



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

IVA ZEČEVIĆ

**CILJNO SEKVENCIRANJE KLJUČNIH
REGIJA U ANALIZI GENOMA
BAKTERIJE *LEPTOSPIRA* SPP. I
PREDVIĐANJU KLINIČKE SLIKE I
ISHODA BOLESTI U PASA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

IVA ZEČEVIĆ

**CILJNO SEKVENCIRANJE KLJUČNIH
REGIJA U ANALIZI GENOMA
BAKTERIJE *LEPTOSPIRA* SPP. I
PREDVIĐANJU KLINIČKE SLIKE I
ISHODA BOLESTI U PASA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

Faculty of Veterinary Medicine

IVA ZEČEVIĆ

**CORE GENOME SEQUENCING OF
LEPTOSPIRA SPP. IN PREDICTION OF
CLINICAL SEVERITY AND OUTCOMES
IN DOGS**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Assoc. Prof. Josipa Habuš, PhD

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

I Z J A V A

Ja, Iva Zečević potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mogega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima do onih navedenih u radu.

(potpis studenta)

Zagreb, 2024.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Josipi Habuš na strpljenju, razumijevanju, stručnoj i znanstvenoj pomoći te moralnoj podršci tijekom izrade ove doktorske disertacije.

Posebno zahvaljujem dr. sc. Vesni Mojčec Perko na bezuvjetnoj pomoći, stručnim, znanstvenim i prijateljskim savjetima.

Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom na podršci.

Veliko hvala predstojniku Zavoda, prof. dr. sc. Vilimu Starešini na svakom razgovoru, financijskoj i moralnoj podršci.

Veliko hvala prof. dr. sc. Suzani Hađini na svakom razgovoru, svakom smijehu, svakoj riječi potpore i uvijek vrijednim životnim savjetima.

Hvala prof. Zvonimiru Poljaku na pomoći prilikom izrade ove doktorske disertacije.

Hvala dr. sc. Mathieu Picardeau na znanstvenoj pomoći prilikom izrade ove doktorske disertacije.

Eleni i Ivani zahvaljujem na bezuvjetnom prijateljstvu i bezgraničnoj podršci u trenucima kad mi je bilo najpotrebnije, bez njih niti ja niti ova struka ne bi bili isti.

Veliko hvala Matku na bezgraničnom strpljenju i podršci, jer vjeruje i kad ja ne vjerujem i uvijek je tu i kad je najteže.

Najveće hvala mami, tati i bratu na svemu jer bez njih ništa od ovoga ne bi bilo moguće!

SAŽETAK

CILJNO SEKVENCIRANJE KLJUČNIH REGIJA U ANALIZI GENOMA BAKTERIJE *LEPTOSPIRA* SPP. I PREDVIĐANJU KLINIČKE SLIKE I ISHODA BOLESTI U PASA

Leptospiroza je re-emergentna zoonoza koja se u pasa očituje različitim kliničkim oblicima, od blagih subkliničkih infekcija do teških septikemijskih oblika s visokom smrtnošću. Različiti serovari leptospira mogli bi biti povezani s različitim kliničkim očitovanjem bolesti, no tipizacija uzročnika otežana je zbog iznimne heterogenosti ovih bakterija i njihove stalne genske i fenotipske prilagodbe. Cilj ovog istraživanja bio je istražiti razlučivost novih molekularnih metoda i utvrditi bi li identifikacija specifičnog genotipa mogla biti korisnija u predviđanju kliničkih ishoda, usmjeravanju liječenja i provedbi učinkovitih preventivnih mjera. Među pretraživanim izolatima uvrđene su dvije genomske vrste, *L. interrogans* i *L. kirschneri*, za čiju su determinaciju korištene dvije različite molekularne metode (amplifikacija odsječaka *secY* gena i rMLST). Jednostavnija *secY* metoda pokazala se dovoljnom za identifikaciju ograničenog broja genomskih vrsta prisutnih na području Hrvatske. Sekvenciranje ključnih regija genoma ponudilo je veću diskriminatornu moć u usporedbi s konvencionalnim MLST-om te se pokazalo korisnim u praćenju puteva prijenosa i proučavanju evolucijskih odnosa unutar roda. Iako je visoka diskriminatorna moć cgMLST-a prednost, dodjeljivanje različitih ST-ova za svaki izolat nije se pokazalo najprikladnijim jer nije omogućilo grupiranje izolata na razini koja bi se mogla koristiti za epidemiološke i kliničke predikcije. Serovar Copenhageni po prvi je put identificiran u Hrvatskoj, a uvrđeno je i da su infekcije ovim serovarom povezane s lošim ishodima liječenja. Dobiveni rezultati naglašavaju potrebu uključivanja ovog serovara u antigene panele koji se koriste za serološku dijagnostiku leptospiroze. Utvrđena je i visoka prevalencija serovara Mozdok, serološke skupine Pomona, što ponovno dovodi u pitanje učinkovitost i potrebu za prilagodbom postojećeg cjepiva. Iako nije utvrđena povezanost između soja koji je uzrokovao infekciju i kliničkog očitovanja, vjerojatno zbog relativno malog broja uzoraka i velikog broja kliničkih varijabli, nedvosmisleno je utvrđeno da se genotipizacija izolata može koristiti u predviđanju ishoda bolesti. Infekcije uzrokovane *L. interrogans*, serološkom skupinom Icterohaemorrhagiae, klonalnom grupom 6 i serovarom Copenhageni bile su povezane s lošijim ishodom. Povezivanje genomskih podataka s kliničkim i epidemiološkim podacima unaprijeđuje naše razumijevanje bolesti i povećava učinkovitost preventivnih mjera kontrole.

Ključne riječi: leptospiroza, *Leptospira* spp., MLST, cgMLST, pas

EXTENDED ABSTRACT

CORE GENOME SEQUENCING OF LEPTOSPIRA SPP. IN PREDICTION OF CLINICAL SEVERITY AND OUTCOMES IN DOGS

Introduction. Leptospirosis is a significant re-emerging zoonotic disease affecting domestic animals, wildlife as well as humans, caused by pathogenic serovars of the *Leptospira* genus. Rodents are considered the main reservoirs of the disease and play a crucial role in the transmission of the disease. In dogs, it is primarily transmitted through direct contact with urine from infected animals or reservoirs and indirectly through contaminated water or soil. Leptospirosis ranges from mild subclinical infections to severe disease, which includes leptospiral pulmonary haemorrhagic syndrome (LPHS) and acute renal and liver failure with a high mortality rate. The clinical signs in dogs depend on factors such as the serovar present and the immune status of the host. Some serovars tend to be more invasive and may cause more severe clinical signs. To date, more than 300 serovars have been described, of which over 200 are associated with pathogenic species. The variety of clinical manifestations and the adaptability of leptospires make the task of identifying the pathogen even more complex.

Dogs are considered to be maintenance hosts for serovar canicola. The constant introduction of pathogen variants, climate change and the low effectiveness of vaccines against new serovars have probably led to a change in the predominant serovars. In Croatia, the serovars Pomona, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae and Bratislava are the predominant serovars causing disease in dogs.

The gold standard serological test for the diagnosis of leptospirosis is the microscopic agglutination test (MAT), but it has several limitations, including the need for live cultures, standardisation difficulties and cross-reactions between related serovars. These limitations are being overcome by the increasing use of molecular methods to detect pathogenic leptospires, with the aim of identifying serovars or strains and linking this to clinical presentations and treatment outcomes. Traditional molecular methods such as Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Multilocus Sequence Typing (MLST) have often proven inadequate, while Next-Generation Sequencing (NGS) has brought a significant improvement in providing higher resolution and genomic insights. To achieve higher resolution, molecular typing methods based on multilocus sequences with a larger number of genes (545 in total) have been developed (Core Genome Multilocus Sequence Typing (cgMLST)), generating data sets on the genetic diversity of *Leptospira* and its epidemiology, thus contributing to improved disease control and

prevention strategies. CgMLST allows us not only to monitor the spread and evolution of specific strains, but also to understand their pathogenicity and improve strategies for treatment and the development of effective vaccines.

The aim of this study was to identify leptospiral strains from canine clinical samples and to develop protocols for molecular typing and genomic classification that allow a better understanding of epizootiology and prediction of clinical manifestations. CgMLST extends the concept of conventional methods and is proving to be a useful high-resolution typing method in other bacterial species, so we anticipate that it could be an important tool for the typing and classification of *Leptospira*.

Materials and methods. In this study, urine and blood samples were collected from dogs during routine clinical examinations at the Clinic for Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb. The dogs were either suspected of having leptospirosis or the diagnosis was confirmed. Detailed clinical data were recorded for each dog, including clinical manifestations, results of haematological and biochemical analyses (liver and kidney parameters) and clinical findings.

Multilocus sequence typing (MLST) was used to detect genetic relatedness between different *Leptospira* strains isolated from dogs. This method, developed by combining the sequencing of four housekeeping genes (*adk*, *icdA*, *rrs2*, *secY*) and two lipopolysaccharides (*LipL32*, *LipL41*), facilitated the classification of *Leptospira* strains into sequence types based on their allelic profiles.

All isolates were subjected to core genome MLST (cgMLST) for higher resolution genotyping. This method utilises different 545 genes in the entire core genome of *Leptospira* and allows a high resolution of genetic variations and the corresponding lineages. The identification of clonal groups among the isolates was further supported by the cgMLST scheme.

The correlations between the severity of clinical manifestations and overall clinical outcomes and the different clonal groups were statistically analysed. Differences in distribution between groups were examined using Fisher's exact test and the χ^2 test. The association of individual variables was determined using the Kaplan-Meier and Cox regression model (for categorical variables) and logistic regression (for quantitative variables) and was expressed as

relative risk (RR) with a 95% confidence interval (CI). A p-value of <0.05 was considered statistically significant.

Results. Microscopic agglutination tests with 14 hyperimmune sera revealed that six isolates belonged to the Pomona serogroup, while the remaining 13 were assigned to the Icterohaemorrhagiae serogroup, with antibody titres ranging from 3200 to 25600.

Genomic analysis classified the isolates into *L. interrogans* (n=12) and *L. kirschneri* (n=8). PCR amplification and sequencing of the *secY* gene fragments (624-650 bp) confirmed these species designations, and phylogenetic analysis showed clear clustering of the isolates into these two genomic species.

Further multilocus sequence typing (MLST) analysis for the genes *adk*, *icdA*, *LipL32*, *LipL41*, *rrs2* and *secY* revealed varying degrees of polymorphism. The highest variability was observed for the genes *adk* and *secY* with 10.5 % and 9.2 % polymorphic sites, respectively. Phylogenetic analysis of these loci supported the unambiguous classification of the isolates into their respective genomic species. The MLST data also provided additional resolution to identify the sequence type for each isolate. All *L. interrogans* isolates belonged to sequence type 2 (ST 2), which is comparable to 159 isolates in the PubMLST database that were determined to be *L. interrogans*, serogroup Icterhaemorrhagaie, serovar Copenhageni, or Icterhaemorrhagaie. In contrast, the *L. kirschneri* isolates mainly belonged to sequence type 98 (ST 98), comparable to 13 isolates in the same database that were identified as *L. kirschneri*, serogroup Pomona, Serovar Mozdok or Tsaratsovo. It is noteworthy that one isolate, "Dankić", had a unique sequence type, ST 198, which is not present in other recorded isolates. The MLST analysis was not able to distinguish between the isolates at the serovar level. The sequence identity matrix generated with BioEdit 7.0 did not show 100% identity between all isolates belonging to the same genomic species and serovar. The identity between the genomic species of *L. interrogans* and *L. kirschneri* ranged from 86.8 % to 95 %, with the lowest identity within the *L. kirschneri* species at 90.7 %. In addition, the comparison between each isolate and the corresponding reference strain showed a maximum identity of 96.5% for the Mozdok and Copenhageni serovars and a minimum identity of 88.8% for the Icterohaemorrhagiae serovar. The reference strains for Icterohaemorrhagiae and Copenhageni showed an identity of 99.9%. Phylogenetic analysis of the isolates resulted in a division into two groups according to their genomic species. Within the *L. kirschneri* group, a further subdivision was observed, with one subgroup containing only the isolate "Dankić"

In order to obtain a higher resolution in genetic analysis and a better insight into genetic variations, we used a novel approach involving the sequencing of 545 nuclear genes. This method enabled the identification of clonal groups (CG) and sequence types (cgST) based on cgMLST allele profiles with a threshold of 40 allelic differences. Each isolate had a unique sequence type, with the exception of two isolates (Asja and Bo), which had additional sequence types (990 and 997). The genome size ranged from 4.4 to 4.6 Mbp with a G+C content between 35.02% and 35.89%. Since the ribosomal multilocus sequence typing genes (rMLST) are contained in the core genomic regions, it was possible to confirm the genomic species of the isolates determined by *secY* after cgMLST sequencing. Phylogenetic analysis of the core genome regions and comparison with reference strains confirmed that the isolates belonged to their respective genomic species and serogroups.

