mlađe dobne skupine su oboljele češće od uvozne infekcije (oboljeli izvan domovine). Najveće stope pojave bolesti su zabilježene između kolovoza i studenog. Glavni uzrok oboljenja je bilo izlaganje vodi (plivanje, rafting). Bolesnici s uvezenom leptospirozom najčešće su putovali po Karibima (10 slučajeva ,42%), Azija (9 slučajeva,38%), istočna Europa (3 slučaja, 13%), srednja Amerika (1 ,4 %) i južna Amerika (1 ,4%). Najčešći simptomi kod pacijenata s uvezenom leptospirozom je bila : groznica (96%), mijalgija (79%) obično u lumbalnoj regiji i listovima, te manjak energije (75 %). Dok među oboljelima od autohtone

leptopsiroze najčešći simptomi su bili : sepsa ( 80%), zatajenje bubrega (77%) i žutica ( 69%). Od 24 bolesnika s uvezenom leptospirozom samo 3 slučaja su bila ikterična, a ostali za koje se smatralo da bi mogli biti teži oblici ostali su anikterični. Probavne manifestacije leptospiroze češće su bile kod autohtonih nego kod uvezenih leptospiroza. Kod četiri autohtone infekcije manifestirali su se simptomi akutnog pankreatitisa i kolecistitisa. Pogoršanje se dogodilo u devet ikteričnih bolesnika s autohtonom infekcijom. Kod uvezene infekcije u dvanaest bolesnika (50%) dokazana je smanjena funkcija bubrega, dva bolesnika (8%) su imala razvijenu oliguriju, jedan bolesnik (4%) anuriju , dok dvojici bolesnika (8%) je bila neophodna dijaliza. Oštećenja bubrega kod autohtonih infekcija bila su česta pojava kod pacijenata (27 pacijenata ili 77%). Oligurija se pojavila kod 5 pacijenata (4%), dok anurija u 4 pacijenta (11%). Weil-ov sindrom kod autohtone infekcije se zakomplicirao u 6 % slučajeva (2 pacijenta) te prouzrokovao diseminiranu intravaskularnu koagulaciju[10]. Kardiovaskularni problemi su se javljali isključivo kod autohtonih infekcija. Žutica je češća bila kod bolesnika koji su se inficirali u Austriji i Njemačkoj u odnosu na bolesnike koji su se inficirali izvan svoje domovine. Iako se smatralo da je žutica također povezana s dobi (starija dob) regresijskom analizom ova teza je odbačena. Prilikom analiziranja s multivarijantnom analizom (promatra više povezanih varijabli) koja je uključivala dob, razmjer ikteričanih /anikteričnih oboljenja znatno se razlikovao između autohtonih i uvezenih slučajeva (infekcija). Kada je riječ o smrtnim slučajevima kod uvezenih infekcija nije bilo smrtnih ishoda, dok kod autohtonih infekcija dva pacijenta su umrla.

⇒ REZULTATI

Leptosprioza je nedovoljno prepoznata bolest i to je jedan od ključnih problema prilikom liječenja. Žutica je ključni simptom prema kojemu možemo razlikovati teži od lakšeg oblika leptospiroze. Odsustvo žutice nosi potencijal da se bolest zakomplicira zbog odgađanja dijagnoze i neadekvatnog liječenja. U prošlosti je bilo slučajeva gdje je upravo žutica bila ključan simptom po kojemu se mogla razlikovati leptospiroza od denga groznice (Brazil 1996. godina). Tijekom istraživanja pacijenti s uvezenom infekcijom većinom su svrstavani u kategoriju s manje teškim simptomima. Takvi simptomi se također mogu zakomplicirati i

[10] **Diseminirana intravaskularna koagulacija** - je stanje u kojemu se mali krvni ugrušci rasprostiru krvnom strujom, začepljuju male krvne žile i troše faktore zgrušavanja potrebne za sprječavanje krvarenja.