The analysis of clonal groups revealed that all isolates of *L. interrogans* were assigned to clonal group 6, while the isolates of *L. kirschneri* were assigned to clonal group 73. Different serovars were identified within these clonal groups, suggesting that clonal groups do not accurately determine the serovar within the same genomic species and serogroup. In addition, all isolates of *L. kirschneri* were assigned to serogroup Pomona and serovar Mozdok according to their clonal groups. Isolates of *L. interrogans* were subdivided into the serovars Copenhageni or Icterohaemorrhagiae based on the presence or absence of a T-nucleotide base deletion in the *lic12008* gene.

Minimal spanning tree (MST) analysis of the available strains isolated from different sources worldwide, based on the major genomic regions for each genomic species, showed that clonal groups 6 and 73 contained isolates from multiple sources, indicating their potential for cross-species transmission. Clonal group 6 was found exclusively in the dog population in Europe, while clonal group 73 was found in multiple species. This genetic linkage has significant implications for the epidemiological landscape of leptospirosis in Croatia.

Data on clinical symptoms, laboratory parameters and treatment results were available for 16 animals. Younger and lighter animals were more frequently infected with *L. interrogans*, while in older and heavier animals the proportion of infections with *L. kirschneri* and *L. interrogans* was equal. The mortality risk was reduced by a factor of 0.9 for every kilogramme of increased body weight. Vaccinated animals had a higher survival rate; only one death was recorded in 4 vaccinated animals compared to 10 deaths in 12 unvaccinated animals. The clinical manifestations were highly variable. Only one pattern of clinical manifestations was

present in two animals, while the others showed a unique pattern of parameters analysed. Although analytical statistical methods revealed no statistical significance in the association of specific clinical manifestations with genomic species, clonal groups and serovars, probably due to the small number of patients and a large number of observed variables, descriptive statistics nevertheless suggest a more frequent association.

Conclusions. CgMLST provides greater discriminatory power than conventional MLST and proves useful for tracing infection pathways and evolutionary relationships between *Leptospira* strains. Despite the high resolution of the sequence types, the current method does not allow grouping of isolates for epidemiological or clinical predictions. The limited number of isolates in the BIGSdb database emphasises the need to expand it to improve the reliability and applicability of cgMLST intyping *Leptospira*. The study found that the Copenhageni serovar was responsible for the majority of infections and severe clinical outcomes, with its presence confirmed for the first time in Croatia. This result suggests that this serovar needs to be included in antigen panels for the serological diagnosis of leptospirosis. In addition, the high prevalence of infections with the Mozdok serovar, serogroup Pomona, raises the question of efficacy and the need to adapt the existing vaccine. However, partial protection has been observed, making vaccination a valuable tool for the prevention and control of leptospirosis in dogs.

Genotyping and serotyping of the pathogen can predict disease progression, with infections caused by *L. interrogans*, serogroup Icterohaemorrhagiae, clonal group 6 and serovar Copenhageni being associated with a worse outcome. Nevertheless, no correlation between the infecting strain and the clinical manifestation was found in this study, probably due to the small number of subjects observed and the numerous clinical variables.

Further studies on clinical manifestations and treatment outcomes associated with specific genotypes should include a larger number of samples and isolates from different geographical areas. The integration of genotyping data from isolates from different hosts but the same geographical area would allow a more comprehensive understanding of the genetic diversity and epidemiology of leptospirosis.

Keywords: leptospirosis, *Leptospira* spp, MLST, cgMLST, dog.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA	4
2.1. Leptospiroza	4
2.1.1. Povijest.....	4
2.1.2. Etiologija leptospiroze	5
2.1.2.1. Taksonomija i klasifikacija leptospira.....	5
2.1.2.1.1. Serološka klasifikacija	5
2.1.2.1.2. Genomska klasifikacija	6
2.1.2.2. Morfološka obilježja leptospira.....	8
2.1.2.3. Uzgoj leptospira	10
2.1.2.4. Osnovne značajke strukture genoma leptospira	11
2.1.2.5. Nove molekularne metoda tipizacije.....	12
2.1.2.5.1. Tipiziranje na osnovi multilokusnih sekvenci	13
2.1.2.5.2. Tipiziranje na osnovi multilokusnih sekvenci sa većim brojem gena	14
2.1.3. Epizootiologija.....	14
2.1.3.1. Leptospiroza u pasa.....	16
2.1.4. Patogeneza	18
2.1.5. Klinička slika	20
2.1.5.1. Klinička slika leptospiroze u pasa.....	20
2.1.5.2. Osobitosti kliničke slike u ostalih vrsta domaćih životinja	25
2.1.6. Dijagnostika leptospiroze.....	26
2.1.6.1. Dokaz uzročnika	26
2.1.6.1.1. Izdvajanje leptospira iz kliničkog materijala.....	26
2.1.6.1.2. Izravni dokaz leptospira u tkivima ili tjelesnim tekućinama	27
2.1.6.1.3. Dokaz leptospira molekularnim metodama.....	27
2.1.6.2. Serološke metode dijagnostike.....	28
2.1.7. Liječenje i prevencija	29
2.1.8. Zoonotski potencijal leptospira.....	29
2.1.8.1. Klinička slika u ljudi	30
3. OBRAZLOŽENJE TEME.....	31
4. MATERIJAL I METODE	32
4.1. Odabir izolata	32
4.2. Uzgoj leptospira i određivanje serološke skupine	32

4.2.1.	Izdvajanje i uzgoj leptospira	32
4.2.2.	Određivanje serološke skupine	34
4.3.	Izdvajanje DNK.....	36
4.4.	Molekularne analize	37
4.4.1.	Lančana reakcija polimerazom (konvencionalna PCR metoda)	37
4.4.2.	Određivanje genomske vrste odabranih izolata leptospira iz pasa.....	38
4.4.2.1.	Umnažanje odsječka <i>secY</i> gena	39
4.4.2.1.1.	Elektroforeza u gelu	39
4.4.3.	Genska tipizacija na osnovu multilokusnih sekvenci.....	40
4.4.3.1.	Umnažnje <i>adk</i> , <i>icdA</i> , <i>lipL</i> 32, <i>lipL</i> 41, <i>rrs2</i> i <i>secY</i> gena	41
4.4.4.	Sekvenciranje ključnih regija genoma (cgMLST)	42
4.4.4.1.	Izdvajanje i pročišćavanje DNK pomoću MagNA Pure 96 uređaja.....	42
4.4.4.2.	Obrada izdvojene DNK i priprema za sekvenciranje ključnih regija genoma	44
4.4.4.3.	Sekvenciranje ključnih regija genoma na Illumina platformi i obrada dobivenih nukleotidnih slijedova	45
4.5.	Obrada podataka i usporedba molekularnih analiza.....	48
4.5.1.	Obrada nukleotidnih slijedova dobivenih umnažanjem odsječaka <i>secY</i> gena.....	48
4.5.2.	Obrada nukleotidnih slijedova dobivenih sekvenciranjem na osnovi multilokusnih sekvenci	48
4.5.3.	Obrada nukleotidnih slijedova dobivenih sekvenciranjem ključnih regija genoma.	49
4.6.	Shema predviđanja kliničke slike i ishoda bolesti	49
4.6.1.	Statistička obrada podataka.....	50
5.	REZULTATI	51
5.1.	Pretraživana populacija i određivanje serološke skupine.....	51
5.2.	Određivanje genomske vrste umnažanjem i filogenetskom analizom <i>secY</i> gena	52
5.3.	Tipiziranje na osnovi multilokusnih sekvenci.....	54
5.3.1.	Obrada dobivenih MLST nukleotidnih slijedova.....	54
5.4.	BIGsdb baza podataka Instituta Pasteur, Pariz, Francuska	64
5.5.	Molekularno tipiziranje na osnovi ključnih regija genoma.....	66
5.5.1.	Određivanje genomske vrste pomoću ribosomske multigenske tipizacije.....	69
5.5.2.	Filogenetska analiza dobivenih sekvenci ključnih regija genoma	70
5.5.3.	Identifikacija klonalnih grupa	75
5.5.4.	Usporedna analiza i razlikovanje serovara Mozdok i Pomona	81
5.5.5.	Usporedna analiza i razlikovanje serovara Copenhageni i Icterohaemorrhagiae....	83
5.6.	Klinička slika i statistička obrada podataka	84

6. RASPRAVA.....	90
7. ZAKLJUČCI.....	97
8. POPIS LITERATURE	99
9. PRILOZI.....	127
9.1. Popis slika	127
9.2. Popis tablica	130
10. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA	131

POPIS KRATICA

5' i 3' – nekodirajući krajevi molekule DNK

adk – gen koji kodira adenilat kinazu

AKI – akutna bubrežna ozljeda (engl. *Acute kidney injury*)

ALP – alkalna fosfataza

ALT – alanin- aminotranferaza

AMP – antimikrobni peptidi

asd – gen koji kodira aspartat-semialdehid dehidrogenazu

AST – aspartat – aminotransferaza

ATP – adenzin trifosfat

BIGSdb – Bacterial Isolate Genome Sequence Database

bp – bazni par

C – citozin

C1 i CII – kružni kromosomi

CAAT – metoda unakrižne aglutinacije – adsorpcije

CG – klonalna grupa

cgMLST – sekvenciranje ključnih regija genoma (engl. *Core genome multilocus sequence typing*)

cgST – tip sekvence dobiven sekvencioniranjem ključnih regija genoma

Cop – Copenhaveni

DNK -deoksiribonukleinska kiselina

dNTP – deoksinukleotid trifosfat

EDTA – etil-diamin-tetra-aminooctena kiselina

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

EMJH – tekuća hranidbena podloga za leptospire (ELLINGHAUSEN i McCULLOUGH, JOHNSON i HARRIS)

fadD/caiB - gen koji kodira Acetil-koenzim A sintetazu

G – gvanin

glmU – gen koji kodira N-acetilglukozamin-1-fosfat uridiltransferazu

Grpth – Grippytyphosa

icdA – gen koji kodira izocitrat dehidrogenazu

Icth – Icterohaemorrhagiae

IS – insercijska sekvenca

iTOL – Interactive tree of life

K – Kalij

kb – kilobaza

L. – *Leptospira*

Len – endostatinu sličan protein

LigB – imunoglobulinima sličan protein

lipL 32 – gen koji kodira lipoprotein L32 vanjske ovojnice

lipL 41 – gen koji kodira lipoprotein L41 vanjske ovojnice

LPHS – leptospirozni plućni hemoragijski sindrom

M – molarni

MAT – mikroskopska aglutinacija

Mbp – mega bazni par

Mce – protein ulaska u stanicu (engl. *Mammalian cell entry*)

MEGA – Molecular Evolutionary Genetic Analysis

metf – gen koji kodira metilentetrahidrofolat reduktazu

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

MLVA – analiza polimorfizma broja uzastopno ponovljenih sekvenci (engl. *Multi-locus variable number of tandem repeats*)

mreA – gen koji kodira održavanje oblika bakterijskih stanica

Na – Natrij

NaCl – Natrijev klorid

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NGS – sekvenciranje iduće generacije (engl. *Next generation sequencing*)

OmpL1 – protein vanjske ovojnice

PBS – fosfatni pufer

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

PFGE – elektroforeza u pulsirajućem gelu

pfkB - gen koji kodira fosfofruktokinazu B

pntA - gen koji kodira Nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat transhidoreganzu

Pom – Pomona

Real Time PCR – lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real-time polymerase chain reaction*)

rMLST – ribosomska multigenska tipizacija (engl. *Ribosomal multilocus sequence typing*)

RNK – ribonukleinska kiselina

rrf - ribosomski gen za 23S

rrl - ribosomski gen za 5S

rrs – ribosomski gen za 16S

secY – gen koji kodira preproteinsku translokazu *secY*

SP1 - lipoporetinska signalna peptidaza 1

SP2 – lipoporetinska signalna peptidaza 2

tpiA - gen koji kodira trioza-fosfat izomerazu

VNTR – tipiziranje na osnovi polimorfizma broja uzastopno ponovljenih sekvenci (engl.

Variable number of tandem repeats)

1. UVOD

Leptospiroza je re-emergentna zarazna bolest mnogih domaćih i divljih životinja te čovjeka. Geografski je jedna od najprostranjenijih zoonoza sa visokom stopom prevalencije. Uzročnici leptospiroze su patogene bakterije roda *Leptospira*, unutar kojeg razlikujemo preko 300 različitih serovara koji su, prema srodnosti, grupirani u 29 seroloških skupina (DIKKEN i KMETY, 1978.; KMETY i DIKKEN, 1993.) te 68 različitih genomskih vrsta. Prema patogenosti podijeljene su u tri osnovne grupe, od kojih jedan sadrži patogene vrste, drugi intermedijarno patogene vrste, a treći leptospire izdvojene iz okoliša (VINCENT i sur., 2019., KORBA i sur., 2021.).

Glavni rezervoari leptospiroze su glodavci koji nakon infekcije doživotno izlučuju leptospire urinom (LEVETT, 2001., ADLER i DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010.), no i mnoge druge životinjske vrste, uključujući domaće životinje, mogu biti nositelji pojedinih serovara i dugotrajni kliconoše. Iz bubrega se leptospire mokraćom izlučuju u okoliš, kontaminirajući tlo i površinske vode. Do infekcije može doći izravnim kontaktom ili neizravno preko onečišćenog tla i vode, a ulazna vrata su sluznice ili oštećena koža.

Kliničko očitovanje ovisi o prijemljivosti inficirane vrste, njezinu imunosnom statusu, infektivnoj dozi te virulenciji serovara ili soja leptospire koji je uzrokovao bolest. Očituje se raznolikim spektrom kliničkih pojavnosti, od subkliničkih infekcija do teških septikemijskih oblika bolesti praćenih otkazivanjem bubrega i/ili plućnim hemoragijskim sindromom uz visoku stopu smrtnosti. Određeni serovari, iz trenutno još nepoznatih razloga, uzrokuju teže kliničke oblike od ostalih (TAYLOR i sur., 2015).

Leptospiroza u pasa koja se istražuje još od polovice prošlog stoljeća (KLARENBECK i SCHUFFNER, 1933.) tradicionalno je bila povezana sa infekcijom serovarima Canicola i Icterohaemorrhagiae (ELLIS, 2010.). Novija istraživanja ukazuju na promjenu vjerojatnog infektivnog serovara, te se danas serovari Pomona, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae i Bratislava navode kao najčešći uzročnici oboljenja u pasa (ELLIS, 2015.). Smatra se da je povećana učestalost koja se zadnjih nekoliko godina bilježi u većini europskih država uzrokovana promjenom vjerojatno infektivnih serovara i posljedičnom neučinkovitosti dostupnih cjepiva. Promjena klime, odnosno obilne kiše i poplave, također doprinose povećanoj pojavnosti ove bolesti. Slično kao i u ljudi, i u pasa se bilježe i promjene u očitovanju kliničke slike (TRUONG i COBURN, 2012., HAAKE i GALLOWAY, 2021.). Povećana incidencija

leptospiroznog plućnog hemoragijskog sindroma (LPHS) je, uz teško zatajenje bubrega, danas jedan od glavnih uzroka visoke smrtnosti oboljelih pasa (MAJOR i sur., 2014.).

Zbog raznolikosti i sposobnosti stalne genske prilagodbe leptospira dijagnosticiranje bolesti i tipiziranje uzročnika je otežano. Za taksonomsku razdiobu roda *Leptospira* danas koristimo dva različita klasifikacijska sustava: serološki i molekularni. Serološki sustav sa serovarom kao osnovnim taksonomom, temelji se na utvrđivanju fenotipskih razlika između pojedinih sojeva leptospira dok molekularni sustav, uporabom raznih molekularnih metoda, utvrđuje stupanj njihove genetske povezanosti. Nažalost, osnovni taksoni dobiveni uporabom tih dvaju sustava nisu uvijek u istom međuodnosu. Serološka klasifikacija zasniva se na metodi unakrižne aglutinacije – adsorpcije (engl. *Cross agglutination adsorption test*, CAAT) koja utvrđuje antigene razlike u lipopolisahardima ovojnice *Leptospira* pomoću unakrižnih adsorpcija pretraživanog soja sa heterolognim serumima, proizvedenim na kunićima i hiperimunog seruma pretraživanog soja sa srodnim serovarima iz iste serološke skupine. Obzirom na zahtjevnost i dugotrajnost ove metode, kao i otežano razlikovanje određenih serovara unutar serološke skupine *Grippytyphosa*, već dulje vrijeme se pokušava pronaći odgovarajuća molekularna metoda koja bi ju zamijenila (HARTSKEERL i sur., 2004.). Ipak, molekularna klasifikacija vrsta još uvijek u potpunosti ne udovoljava svim zahtjevima epidemioloških i epizootioloških istraživanja, a pritom određivanje genomske vrste ne daje onoliko epidemioloških podataka koliko se dobiva određivanjem serovara. Brojna istraživanja u polju molekularne epidemiologije usmjerena su upravo prema identifikaciji i tipizaciji soja i povezivanju dobivenih rezultata sa drugim relevantnim podacima kao što su geografska proširenost, rizici prijenosa, kliničko očitovanje i ishodi liječenja (LEVETT 2001., TIBAYRENC, 2005., CAIMI i sur., 2020). Ispituju se i razvijaju brojne molekularne metode tipizacije kako bi se omogućio jasniji uvid u bioraznolikost *Leptospira* spp. dobiveni rezultati povezali s epidemiološkim i kliničkim podacima. Elektroforeza u pulsirajućem gelu (engl. *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE) omogućila je djelomično razlikovanje serovara te je postignuta relativno dobra korelacija sa serološkim metodama (GALLOWAY i LEVETT, 2008.). Zbog toga ova metoda predstavlja zlatni standard u molekularnom tipiziranju leptospira na razini serovara. Nedostatci ove metode su što zahtijeva posebnu laboratorijsku opremu, većini nedostupnu, te veće količine čiste deoksiribonukleinske kiseline (DNK) što onemogućuje primjenu ove metode na kliničkom materijalu. Druge molekularne metode tipiziranja koje daju obećavajuće rezultate su metoda koja se temelji na polimorfizmu broja uzastopno ponovljenih sekvenci (engl. *Multi-locus variable number of tandem repeats*, MLVA) i tipiziranje na osnovi

multilokusnih sekvenci (engl. *Multilocus sequence typing*, MLST) (AHMED i sur., 2006.; BOONSILP i sur., 2013.; VARNI i sur., 2018.). Iako je inicijalni model ovih metoda bio temeljen na ograničenom broju patogenih leptospira, postignuta razlučivost čini ih jednim od danas najčešće korištenih molekularnih metoda. Glavni nedostatak ovih metoda je limitirajuća razlučivost kada ju primjenjujemo na usko srodnim izolatima (CAIMI i sur., 2020.). Kako bi dobili višu razinu razlučivosti razvijaju se molekularne metode tipizacije na osnovi multilokusnih sekvenci sa većim brojem gena, ukupno 545, koji čine ključne regije genoma (engl. *Core genome multilocus sequence typing*, cgMLST). Ključne regije genoma sadrže setova gena koji potječu od 42 vrste *Leptospira*, uključujući patogene vrste i vrste izdvojene iz okoliša, 26 različitih seroloških skupina i 73 različita serovara. Ovom metodom utvrđuje se tip sekvence i klonalne grupe što povećava razlučivost u odnosu na konvencionalni MLST pristup (GUGLIELMINI i sur., 2019., RAMLI i sur., 2021., GRILLOVA i sur., 2021.; GRILLOVA i sur., 2023.). Cilj ove disertacije bio je prikupiti kliničke sojeve leptospira iz pasa, tipizirati dobivene izolate koristeći serološke i molekularne metode te usporediti rezultate kako bi se odredio odnos konvencionalnih i molekularnih metoda. Po prvi puta u Hrvatskoj, u ovom istraživanju će se za tipizaciju *Leptospira* primijeniti tehnologija sekvenciranja nove generacije (engl. *Next-generation sequencing*, NGS). Osnovna pretpostavka istraživanja jest da će NGS tehnologije pružiti bolji uvid u bioraznolikost i omogućiti razumijevanje epizootologije leptospiroze, kao i predviđanje ozbiljnosti i oblika kliničkog očitovanja bolesti te omogućiti razvoj strategija za kontrolu i prevenciju bolesti.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Leptospiroza

2.1.1. Povijest

Iako je teško donositi čvrste zaključke iz zapisa prije pojave moderne medicinske i znanstvene literature, čini se jasnim da su barem neki od ranijih izbijanja bolesti opisanih u drevnim tekstovima bili povezani s leptospirozom. Primjerice, drevni kineski tekstovi sadrže zapise o "žutici na rižinim poljima", dok su u Japanu sindromi koji su danas jasno prepoznatljivi kao leptospiroza nazivani "jesenska groznica" ili "groznica sedam dana" (KITAMURA i HARA, 1918.). U Europi, Australiji i drugdje prepoznate su veze između febrilnih bolesti i određenih zanimanja, što je dovelo do sindroma poput "bolesti kosača trske", "bolesti svinjara" i "Schlammfiebers (blatne groznice)", i to prije nego što je etiologija ovih bolesti bila prepoznata (ALSTON i BROOM, 1958.; VAN THIEL, 1948.). Za prvi suvremeni opis leptospiroze zaslužan je njemački liječnik Adolph Weil 1886. godine. Opisao ju je kao febrilnu bolest praćenu ikterusom, povećanom slezenom, zatajenjem bubrega i konjuktivitisom. Naziv Weilova bolest koristi se i danas za teške oblike bolesti kod ljudi.

Uzročnik je prvi put opisao Stimson 1907. godine, utvrdivši prisutnost spiroheta u bubrezima pacijenta koji je bolovao od „žute groznice“. Organizam je nazvan *Spirochaeta interrogans* zbog morfološkog oblika nalik na upitnik (STIMSON, 1907.). Nakon prvih opisa bolesti i samog uzročnika započeta su brojna istraživanja koja su se bavila etiologijom leptospiroze.

Povezanost izdvojenog uzročnika s kliničkim očitovanjem bolesti te načine prenošenja razjasnile su dvije skupine znanstvenika 1915. godine, nezavisno jedni od drugih, u Japanu i Njemačkoj. U Japanu, Inada i Ido otkrili su spirohete i specifična protutijela u krvi japanskih rudara sa „zaraznom žuticom“. Izdvojivši spiralnu bakteriju nazvali su ju *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* (INADA i IDO, 1915.). Istovremeno, u Njemačkoj dvije grupe liječnika proučavali su njemačke vojnike oboljele od tzv. "francuske bolesti". Uhlenhuth i Fromme te Hubener i Reiter dokazali su uzročnika ubrizgavši krv oboljelih vojnika u zamorčice (UHLENHUTH i FROMME, 1915., HÜBENER i REITER, 1915.).

U Hrvatskoj leptospiroza je prvi puta dokazana u psa 1926. godine (BABIĆ, 1927.), a u ljudi 1935. godine (ANTUNOVIĆ-MIKAČIĆ, 1935.).

2.1.2. Etiologija leptospiroze

Uzročnici leptospiroze su spiralne bakterije koje pripadaju rodu *Leptospira*, porodici *Leptospiraceae* i redu *Spirochetales* (PASTER i sur., 1991.).

2.1.2.1. Taksonomija i klasifikacija leptospira

Izrazita sposobnost prilagođavanja svakom novom domaćinu i okolišu rezultira iznimnom heterogenošću leptospira. Unutar roda razlikujemo preko 300 različitih serovara koji su, prema srodnosti, grupirani u 29 seroloških skupina (DIKKEN i KMETY, 1978.; KMETY i DIKKEN, 1993.) i 68 različitih genomskih vrsta. Genomske vrste su na osnovi njihove sposobnosti da uzrokuju bolest podijeljene na patogene, intermedijarno patogene i saprofitske vrste (VINCENT i sur., 2019., KORBA i sur., 2021.). Klasificiranje leptospira temelji se na utvrđivanju antigenih (serološki klasifikacijski sustav) i genskih obilježja pojedinih sojeva (genomski klasifikacijski sustav). Osnovni taksoni (serovari odnosno genomske vrste) dobiveni uporabom tih dvaju sustava nisu uvijek u istom međuodnosu. U osnovi, svaki serovar se obično povezuje s jednom genomskom vrstom, no postoji određen broj odstupanja u kojima isti serovar može biti prisutan u više genomskih vrsta.