postati smrtonosni(npr. respiratorna insuficijencija). Teško bolesni pacijenti s autohtonom infekcijom ostali su anikterični, dok neki pacijenti s uvezenom infekcijom i blagim simptomima postali su ikterični. Naime, žutica ne može biti temelj identifikacije težeg oboljenja. Leptospiroza kao bolest još uvijek nije dovoljno istražena. Uzrok neistraženosti je specifičan patogeni mehanizam leptospira. Postoje dva razloga zašto se žutica pojavljuje kod leptospiroze: oštećenje jetre i hemoliza. Oboje dovode do masovnog porasta serumskog bilirubina[11]. Leptospire mogu napasti sinuse i Dissé-ov prostor jetre uništavajući tako interlobulusne kanaliće. Zbog toga bilirubin prelazi u krv. Također leptospire mogu napasti hepatocite[12] i uzrokovat uništavnje jetre. Ovim istraživanjem procijenjena je ozbiljnost bolesti na temelju kvantifikacije nezavisnih faktora rizika za smrt. Prema prijašnjim istraživanjima oligurija je najjači pojedinačni prediktor. Prisutnost triju najjačih prediktora (oligurija, promjena mentalnog stanja i dob > 30 godina) imalo je 82 % točnosti predviđanja smrti kod pacijenta( Ko i sur., 1999). Liječenje leptospiroze sastoji se od agresivnih simptomatskih mjera. Terapiju najbolje pokrenuti u roku od 4 ili manje dana nakon početka simptoma kako bi se smanjilo posredno imunološko oštećenje organa.

[11] **Bilirubin** je glavni produkt raspada crvenih krvnih stanica. Jetra razgrađuje bilirubin u žuč.
[12] **Hepatocit** stanica tikva jetre. Čine 70-80% jetrene mase, te iniciraju formiranje i izlučivanje žuči.

# 5. RASPRAVA I ZAKLJUČAK

Leptospiroza je još uvijek nedovoljno istraženo područje. Razlog toga je specifičan način patogeneze leptospira. Leptospire imaju sposobnost prilagoditi se uvjetima oko sebe. Prema molekularnoj metodi klasifikacije imamo intermedijarne vrste leptospira, čija patogenost ovisi o imunitetu domadara i okolini. U nekim slučajevima mogu biti patogene u nekim ne. Genetika ima veoma važnu ulogu u spoznavanju leptospiroze . Kloniranje i analiziranje gena leptospira pomoći će nam u spoznaji. Najveći problem današnjice nisu arhaična žarišta leptospiroze koja su vezana za divlje životinje, već sinantropna žarišta vezana za sivog štakora i kućnog miša. Sivi štakora uveden je iz Euroazije u zapadnu Europu u 18.stoljeću. Sve su češći slučajevi oboljenja od leptospiroze u urbanim sredinama. Loše upravljanje otpadom (nagomilavanje otpada) uzrokuje zadržavanje i povećavanje brojnosti štakora, a i s time širenje bolesti. Upravo serovar Icterohaemorrhagiae prednjači kao uzročnik oboljenja u urbanim sredinama, jer je sivi štakor glavni njegov rezervoar. Osim toga čovjek sam mijenja okoliš, uzgaja životinje s time je omogućio da leptospire pronađu novi način održavanja svog ciklusa i to kroz domaće životinje i kućne ljubimce (evolucijski domadari). Primjerice smatra se da je glavni domadari serovara Canicola su psi, ali kod pasa ovaj serovar izaziva jako tešku bolest pa i smrt. Uzrok toga je slaba adaptacija serovara na domadara. Istraživanje u Austriji je dovelo do rezultata seropozitvnosti na serovar Canicola, Copenhageni i Bratislava (česti su kod pasa), ali sa sigurnošću se nije moglo ustvrditi dali je seropozitivnost uzrokovana posjedovanjem pasa ili da se zaraza dogodila u urbanim/ruralnim područjima. U Hrvatskoj leptospiroza najviše je prouzrokovana serovarima iz skupina: *Australis, Sejroe, Grippotyphosa, Pomona* i *Icterohaemorrhagiae. Istraživanje* tijekom 2007. godine dokazano je da u ljudskim i životinjskim izolatima najviše se pojavljuju serovari Australis i Grippotyphosa. Oba serovara vezana su za voluharice i za miševe. Serovar Australis je u Hrvatskoj izoliran iz 4 vrste mišolikih glodavaca: poljski miš, šumski miš, žutogrli miš, šumska voluharica. Hrvatska spada u arhaična žarišta stoga se i očekuje da dominiraju ova dva serovara, pošto ovaj tip žarišta je vezan za šumske ekosustave. U ostalim zemljama Europe najviše dominiraju serovari Icterohaemorrhagiae i Copenhageni koji su više vezani za sinantropna žarišta (glavni rezervoari : sivi štakor, kućni miš, domaća svinja). Razlog toga je velika urbanizacija. Danas istraživanjima nastoji se poboljšati sustavi identifikacije leptopira, kako bi se što prije odredio uzročnik. Određivanje uzročnika je ključno u određivanju odgovarajuće terapije. Pošto početni simptomi leptospiroze su veoma slični gripi, malariji, denga groznici bitno je odredit što prije uzročnika, jer kriva dijagnoza uvijek dovodi do komplikacija (oštećenje organa, zatajenje