2.1.2.1.1. Serološka klasifikacija

Serološki sustav klasifikacije temelji se na antigenskim razlikama lipopolisaharida vanjske ovojnice leptospira. Osnovna taksonomska jedinica je serovar. Serovar određujemo uporabom CAAT metode. CAAT se sastoji od mikroskopske aglutinacije istraživanog soja sa protuserumima serovara koji predstavljaju sve serološke skupine. Nakon određivanja serološke skupine kojoj pretraživani soj pripada slijedi unakrižna adsorpcija s kunićjim protuserumima na sve serovare unutar serološke skupine (DIKKEN i KMETY, 1978), i obrnuto, adsorpcija protuseruma na istraživani soj sa svim serovarima unutar utvrđene serološke skupine. Dva soja pripadat će različitim serovarima ako se više od 10% homolognog titra nalazi u jednom od dvaju protuseruma (STALLMAN, 1987).

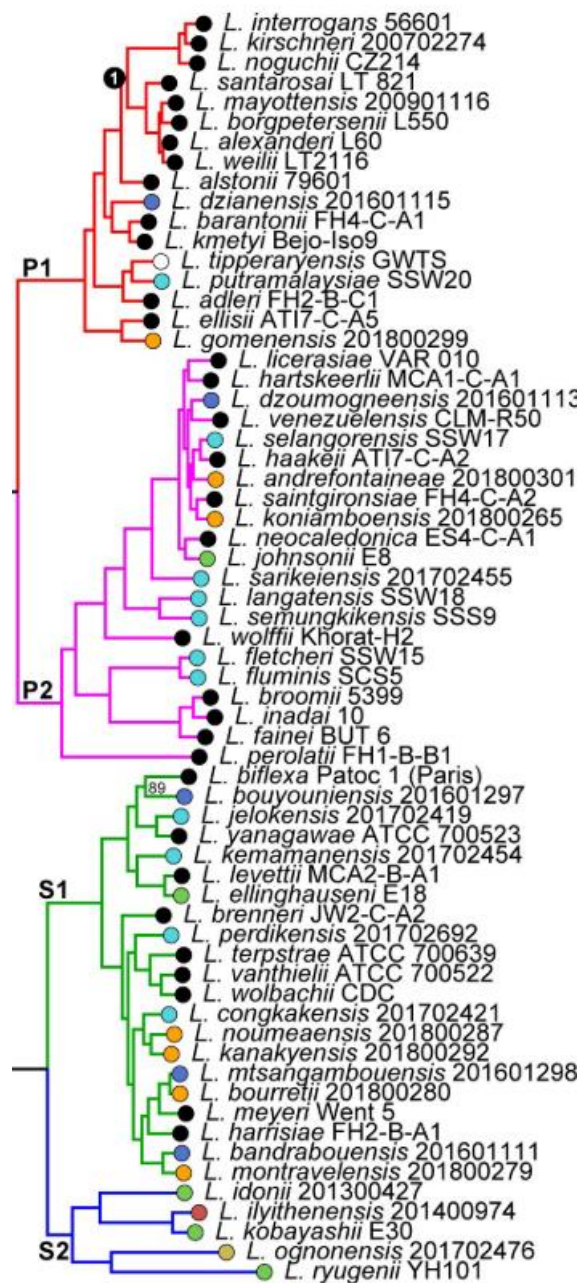
Serovari koji se razlikuju jedan od drugog (prema kriteriju “10%-tne unakrižne adsorpcije”) su antigenski srodni i kao takvi se grupiraju u serološke skupine (FAINE i sur., 1999). Činjenica je da je CAAT iznimno tehnički zahtjevna i dugotrajna metoda, što je dovelo do gotovo isključive uporabe jednostavnijih seroloških metoda, poput mikroskopske aglutinacije čija se razlučivost zapravo zaustavlja na razini serološke skupine. Utvrđene serološke skupine nemaju taksonomski status, ali njihovo određivanje pomaže pri dobivanju određenih epidemioloških podataka i u dijagnostici bolesti. Razvojem molekularnih metoda tipizacije postalo je sve jasnije

da koncept "serovara" više nije u potpunosti zadovoljavajući pa se ulažu znatni naponi u razvoj molekularne metode koja bi mogla osigurati one informacije koje dobivamo serološkom klasifikacijom (poveznica između nositelja i soja).

2.1.2.1.2. Genomska klasifikacija

Razvojem i primjenom metoda molekularne analize te usporedbom dobivenih sekvenci DNK, dolazi do promjene u pristupu taksonomskoj razdiobi i do razvoja novog, genetskog klasifikacijskog sustava (ELLIS, 1995).

Do 1989. godine unutar roda *Leptospira* razlikovale su se samo dvije ključne vrste: *Leptospira (L.) interrogans*, koja je obuhvaćala sve patogene varijante, i *L. biflexa*, koja je uključivala saprofitske varijante izdvojene iz okoliša (JOHNSON i FAINE, 1984). Razlikovanje između ove dvije vrste temeljilo se na njihovim uzgojnim svojstvima odnosno mogućnosti rasta pri 13° C uz prisutnost 8-azaguanina, kao i na sposobnosti formiranja sfernih stanica u 1M NaCl. Primjenom metode DNK-DNK hibridizacije, utvrđeno je deset genetskih vrsta unutar roda *Leptospira* (YASUDA i sur., 1987); *L. interrogans* sensu stricto, *L. borgpetersenii*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, *L. weilii*, *L. inadai*, *L. parva* i *L. biflexa* sensu stricto. Naknadno su identificirane još tri genetske vrste, prvo *L. kirschneri* (RAMADASS i sur., 1992), a zatim *L. fainei*, (PÉROLAT i sur., 1998), te *L. alexanderi* (BRENNER i sur., 1999). Tijekom vremena, broj utvrđenih vrsta *Leptospira* postupno se povećavao, odražavajući napredak u istraživanju i razumijevanju ove kompleksne bakterijske vrste. Do 2018. godine unutar roda *Leptospira* razlikovali smo 21 genetsku vrstu; sedam saprofitskih, devet patogenih i pet intermedijarno patogenih vrsta. THIBEAUX i sur., (2018a,b) iz okoliša uspijevaju izdvojiti i tipizirati novih 12 saprofitskih vrsta. Rod *Leptospira* ponovo se povećava 2019. godine kad je uporabom molekularnih metoda novije generacije, tipizirano 30 novih vrsta izdvojenih iz različitih izvora i s različitom patogenošću (VINCENT i sur., 2019.). S novim spoznajama o bioraznolikosti roda *Leptospira*, predložena je i njegova reklasifikacija, kojom se umjesto uobičajene podjele na tri grupe, uvode četiri podgrupe: one koje sadrže patogene (P1), i intermedijarno patogene vrste (P2) te dvije koje sadrže saprofitske vrste (S1 i S2) (Slika 1.). Iz izvora vode u Alžiru 2020. godine izdvojene su i identificirane četiri nove vrste (KORBA i sur., 2021.), a konačnu izmjenu rod *Leptospira* prolazi 2022. godine kad je iz tla u Portoriku izdvojena i identificirana nova patogena vrsta, *L. sanjuanensis* (FERNANDES i sur., 2022.). Tako danas ukupno razlikujemo 68 genetskih vrsta.



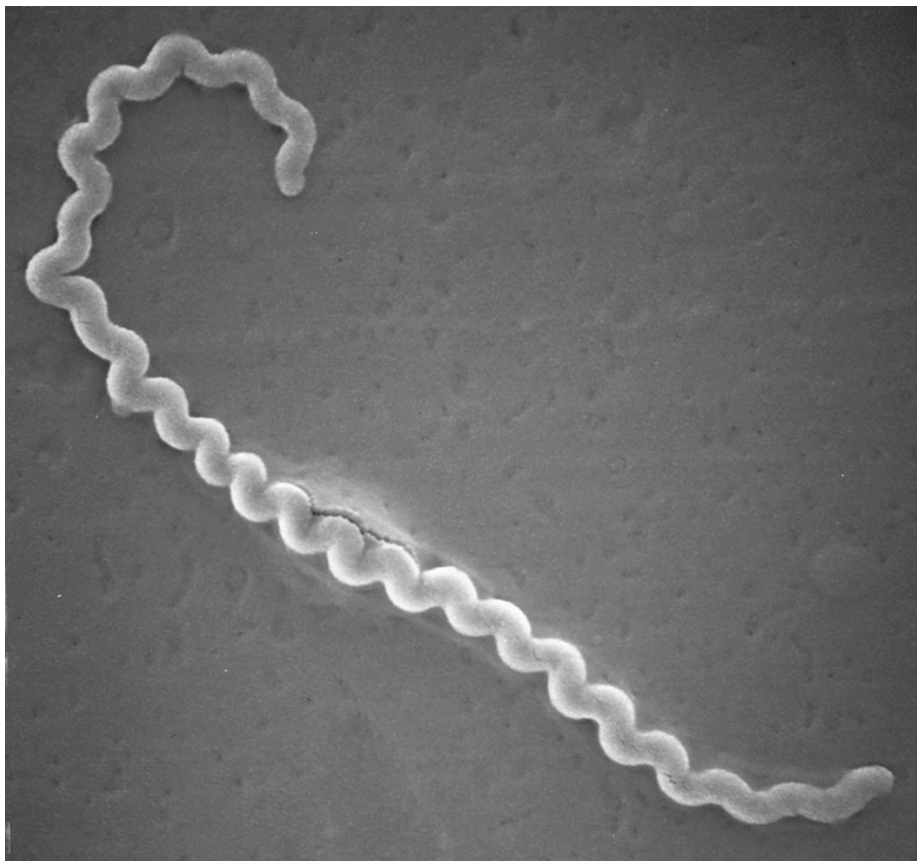
Slika 1. Filogenetsko stablo temeljeno na sekvencama 1371 gena.

Grane su obojene prema pripadnosti jednoj od četiri glavne podgrupe: P1 (crveno), P2 (ljubičasto), S1 (zeleno) i S2 (plavo).

(Izvor: VINCENT i sur., 2019.).

2.1.2.2. Morfološka obilježja leptospira

Leptospire su obligatno aerobne, fleksibilne, pravilno spiralno zavijene, tanke bakterije. Promjera su oko 0,1 μm , raspona dužine od 6 do 20 μm , amplitude zavoja od 0,1 do 0,15 μm te duljine pojedinog zavoja od 0,5 μm (Slika 2.) Optimalan rast postižu na temperaturama od 28°C do 30°C (CARLETON i sur., 1979.; GOLDSTEIN i CHARON, 1990.; FAINE i sur., 1999.).

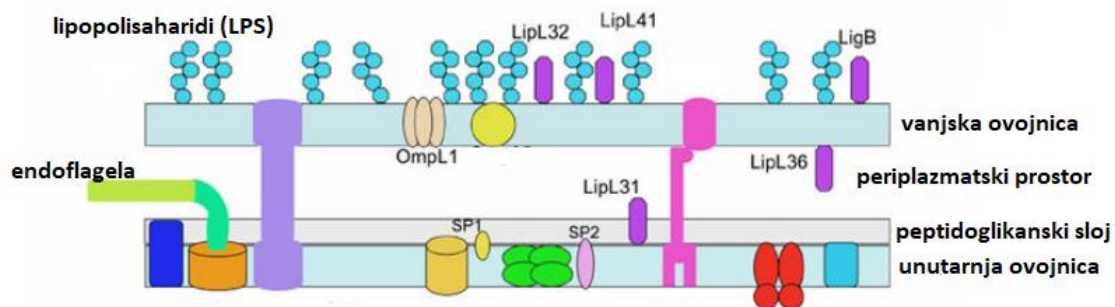


Slika 2. *Leptospira interrogans*. Slikano elektronskim mikroskopom.

(Ljubaznošću dr. Jarlath Nally)

Patogene vrste leptospira, u svojim prvim pasažama nakon izdvajanja iz domaćina su uobičajeno kraće i čvršće zavijene od izolata koji su prošli više uzastopnih pasaža, kao i od saprofitskih vrsta (ELLIS i sur., 1983.). Poput ostalih Gram negativnih bakterija, leptospire imaju vanjsku ovojnicu u koju su ugrađeni lipopolisaharidi, zatim unutarnju ovojnicu, peptidoglikanski sloj te periplazmatski prostor (Slika 3.) Lipopolisaharidni sloj sličan je strukturno i imunosno lipopolisaharidima ostalih Gram negativnih bakterija, no sa značajno

slabijim endotoksičnim djelovanjem (SHIMIZU i sur., 1987.). Za specifičan oblik, snagu i rigidnost leptospira zaslužan je upravo peptidoglikanski sloj.

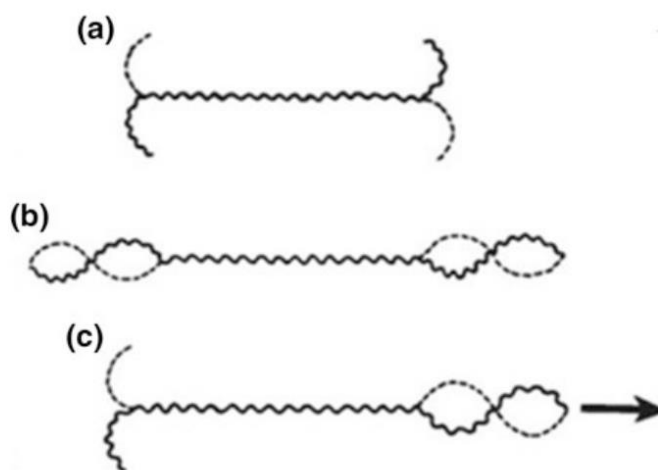


Slika 3. Shematski prikaz građe dvostruke ovojnice leptospira.

Vanjska ovojnica sadrži transmembranski porin OmpL1, te lipoproteine lipL 32, lipL 36 (na unutarnjoj strani vanjske membrane) te lipL 41 i LigB. Lipoproteinske signalne petidaze (SP1 i SP2) su specifični enzimi koji prepoznaju i cijepaju signalne peptide s prekursora lipoproteina tijekom njihovog sazrijevanja i transporta do ciljanih membranskih lokacija.

(Izvor: KO i sur. 2009.)

Unutar periplazmatskog prostora nalaze se dva aksijalna filamenta (endoflagele) s polarnim insercijama. Oni počinju subterminalno na oba kraja bakterije i protežu se prema sredini stanice, međusobno se ne preklapajući, omogućujući tako stanici pokretljivost i fleksibilnost i dajući joj njen karakterističan izgled. Kreću se translacijski, rotirajući svaku flagelu u različitom smjeru i netranslacijski, rotirajući svaku flagelu u istom smjeru (CHARON I GOLDSTEIN, 2002.) (Slika 4.)



Slika 4. Kretanje leptospira: netranslacijski oblik kretanja, rotiranje svake pojedine flagele u istom smjeru (a,b); translacijski oblik kretanja, rotiranje svake flagele u različitom smjeru, strelica označava smjer kretanja (c)

(Izvor: GOLDSTEIN i CHARON, 1990.)

Leptospire se slabo boje, pa mikroskop s tamnim vidnim poljem omogućuje njihovu vizualizaciju u nativnim preparatima. Jedini izuzetak su bojenja temeljena na impregnaciji srebrom (Levaditi, Warthin-Starry i Dieterleu) kod kojih su leptospire vidljive svjetlosnim mikroskopom (FAINE i sur., 1999.).

2.1.2.3. Uzgoj leptospira

Za rast leptospira neophodni su složeni hranjivi mediji koji sadržavaju dušik, ugljik, određene vitamine i dodatke pojedinih kemijskih elementa. Masne kiseline dugih lanaca predstavljaju osnovni izvor potrebnog ugljika. Obzirom da esencijalne masne kiseline sadržavaju i toksične tvari, za uzgoj leptospira (*in vitro*) potrebna je detoksikacija pa se u hranidbene podloge dodaju serumski albumini; kunički serum (hranjive podloge prema Korthofu, Stuartu i Fletcheru) i goveđi serum (EMJH) ili sorbitolni esteri masnih kiselina (Tween) (KORTHOFF, 1932.; STUART, 1946.; ELLINGHAUSEN i McCULLOUGH, 1965.; JOHNSON i HARRIS, 1967.). Amonijevi ioni predstavljaju osnovni izvor dušika te njegova opskrba ide u obliku amonijevih soli ili deaminacijom masnih kiselina. Potrebni dodatci uključuju tiamin (vitamin B1), biotin (vitamin B7), fosfor, kalcij, magnezij, željezo te bakar, mangan i sulfat. (FAINE i SUR., 1999.). Vitamin B12 se dugo smatrao neophodnim za rast patogenih leptospira na 37°C, no dokazom prisustva biosintetskog operona vitamina B12 unutar patogenih leptospira isti se ne smatra neophodnim dodatkom za hranjive podloge (NASCIMENTO i sur., 2004a; 2004b). Saprofitske i patogene vrste leptospira rastu u aerobnim uvjetima na temperaturama različitih intervala. Rast saprofitskih leptospira moguć je i na

temperaturama nižim od 13°C, dok je najpovoljnija temperatura za rast patogenih bakterija 28-30°C uz pH vrijednost 7,2-7,6.

2.1.2.4. Osnovne značajke strukture genoma leptospira

Genom *Leptospira* spp. sastoji se od dva kromosoma, većeg i manjeg kružnog kromosoma, odnosno replikona (CI i CII). Karakteriziran je visokim udjelom nukleotida gvanina i citozina u odnosu na timin i adenin, G+C 35-42 %. Veličina genoma je između 3,9 i 4,6 megabaznih parova (Mbp), ovisno o vrsti i soju, što čini genom leptospira značajno većim u odnosu na većinu ostalih bakterija. Varijabilnost u veličini genoma omogućava leptospirama veću prilagodbu različitim okolišnim uvjetima i domaćinima (PICARDEU i sur., 2008.). Veći kromosom (CI) ima 4277 kilobaza (kb) i G+C 35%, sadrži konstitutivne gene (engl. *housekeeping genes*), uključujući one koji kodiraju sve vrste ribosomske i transportne RNK, većinu ribosomskih proteina, sintezu DNA i procese replikacije kromosoma. CII je manji replikon od 350 kilobaza i 35mol% GC, nosi *metF* i *asd* gene, koji kodiraju enzime metilen-tetra-hidrofolat reduktazu i aspartat beta-semi-aldehid aminotransferazu, potrebne za sintezu aminokiselina (BOURHY i SAINT GIRONS, 2000.). Dodatan, treći replikon (p74), veličine 74 kilobaza i 36mol% GC, pronađen je sekvenciranjem cijelog genoma vrste *L. biflexa* (NASCIMENTO i sur., 2004.; PICARDEU i sur., 2008.). Spomenuti replikoni u ove vrste (p74 i cII) mogu se smatrati i "kromidima" (HARRISON i sur., 2010.). Naime, replikoni nose jezgrene gene koji se nalaze na velikim kromosomima kod drugih vrsta leptospira (PICARDEAU i sur., 2008.), te imaju nukleotidni sastav i uporabu kodona vrlo sličnu onima velikih kromosoma s kojima su povezani. Dostupnost sekvenci cijeloga genoma saprofitske *L. biflexa* (PICARDEU i sur., 2008.), intermedijarne *L. licerasiae* (RICALDI i sur., 2012.a) i patogene *L. interrogans* (BULACH i sur., 2006.; CHOU i sur., 2012.) uvelike je doprinijela razumijevanju genomskih značajki filogenetskih skupina leptospira. Značajniji napredak postignut je nakon usporedbe šest genoma: dva serovara Lai i Copenhageni, vrste *L. interrogans*, te dva soja *L. borgpetersenii* serovara Hardjo i dva soja *L. biflexa* serovara Patoc (REN i sur., 2003.; NASCIMENTO i sur., 2004.; BULACH i sur., 2006.; PICARDEAU i sur., 2008.). Usporedbom genoma ovih triju genomskih vrsta utvrdilo se postojanje 2052 gena koji potvrđuju zajedničko podrijetlo saprofitskih i patogenih vrsta leptospira. Nadalje, ustanovljeno je da patogene vrste *L. interrogans* i *L. borgpetersenii* dijele 656 gena. Uvidom u broj gena koje *L. biflexa* dijeli sa svakom pojedinom patogenom vrstom; 93 sa *L. interrogans* i 44 sa *L. borgpetersenii*, primjećuje se da je *L. interrogans* zadržala veći broj gena. Upravo ovo zadržavanje većeg broja gena omogućava *L. interrogans* dulje preživljavanje u okolišu

(ADLER i DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010.). Detaljnijom usporedbom ustanovljena je značajna razlika u veličini genoma. Genom *L. borgpetersenii* je za otprilike 700 kb manji u odnosu na *L. interrogans* i *L. biflexa* (Tablica 1.) Smatra se da je uočena redukcije genoma posljedica razvoja ovisnosti *L. borgpetersenii* o domaćinu, što vjerojatno utječe i na djelomičnu prilagodbu u načinu prijenosa (BULACH i sur., 2006.).

Tablica 1. Usporedba veličine genoma za četiri odabrane genomske vrste unutar roda *Leptospira*

Leptospira spp.	Patogenost	Veličina genoma (Mbp)
<i>L. borgpetersenii</i> , soj L550	Patogen	≈ 3,9
<i>L. biflexa</i> , soj Paris	Saprofit	≈ 4,0
<i>L. licarsae</i> , soj VAR010	intermedijarno patogen	≈ 4,2
<i>L. interrogans</i> , soj Lai 56601	Patogen	≈ 4,7

Leptospira spp. sadrži jedan do dva gena za ribosomsku RNK (16S (*rrs*), 23S (*rrl*), 5S (*rrf*)) koji su, za razliku od drugih bakterijskih vrsta gdje su organizirani, razasuti po jednom od dva kromosoma (BARIL i sur., 1992a; SAINT GIRON i sur., 1992.). Spororastuće patogene vrste, *L. interrogans* i *L. borgpetersenii*, imaju isti broj gena (35-37) transpozorne RNK kao i brzorastuće intermedijarne vrste, *L. licarsae* i saprofitske, *L. biflexa* (PICARDEU i sur., 2008.).

Pokretni genetički elementi, insercijske sekvence ili jednostavni transpozoni (IS), kao što su IS1500 (BOURSAUX-EUDE i sur., 1995.), IS1502 (ZUERNER i HUANG, 2002.) i IS1533 (ZUERNER i sur., 1995.) također su utvrđeni kod leptospira. Insercijske sekvence omogućavaju bakterijskom genomu fleksibilnost, pospješujući kromosomsku inverziju, inserciju ili deleciju. Broj kopija IS-ova i transpozona različit je za svaki serovar. Broj transpozona u pojedinim genomskim vrsta također se razlikuje, pa tako *L. borgpetersenii* ima značajno veći broj transpozona od ostalih genomski vrsta, čak do tri puta. Kromosomske delecije potaknute transpozonomima predstavljaju dodatan čimbenik u smanjenju genoma *L. borgpetersenii* u odnosu na ostale vrste.

2.1.2.5. Nove molekularne metoda tipizacije

Različite molekularne metode koriste se za tipizaciju čija je svrha utvrđivanje raznolikosti unutar roda *Leptospira* spp. uz povezivanje dobivenih podataka s epidemiološkim i epizootičkim podacima.

Tipiziranje na osnovi multilokusnih sekvenci (engl. *Multilocus sequence typing*, MLST) polimorfizmu broja uzastopno ponovljenih sekvenci (engl. *Variable number of tandem repeats*, VNTR) te analizi polimorfizma broja uzastopno ponovljenih sekvenci (engl. *Multi locus VNTR analysis*, MLVA) spadaju među molekularne metode kojima su postignuti najznačajniji rezultati. Iako je njihova osnova temeljena na ograničenom broju genoma patogenih vrsta, postignuta diskriminatorna moć učinila ih široko primjenjivim metodama (AHMED i sur., 2006.; THAIPADUNGPANIT i sur., 2007.; LEON i sur., 2010.; CAIMI i sur., 2012.; VARNI i sur., 2014.; HAMOND i sur., 2015.) Uporabom VNTR i MLVA nije se uspjelo razlikovati serovare unutar genomskih vrsta (MAJED i sur., 2005.; CAIMI i sur., 2012.) dok je MLST metoda bila nešto uspješnija u povezivanju dobivenog genotipa sa serovarom.