organa i sl.). Razvitak novih metoda omogućit će olakšanu dijagnozu i liječenje. U svim europskim zemljama treba se uskladiti dijagnostičke sustave. U Europi sve je veći broj oboljelih od leptospiroze izvan svoje domovine. Razlog toga su putovanja u rizične zemlje svijeta (tropske zemlje) u svrhu avantura, putovanja i sl. Povećanje stope oboljelih u europskim zemljama možemo pridodati putovanjima. Europa još uvijek ima nisku stopu oboljelih od leptospiroze. Rizične skupine (šumari, triatlonci, veslači, planinari i sl.) koje obitavaju duže vrijeme u prirodi trebaju se zaštititi: pranjem ruku, zaštita hrane i vode, odgovarajuća obuća i odjeća i sl. Higijena, poboljšanje dijagnostike te deratizacija spriječiti će širenje leptospiroze.

## 6. LITERATURA


1. Spirohete .// Medicinska mikrobiologija/ Bedenić Branka,2009.Str. 487-498
2. Bolesti divljači. // Lovstvo/ Maks Karlović. Zagreb: Hrvatski Lovački Savez 2004.Str. 324
3. Prezentacija kolegija Zoonoze u šumskim ekosustavima prof.dr.sc Josip Margaletić
4. Vesna Mojčec Perko doktorski rad : Raznolikost gena glavnoga sustava tkivne podudarnosti skupine II u konja prirodno inficiranih patogenim bakterijama iz roda Leptospira (Izvor : http://digre.pmf.unizg.hr/3592/1/Doktorat%20Vesna%20Moj%C4%8Dec.pdf)
5. Zoonoze.// Stomatološka mikrobiologija/ Presečki V. Zagreb : Medicinska naklada ,2009. Str. 124-125
6. Marko Vucelja doktorski rad : Zaštita od glodavaca( Rodentia,Murinae, Arvicolinae) u šumama hrasta lužnjaka (Quercus robur L.)- Integrirani pristup i zoonotički aspekt


**Web izvori :**


1. Balen Topić, M., Beus, A. (2005). Leptospiroza: naznake promjene kliničke slike u Hrvatskoj. Infektološki glasnik, 25(4), 143-149. Preuzeto s http://hrcak.srce.hr/17899
2. Calderaro, Adriana et al. “Leptospira Species and Serovars Identified by MALDI-TOF Mass Spectrometry after Database Implementation.” BMC Research Notes 7 (2014): 330. PMC. Web. 13 Sept. 2016.
3. Hoffmeister, Bodo et al. “Differences in Clinical Manifestations of Imported versus Autochthonous Leptospirosis in Austria and Germany.” The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 83.2 (2010): 326–335. PMC. Web. 28 Aug. 2016.
4. Julien Dupouey, Benoît Faucher, Sophie Edouard, Hervé Richet ,Angeli Kodjo Michel Drancourt Bernard Davoust : Human

leptospirosis: An emerging risk in Europe? Comparative immunology, microbiology and infectious diseases 37(2) (2013) – Izvor : https://www.researchgate.net/publication/259509796_Human_leptospirosis_An_emerging_risk_in_Europe