2.1.2.5.1. Tipiziranje na osnovi multilokusnih sekvenci

MLST metoda razvijena je s ciljem povezivanja serološkog i molekularnog klasifikacijskog sustava, visoko je informativna ali limitirajuće rezolucije kada se primjenjuje na blisko srodnim izolatima. Prva shema (6 L-MLST) (AHMED i sur., 2006.), temelji se na odabiru šest gena sa istog kromosoma, od kojih su četiri dobro sačuvani konstitutivni geni (engl. housekeeping genes) (*icdA*, *adk*, *rrs2*, *secY*), dok su dva gena promjenjiva i kodiraju lipopolisaharide vanjske ovojnice (*lipL32*, *lipL41*). Ova shema evaluirana je na 121 soju leptospira šest različitih genomskih vrsta. Geni se nakon umnažanja i sekvenciranja spajaju u nukletidni slijed te međusobno uspoređuju kako bi dobili uvid u pripadnost sojeva određenoj genomskoj vrsti.

Iako se dobivena filogenetska analiza dobro povezala sa taksonomskom genomskom vrstom, dobiveno grupiranje seroloških skupina i serovara je i dalje predmet razmatranja (AHMED i sur., 2006.). Druga shema (7 L-MLST) temelji se na odabiru sedam konstitutivnih gena (*glmU*, *pntA*, *fadD/caiB*, *tpiA*, *pfkB*, *mreA*) sa dva različita kromosoma. Ustanovljeno je da je ovom metodom moguće tipizirati samo *L. interrogans* i *L. kirschneri* (THAIPADUNGPANIT i sur., 2007.; BOONSLIP i sur., 2013.). Ponovni nedostatak je bila nepotpuna podudarnost između tipa sekvence i serovara te je došlo do razvoja treće sheme, koja je objedinila prve dvije. Treća shema (R7L-MLST) uključivala je četiri gena iz 6 L-MLST sheme i tri gena iz 7 L-MLST sheme. Ova kombinirana shema pružila je višu razinu diskriminacije unutar vrsta (VARNI i sur., 2014.). Primjena MLST tipiziranja se pokazala uspješnom i na kliničkim i uzorcima iz okoliša (AGAMPODI i sur., 2013.; CHIANI, 2016.; WEISS i sur., 2016.). Unatoč brojnim prednostima, konvencionalni MLST pristup još uvijek ima određena ograničenja. Opisana je i ribosomska multigenetska tipizacija (engl. *Ribosomal multilocus sequence typing*, rMLST) koji koristi polimorfizme u genima koji kodiraju bakterijske ribosomske proteine (JOLLEY i sur.,

2012.). Iako značajno zahtjevnija i skuplja metoda, mogla bi omogućiti bolju razlučivost standardnih MLST pristupa (MAIDEN i sur., 2013.).

2.1.2.5.2. Tipiziranje na osnovi multilokusnih sekvenci sa većim brojem gena

Veći stupanj razlučivosti može se postići primjenom usporedbe ključnih regija genoma (engl. *Core genome*, cg). Ključne regije genoma uključuju gene prisutne u svim genomskim vrstama određenog mikroorganizma, u ovom slučaju i uz pomoćne gene koji su varijabilno prisutni. Nedavno je opisano tipiziranje na osnovi multilokusnih sekvenci sa većim brojem gena, ukupno njih 545, koji čine ključne regije genoma (engl. *Core genome* MLST, cgMLST). Navedenih 545 gena odabrano je iz uzorka koji je obuhvaćao 42 različite genomske vrste, uključujući 26 seroloških skupina i 73 serovara. Za razliku od konvencionalnog MLST pristupa, cgMLST uključuje patogene, intermedijarno patogene i saprofitske genomske vrste. Istraživani genomi populacija definirali su 463 tipa sekvence (engl. *Core genome sequence type*, cgST) organiziranih u 237 klonalnih grupa (engl. *Core genome clonal type*, CG). Ovim pristupom postignuta je veća diskriminatorska moć (GUGLIEMINI i sur., 2019.).

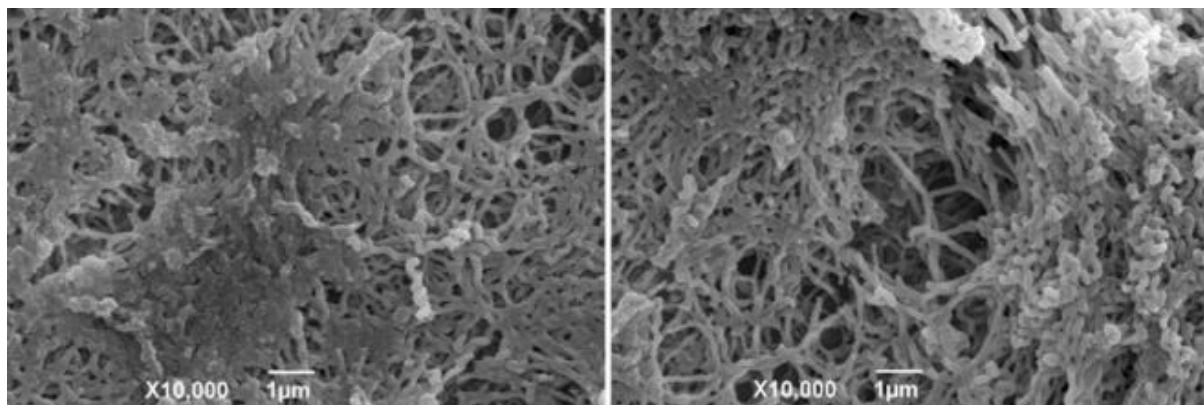
Nedavno je opisana i metoda koja koristi probe ribonukleinske kiseline (RNK) dizajnirane specifično za DNA *L. interrogans* za dokaz ključnih regija genoma leptospira definiranih cgMLST shemom izravno iz kliničkih uzoraka (GRILLOVA i sur., 2023.).

2.1.3. Epizootiologija

Leptospiroza je jedna od najrasprostranjenijih zoonoza od koje obolijevaju brojne vrste domaćih i divljih životinja i čovjek. Leptospire naseljavaju proksimalne bubrežne kanaliće primljivih životinja, od kud se izlučuju mokraćom (leptospiurija), onečišćujući pritom tlo i vode. Izvan organizma, pri povoljnim uvjetima, mogu preživjeti i do 20 mjeseci (ANDRE-FONTAINE i sur., 2015.; BIERQUE i sur., 2020.). Do infekcije najčešće dolazi nakon direktnog kontakta s bolesnom životinjom ili indirektno izlaganjem tlu ili vodi kontaminiranim urinom inficiranih životinja. U organizam leptospire ulaze kroz sluznice ili oštećenu kožu.

Kao i neke druge vrste bakterija (npr. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*), leptospire imaju sposobnost stvaranja specifičnog biofilma (Slika5.). Biofilm je nakupina mikroorganizama i njihovih izvanstaničnih produkata uklopljenih u “matriks”, koji je povezan s određenom površinom. Specifični kemijski spojevi matriksa smatraju se i biološkim markerima bakterijskih biofilmova. Nakon što se bakterije pričvrste za površinu razvijaju mikrokolonije, koje proizvode zaštitni matriks kako bi se formirao zreli biofilm (TOYOFUKU i sur., 2016.). Stvaranja specifičnog biofilma uvelike pridonosi zaštiti i otpornosti na

antimikrobna sredstva, ultraljubičasto zračenje, dehidraciju, oksidaciju, stresne okolišne čimbenike i imunološki odgovor domaćina (LIU i sur., 2016.; THIBEAUX i sur., 2020.; DE CARVALHO i sur., 2023.).



Slika 5. *L. interrogans* (soj C51). Stvaranje i oblikovanje biofilma 21 dan nakon inkubacije. Slikano elektronskim mikroskopom.

(Izvor: DE CARVALHO i sur., 2023.)

Pojavnost leptospiroze u određenom području ovisit će o više čimbenika, no prvenstveno o klimatskim uvjetima, budući da topla i vlažna okolina pogoduje dugotrajnom preživljavanju leptospira u okolišu. Upravo se stoga najveća učestalost ove bolesti bilježi u zemljama tropskog pojasa. Često se opisuju epidemije leptospiroze povezane s izlaganjem kontaminiranim vodama (WYNWOOD i sur., 2014.; KARPAGAM i sur., 2020.). Veća prevalencija leptospiroze utvrđena je na područjima koja imaju veći postotak slatkovodnih obalnih i površinskih voda (WASIŃSKI i sur., 2013.). Zabilježene su epidemije leptospiroze nakon poplava, oluja i drugih meteoroloških ekstrema praćenih značajnim oborinama. Vodeća pretpostavka je da epidemije zapravo nastaju zbog resuspenzije patogena iz tla, gdje leptospira može opstati kroz duže vremensko razdoblje (CASANOVAS-MASSANA i sur., 2018.; BIERQUE i sur., 2020.; HACKER i sur., 2020.). Vjeruje se da tekstura tla, uključujući udio čestica pijeska, mulja i gline, koje čine mineralni dio tla, može imati značajan utjecaj na preživljavanje patogena. Fizikalna svojstva tla kao što su sadržaj vlage, pH, organska tvar, organski ugljik i dušik te njihov omjer također mogu utjecati na postojanost patogena (ERICKSON i sur., 2014.; MOHAMMAD, 2015.).

Razmatrajući odnos s leptospirama, prijemljive životinjske vrste mogu se podijeliti u tri različite skupine: slučajni domaćini, evolucijski domaćini i rezervoari. Slučajni domaćini su životinje koje, poput ljudi, često pokazuju kliničke znakove bolesti, a nakon preboljenja, mogu izlučivati uzročnika urinom tijekom određenog vremenskog perioda (rekonvalescentni kliconoše). Evolucijski domaćini su one životinjske vrste koje su postigle određenu razinu prilagodbe s određenim serovarom leptospira; na primjer, goveda su evolucijski domaćini za serovar Hardjo (LEONARD i sur., 1992.), konji za serovar Bratislava, svinje za serovare Pomona, Tarassovi i Bratislava, šišmiši za serovare Icterohaemorrhagiae i Ballum, dok su psi evolucijski domaćini za serovar Canicola (BOLIN i sur., 2000.). Životinje mogu biti evolucijski domaćini za neke serovare, a slučajni domaćini za druge. pri čemu će infekcija serovarima čiji su nositelji često rezultirati latentnom infekcijom ili blažim oblicima bolesti dok će infekcija drugim serovarima vjerojatno uzrokovati izraženije kliničke oblike (LEVETT, 2001.). Glodavci se smatraju glavnim rezervoarima leptospiroze. Nakon infekcije ne razvijaju kliničke znakove bolesti, a često niti specifična protutijela. Leptospiurija kod rezervoara je visokog intenziteta, stalna i dugotrajna, za razliku od slučajnih i evolucijskih domaćina kod kojih je nižeg intenziteta, intermitentna i vremenski ograničena. Upravo se zbog toga smatra da glodavci imaju ključnu ulogu u održavanju uzročnika u okolišu. Iako se glodavci smatraju glavnim rezervoarima, i drugi su sisavci važni u ciklusu održavanja pojedinih serovara leptospira u okolišu (DIETRICH i sur., 2015.; BARRAGÁN i sur., 2016.). U različitim geografskim područjima zabilježene su određene razlike u prilagodbi pojedinih serovara određenim životinjskim vrstama. Poznavanje prisutnih serovara i njihovih domaćina ključno je za razumijevanje epidemiologije bolesti.

Čovjek se smatra slučajnim domaćinom te kao takav nema značajniju ulogu kao izvor infekcije, iako nakon infekcije može izlučivati leptospire urinom nekoliko tjedana. Iako vrlo rijetko, u ljudi su opisani slučajevi spolnog, transplacentarnog i prijenosa majčinim mlijekom (FAINE i sur., 1999.; CHOW i sur., 2012.).

2.1.3.1. Leptospiroza u pasa

Istraživanja prevalencije leptospiroze u pasa u Europi ukazuju na značajne varijacije u seropozitivnosti, čak između 1,5 do 37,5%. Izrazita razlika u ukupnoj prevalenciji je, vjerojatno, rezultat pretraživanja pasa sa različitih geografskih područja i različitih populacija. Različite studije su tako prikazivale rezultate pretraživanja zdravih životinja, bolesnih odnosno onih kod kojih je postavljena sumnja na leptospirozu, pasa u skloništima, lualica ili vlasničkih pasa. Tradicionalno se leptospiroza u pasa uglavnom povezivala s infekcijom serovarom Canicola,

čiji je evolucijski domaćin pas i serovarom *Icterohaemorrhagiae* čiji je domaćin štakor. Međutim, novija istraživanja ukazuju na promjene u infektivnim serovarima pa danas u pasa sve češće bilježimo i infekcije serovarima iz seroloških skupina Pomona, Grippotyphosa, Australis i Sejroe (ELLIS i sur., 2010.; ŠTRITOF i sur., 2012., RENAUD i sur., 2013.; TAGLIABUE i sur., 2016.). Tako istraživanja u Njemačkoj i Italiji bilježe visoku prevalenciju infekcija uzrokovanih serološkom skupinom Australis i Grippotyphosa (MAYER-SCHOLL i sur., 2013.; TAGLIABUE i sur., 2016.), u Španjolskoj serološkom skupinom *Icterohaemorrhagiae* (19,4%), a u Švedskoj serološkom skupinom Sejroe (64,3%) (LÓPEZ i sur., 2019.; SCAHILL i sur., 2022.). Najveći udio infekcija uzrokovanih serovarima iz serološke skupine Pomona bilježi se u Hrvatskoj (30,8% – 50%), ali i u nekim drugim državama kao što su Grčka i Bosna i Hercegovina (ŠTRITOF i sur., 2012.; ARENT i sur., 2013.; LINDTNER KNIFIĆ i sur., 2019.; HABUŠ i sur., 2020.). Nekoliko je mogućih razloga koji su doveli do promjene infektivnih serovara. Bivalentno cjepivo koje sadrži bakterine serovara *Canicola* i *Icterohaemorrhagiae* bilo je u širokoj uporabi, što je rezultiralo smanjenjem broja infekcija uzrokovanih ovim serovarima. Urbanizacija, klimatske promjene i modifikacije upravljanja vodama mogu utjecati na staništa, populaciju, kretanje i ponašanje rezervoara domaćina (ponajprije glodavaca). Takve promjene pak utječu na geografsku distribuciju serovara (MAYER-SCHOLL i sur., 2013.; BARRAGÁN, 2017.), a posljedično izlaganjem pasa rezervoarima ili kontaminiranom okolišu i promjenu u infektivnim serovarima. Moguće su i evolucijske promjene leptospira koje omogućuju određenim serovarima da postanu „uspješniji“ u inficiranju pasa, što ponovno dovodi do promjena u dominantnim serovarima (ALTON i sur., 2009.). Dodatno, napredak u dijagnostičkim alatima uvelike je olakšao identifikaciju, što je pak omogućilo prepoznavanje prethodno neidentificiranih izolata (RENAUD i sur., 2013.).

Okolišni čimbenici, način držanja i ponašanje smatraju se ključnim rizičnim čimbenicima leptospiroze pasa. Psi koji provode mnogo vremena na otvorenom (npr. lovački psi) te psi u ruralnim ili prigradskim područjima, izloženi su većem riziku. Aktivnosti poput plivanja u prirodnim izvorima vode, kao što su ribnjaci, jezera i potoci, značajno povećavaju izloženost bakterijama iz roda *Leptospira* (GAUTAM i sur., 2010.; RENAUD i sur., 2013.). Loši zoohigijenski uvjeti, gusto naseljena područja ili područja sa visokom populacijom glodavaca također predstavljaju rizični faktor (LEVETT, 2001.; HARTSKEERL i sur., 2011.; SCHULLER i sur., 2015.). Prevalencija leptospiroze može biti osobito visoka u skloništima i

uzgajivačnicama gdje je smješten velik broj pasa na malom prostoru (ROJAS i sur., 2010.; DELAUDE i sur., 2017.; MIOTTO i sur., 2018.).

Do infekcije u pasa, kao i u drugih vrsta, dolazi izravnim kontaktom s urinom inficiranih životinja, odnosno vjerojatno još češće kontaktom s kontaminiranom vodom ili tlom. Psi se također mogu inficirati prilikom ulova glodavaca, kada leptospire preko sluznica usta ulaze u krvotok. Izlučivanje leptospira mokraćom kod pasa obično počinje unutar sedam do deset dana nakon početne infekcije, a može trajati tjednima do mjesecima. Duljina izlučivanja ovisit će o inficiranoj jedinci i vjerojatno infektivnom serovaru (LEVETT, 2001.). Istraživanja su pokazala da je raspon prevalencije izlučivanja leptospira urinom kod pasa između 0,2 i 31,1 % (ROJAS i sur., 2010.; DELAUDE i sur., 2017.; SANT' ANNA i sur., 2017.), a količina leptospira izlučenih u mokraći značajna, čak do $1,6 \times 10^5$ leptospira dnevno (BARRAGAN i sur., 2017.).

2.1.4. Patogeneza

Patogenetski mehanizmi djelovanja leptospira na domaćina istražuju se već desetljećima, no još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. Smatra se da u patogenezi sudjeluju čimbenici virulencije poput pokretljivosti, sposobnosti prijanjaja i stvaranja toksina. U interakciji s makroorganizmom važnu ulogu imaju površinski proteini i imunoposredovani mehanizmi domaćina. Površinski proteini funkcionalno, za sve bakterije, djeluju kao barijere te su uključeni i u proces uzimanja hranjivih tvari za daljnji rast bakterija (DiRIENZO i sur., 1978.). Lipoprotein L32 (*lipL32*), protein vanjske ovojnice LI (engl. *Outer membrane protein L1*, OmpL1), imunoglobulinima sličan protein leptospira (engl. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins, Lig) te endostatina sličan protein leptospira (engl. *Leptospira* endostatin-like protein, Len) su najviše istraženi i opisani proteini za koje se smatra da igraju značajnu ulogu u patogenezi ove bolesti (YANG i sur., 2002.; MATSUNGA i sur., 2003.; RISTOW i sur., 2007.; STEVENSON i sur., 2007.; LIN i sur., 2008.).

Leptospire u organizam ulaze preko sluznica i oštećene kože, pa je u početnoj fazi infekcije, tijekom prodiranja u organizam, pokretljivost leptospira izuzetno važna. Sekvenciranjem i analizom genoma ustanovljeno je da od 4768 gena, najmanje 50 kodira pokretljivost (REN i sur., 2003.). Specifičan način kretanja omogućava im relativno jednostavan i brz prolazak kroz viskoznije medije, pogotovo vezivna tkiva domaćina (CHARON i sur., 1992.). Za razliku od drugih spiroheta koje se kod ulaska u organizam umnažaju na mjestu ulaska pri čemu stvaraju vidljive lezije, endoflagele leptospirama omogućuju da brzo prijeđu stanične barijere, uđu u krvotok, šire se hematogeno i umnažaju se u ciljnim organima (JOHNSON i sur., 2018). Na taj

način izbjegavaju prepoznavanje flagelina od strane imunološkog sustava. Čini se da je za učinkovitu transmigraciju preko tkivne barijere domaćina važno i ometanje spojeva koji su sastavni dio međustaničnih adherenskih spojeva epitela i endotela (VE- i E-kadherini). Mehanizam ulaska u stanice reguliran je proteinima kao što su npr. LigB i *lipL* 32, koji se mogu vezati za komponente izvanstaničnog matriksa, kao što su fibronektin, elastin i kolagen i prijanjati na plazminogen (MURRAY, 2015.; FERNANDES i sur., 2016.). Uz pomoć specifičnog Mce (engl. *Mammalian cell entry*, Mce) proteina leptospire se vežu za različite stanice, uključujući endotelne stanice, monocite, bubrežne epitelne stanice i fibroblaste (FRAGA i sur., 2011.) što im omogućuje kolonizaciju, replikaciju i preživljavanje u različitim tkivima domaćina. Virulentni sojevi leptospira iskazuju sposobnost kemotaksije prema hemoglobinu (YURI i sur., 1993.).

Nakon ulaska leptospira u organizam počinje stadij bakterijemije, u trajanju od oko sedam dana. Ova faza infekcije završava pojavom cirkulirajućih protutijela. Porastom specifičnih protutijela dolazi do neutralizacije i uklanjanja leptospira iz krvotoka, no one se zadržavaju u proksimalnim bubrežnim kanalicima te započinje njihovo izlučivanje urinom.

Smatra se da je primarni patogenetski proces leptospiroze vezan uz oštećenje endotela krvnih žila sa posljedičnom lokaliziranom ishemijom te u konačnici nekrozom tkiva u ciljnim organima (jetra, pluća i bubrezi). Leptospire izlučuju veliki broj enzima koji razgrađuju stanične membrane što dodatno pogoršava tijek kliničke slike (NASCIMENTO i sur., 2004.). Pretpostavlja se da teži oblici bolesti zapravo nastaju kao rezultat pretjeranog imunološkog odgovora domaćina. Prilikom prijanjanja leptospira na stanice domaćina dolazi do izlučivanja upalnih citokina (interleukin-6, interleukin-10 i TNF- α) i antimikrobnih peptida (AMP) koji bi trebali ograničiti i spriječiti daljnja oštećenja tkiva. No, imunološki sustav domaćina koji kontinuirano otpušta prekomjerne količine citokina dovodi do sve veće destrukcije stanica (CAGLIERO i sur., 2018.).

Imunoposredovane reakcije predstavljaju patogenu osnovu razvoja oftalmoloških lezija koje se javljaju u konja i ljudi. Rekurentni uveitis je tako najvjerojatnije posljedica autoimunih reakcija na tvorbu protutijela (REN i sur., 2003.; WOLLANKE i sur., 2021.). Ključni čimbenik u patogenezi rekurentnog uveitisa kod konja je sličnost antigenskih epitopa oka konja s epitopima leptospira. Ovaj fenomen, poznat kao molekularna mimikrija, događa se kada imunološki sustav zbog strukturnih sličnosti zamijeni vlastita tkiva sa stranim antigenima (FABER i sur., 2000.; VERMA i sur., 2010.; ACKERMANN i sur., 2021.).

Leptospirozni plućni hemoragijski sindrom (LPHS) posebno je teški klinički oblik, koji je sve više prepoznat kao jedan od glavnih uzroka smrtnosti u pasa i ljudi oboljelih od leptospiroze (KOHN i sur., 2010.; MEDEIROS i sur., 2010.). LPHS karakterizira brzo i progresivno intraalveolarno krvarenje. Patogenetski mehanizmi LPHS-a slabo su razjašnjeni, ali se objašnjavaju razvojem patofizioloških procesa koji utječu na faktore koagulacije, poput trombocitopenije i diseminirane intravaskularne koagulopatije, vaskulitisa i imunološki posredovanih mehanizama (CRODA i sur., 2010.; DEL CARLO BERNARDI i sur., 2012.; SCHULLER i sur., 2015.). Podlogu za razvoj LPHS-a čini tvorba toksina koji djeluju na endotel i njihovo vezanje na vaskularne kadherine (VE kadherine), što dovodi do oštećenja endotela, povećane propusnosti te pucanja i otvaranja međustaničnih spojeva (NICODEMO i DUARTE-NETO, 2021.).

Imunost kod leptospiroze je najvećim dijelom posljedica humoralnog odgovora organizma. Tvorba protutijela usmjerena je na antigene vanjske ovojnice specifične za serovar te takva stečena imunost štiti samo od infekcije istim ili srodnim serovarom (unutar serološke skupine).

2.1.5. Klinička slika

2.1.5.1. Klinička slika leptospiroze u pasa

Kliničko očitovanje ovisi o imunosnom statusu domaćina, infektivnoj dozi i virulenciji soja koji je uzrokovao bolest. Infekcija tako može biti praćena raznolikim spektrom kliničkih pojavnosti; od subkliničkih infekcija do teških septikemijskih oblika bolesti praćenih otkazivanjem bubrega i/ili plućnim hemoragijskim sindromom uz visoku stopu smrtnosti. Određeni serovari, iz trenutno još nepoznatih razloga, uzrokuju teže kliničke oblike od ostalih. Prosječno vrijeme inkubacije je 5 do 15 dana.