5. Miklaušić, B., Pandak, N., Čabraja, I., Šiško, M. (2015). Utjecaj klimatskih elemenata na pojavnost leptospiroze u Brodsko-posavskoj županiji. Infektološki glasnik, 35(2-3), 67-73. Preuzeto s http://hrcak.srce.hr/153795
6. Milas, Z., Turk, N., Starešina, V., Margaletić, J., Slavica, A., Živković, D., Modrić, Z. (2002). The role of myomorphous mammals as reservoirs of leptospira in the pedunculate oak forests of Croatia.. Veterinarski arhiv, 72(3), 119-129. Preuzeto s http://hrcak.srce.hr/79873
7. Poeppl W, Orola MJ, Herkner H, Müller M, Tobudic S, Faas A, Mooseder G, Allerberger F, Burgmann H. : High prevalence of antibodies against Leptospira spp. in male Austrian adults: a cross-sectional survey, April to June 2009 . Euro Surveill. 2013;18(25):pii=20509
8. Štritof Majetić, Z., Habuš, J., Milas, Z., Mojčec Perko, V., Starešina, V., Turk, N. (2012). A serological survey of canine leptospirosis in Croatia - the changing epizootiology of the disease.. Veterinarski arhiv, 82(2), 183-191. Preuzeto s http://hrcak.srce.hr/78271
9. Turk, N., Milas, Ž., Margaletic, J., Starešina, V., Slavica, A., Riquelme - Sertour, N., Bellenger, E., Baranton, G., Postic, D. : Molecular characterization of Leptospira spp. strains isolated from small rodents in Croatia. Epidemiol. Infect. (2003), 130, 159–166.
10. Turk, N., Milas, Z., Habuš, J., Štritof, Z., Mojčec, V., Modrić, Z., Starešina, V., Postic, D. (2008). Identificiranje i tipiziranje Leptospira spp. primjenom metode raznolikosti dužine restrikcijskih fragmenata rDNK za gen 16S (RFLP) i gel elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE). Infektološki glasnik, 28(4), 173-182. Preuzeto s http://hrcak.srce.hr/43725

11. Waggoner JJ, Balassiano I, Abeynayake J, et al. Sensitive Real-Time PCR Detection of Pathogenic Leptospira spp. and a Comparison of Nucleic Acid Amplification Methods for the Diagnosis of Leptospirosis. Lin B, ed. PLoS ONE. 2014;9(11):e112356. doi:10.1371/journal.pone.0112356.
12. http://www.adiva.hr/leptospiroza-ili-zetvena-gripa-je-najcesca-zoonoza.aspx
13. http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/infektologija/spirohete/leptospiroza
14. http://veterina.com.hr/?p=34540 (Dijagnostika i suzbijanje leptospiroze konja u hrvatskoj)
15. http://veterina.com.hr/?p=49406 (Leptospiroza – Zaboravljena Bolest Prirodnih Žarišta)
16. http://crometeo.hr/2015-najtoplija-godina-na-zemlji-u-povijesti-mjerenja-temperatura/
17. http://www.plivazdravlje.hr/medicinski-leksikon
18. http://www.zzjzdnz.hr/hr/zdravlje/prevencija-zaraznih-bolesti/653
19. https://en.wikipedia.org/wiki/Matrix-assisted_laser_desorption/ionization
20. http://veterina.com.hr/?p=32144 (Nove tehnologije u veterinarskoj medicini – spektrometrija masa)
21. https://hr.wikipedia.org/wiki/Leptospiroza
22. https://en.wikipedia.org/wiki/Leptospirosis