Etiološka dijagnoza najčešće se postavlja u pasa koji razviju teže kliničke oblike koji su praćeni akutnom bubrežnom ozljedom (engl. *Acute kidney injury*, AKI) i oštećenjem jetre (SCHULLER et al., 2015). Bolesti bubrega i jetre se najčešće javljaju zajedno uzrokujući tzv. hepatorenalni sindrom, no nisu nužno povezani (RAHMAN i sur., 2021.). Bolesti jetre se očituju kao kolestatska hepatopatija, a bolesti bubrega kao tubulointersticijski nefritis. Klinički znakovi koji prate ove tipične kliničke oblike uključuju povišenu tjelesnu temperaturu, letargiju, nevoljkost pri kretanju (koja može biti posljedica bolnosti miškulature) anoreksiju, povraćanje, poliuriju sa polidipsijom i abdominalnu bol. Može se javiti oligurija i u konačnici anurija. Opisuju se slučajevi praćeni ikterusom (Slika 6.), ali i oni kod kojih žutica izostaje. U pasa se (kao i u ljudi) sve češće opisuje i pojava leptospiroznog plućnog hemoragijskog

sindroma (LPHS) koji je povezan s lošom prognozom i visokom stopom smrtnosti (KLOPFLEISCH i sur., 2010.; KOHN i sur., 2010.; MAJOR i sur., 2014). LPHS karakterizira alveolarno krvarenje (Slika 7.) i edem, a može doći i do nakupljanja fibrina i drugih poremećaja u funkciji alveola (MEDEIROS i sur., 2010.; SYKES i sur., 2023.). Klinički se očituje otežanim, plitkim i ubrzanim disanjem, a u težim oblicima i iskašljavanjem krvi i krvarenjem iz nosa praćenim hipoksemijom i anemijom. Rendgenološki se očituje naglašenim bronhointersticijskim i alveolarnim plućnim crtežom (Slika 8.).



Slika 6. Žuto obojenje sluznica (ikterus) kod psa s potvrđenom leptospirozom.

(Ljubaznošću izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš)



Slika 7. Difuzna krvarenja po plućima psa sa potvrđenom leptospirozom i LPHS-om.

(Ljubaznošću izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš)

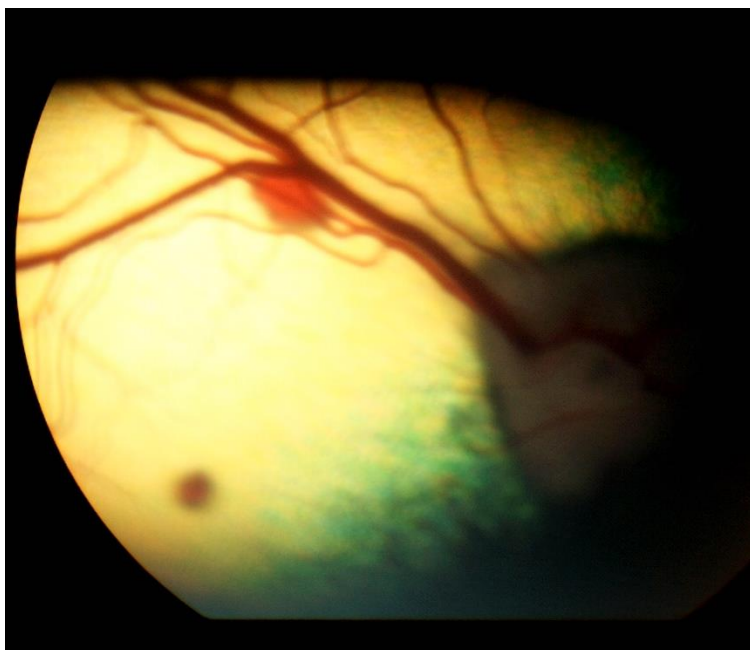


Slika 8. Rendgenološka lateralna projekcija pluća psa sa potvrđenim LPHS-om –izražen bronhointersticijski i alveolarni crtež.

(Arhivska snimka: Zavod za rendgenologiju i ultrazvučnu dijagnostiku, Veterinarski fakultet Sveučilište u Zagrebu)

Uz navedene patološke procese, u pasa se opisuje i povećana sklonost krvarenju, uglavnom zbog diseminirane intravaskularne koagulopatije koja se javlja u otprilike 20 do 50% teških kliničkih slučajeva (KNÖPFLER i sur., 2017.; BARTHELEMY i sur., 2020.).

Povećana sklonost kvarenjima očituje se krvarenjima iz usta i nosa, melenom, hematurijom te razvojem petehija i ekhimoza. Zabilježeni su slučajevi pobačaja i promjena na očima u obliku uveitisa i retinalnih krvarenja (GOLDSTEIN i sur., 2012.; VERMA i STEVENSON, 2012.; VIOLETTE i LEDBETTER, 2018.) (Slika 9.). Zahvaćenost ostalih organskih sustava, njihovo kliničko očitovanje i dijagnostički parametri opisani su u Tablici 2.



Slika 9. Pozadina oka psa s retinalnim krvarenjima posljedično leptospirozi. Snimljeno fundus kamerom.

(Ljubaznošću dr. sc. Valentina Plichta, DVM)

Tablica 2. Organski sustavi, kliničko očitovanje i dijagnostički parametri

Organski sustav	Kliničko očitovanje	Dijagnostički parametri
Gušterača (Pankreatitis)	Povraćanje, proljev, abdominalna bol	Povišenje amilaze i lipaze (lipaza DGGR)
Srce (Miokarditis)	Aritmije	Poremetnje u EKG-u, povišenje serumskog troponina
Krvožilni sustav (Vaskulitis)	Periferni edemi, izljevi u pleuralnu i abdominalnu šupljinu	Rendgenološki vidljivi izljevi
Reproduktivni sustav	Pobačaji, neplodnost	
Lokomotorni sustav (Miozitis)	Opća slabost ekstremiteta	Povišenje kreatin- kinase (CK)

Laboratorijski nalazi.

Leptospirozu u pasa gotovo uvijek prati leukocitoza sa sporadičnom limfopenijom i monocitozom te blagom do umjerenom anemijom (GOLDSTEIN i sur., 2006.; GRIEBSCH i sur., 2022.). Vrlo rijetko dolazi do jakih anemija, koje mogu uslijediti nakon gastrointestinalnog ili plućnog krvarenja (GREENLEE i sur., 2004.). Patogene leptospire imaju izravne citotoksične učinke na trombocite sa posljedičnim uništavanjem trombocita, pa su navedeni nalazi praćeni i trombocitopenijom.

Akutno oštećenje bubrega praćeno je s povišenom koncentracijom uree, kreatinina i fosfora u krvi, a oštećenje jetre praćeno je povišenjem jetrenih enzima; alkalne fosfataze (ALP), alanin-aminotransferaze (ALT) i aspartat-aminotransferaze (AST). Hiperbilirubinemija se obično javlja u odsutnosti drugih kliničko-patoloških znakova zatajenja jetre. Dodatno se opaža i blaga do umjerena hipoalbuminemija (TANGEMAN i sur., 2013.; KNOPFLER i sur., 2017.; RAJ i sur., 2021.). Poremećaji statusa elektrolita uključuju hiperkalijemiju, hipokalijemiju, hiponatrijemiju i hipokloremiju (RAJ i sur., 2021.; SYKES i sur., 2023.), a pogoršavaju se izravnom inhibicijom tubularne $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-aze}$ toksinima leptospira. C-reaktivni protein može biti umjereno povišen, iako se njegovo povišenje očekuje i kod drugih uzroka bubrežnog zatajenja (BUSER i sur., 2019.). Uz trombocitopeniju, najčešći poremećaji koagulacija uključuju produženo protrombinsko vrijeme, produženo aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme, hiperfibrinogenemiju, hipofibrinogenemiju, nisku koncentraciju antitrombina i povećane koncentracije D-dimera.

2.1.5.2. Osobitosti kliničke slike u ostalih vrsta domaćih životinja

Konji. Leptospiroza kod konja obično prolazi subklinički. Ukoliko dođe do pojave kliničkih znakova, najčešće se očituju kao rekurentni uveitis i reproduktivni poremećaji. Reproductivni poremećaji uglavnom su uzrokovani infekcijom serovarima serološke skupine Pomona (TURK i sur., 2013.; DIVERS i sur., 2019.), a očituju se placentitisom, pobačajima u kasnom tijeku graviditeta, neonatalnom smrtnošću te rađanjem avitalne ždrebadi (TIMONEY i sur., 2011.; VERMA i sur., 2013.). Rekurentni uveitis (mjesečna sljepoća ili periodična oftalmija) kroničnog je tijeka i karakteriziran upalom šarenice i cilijarnog tijela (COOK i HARLING, 1983.). Najčešće se povezuje s infekcijom serovarom Grippothyphosa (BRANDES i sur., 2007.; HARTSKEERL i sur., 2004.). Rani znakovi bolesti uključuju miozu, blefarospazam, fotofobiju te edem očnog kapka i rožnice. Svaka iduća akutizacija upalnog procesa obilježena je mnogo težim upalnim odgovorom koji rezultira ozbiljnim ozljedama očnih komponenti. Sekundarna mrena, prednja ili stražnja adhezija šarenice, luksacija leće, eksudati u staklovini i odvajanje mrežnice pojavljuju se kao rezultat jakog upalnog oštećenja (GILGER i sur., 2000.; GILGER i MICHAU, 2004.; VERMA i sur., 2013.).

Goveda su evolucijski domaćini za serovare Hardjo (Hardjobovis i Hardjoprajitno). Infekcije ovim serovarima obično rezultiraju kroničnim tijekom i očituju se smanjenim reproduktivnim parametrima. Pobaćaji, smanjenje proizvodnje mlijeka te rađanje avitalne teladi dovodi do velikih gospodarskih i ekonomskih gubitaka i češće je povezano s infekcijom serovarima kao što su Pomona, Icterohaemorrhagiae i Grippotyphosa. U teladi leptospiroza može uzrokovati teže kliničke oblike (povišena temperature, žutica, uginuće) (FAINE i sur., 1999.; ELLIS i sur., 2015.). Serovari koje povezujemo sa leptospirozom u **ovaca i koza** su Pomona, Grippothyphosa, Hardjo, Bratislava i Sejroe. Bolest uglavnom prolazi subklinički. Rijetko se opisuju klinički znakovi kao što su pobaćaj, rađanje avitalne janjadi i jaradi, smanjenje proizvodnje mlijeka i neplodnost (ELLIS i sur., 1983.; LILENBAUM i sur., 2008.).

Svinje su domaćini serovara Pomona, Tarassovi i Bratislava, no zabilježeni su i slučajevi infekcije brojnim drugim serovarima (ELLIS i sur., 2015.; STRUTZBERG-MINDER i sur., 2018.; STRUTZBERG-MINDER i sur., 2022.). U odraslih jedinki kliničko očitovanje bolesti je uglavnom subkliničko ili se očituje pobaćajem, rađanjem avitalne ili mrtve prasadi. Kod prasadi i tovljenika klinički se može očitovati povišenom temperaturom, žuticom i slabim prirastom (BOLIN, 1994.).

Mačke. Iako možemo pretpostaviti da su infekcije mačaka leptospirama česte, klinička očitovanja bolesti su vrlo rijetka. Različita istraživanja utvrdila su prisutnost specifičnih protutijela nastalih uslijed infekcijom serovarima Australis, Autumnalis, Ballum, Bratislava, Canicola, Grippotyphosa, Hardjo, Icterohaemorrhagiae, Pomona i Saxkoebing (MARKOVICH i sur., 2012.; RODRIGUEZ i sur., 2014.; ROSE i sur., 2016.; SPRIßLER i sur., 2019.; WEIS i sur., 2017.). Pokusnim infekcijama utvrđeni su subklinički oblici ili pojava blažih kliničkih oblika uz porast tjelesne temperature i pojavu proljeva (ANDRÉ-FONTAINE, 2006.). Literatura opisuje i prirodne infekcije koje su se očitovale akutnim glomerulonefritisom uz poliuriju i polidipsiju, letargijom i anoreksijom (ARBOUR i sur., 2012). Istražuje se i uzročno-posljedična veza između infekcije leptospirama i kronične bubrežne insuficijencije (HARTMAN i sur., 2020.).

2.1.6. Dijagnostika leptospiroze

U dijagnostici leptospiroze od iznimne važnosti su pravovaljani anamnestički podatci. Budući da je izvor infekcije najčešće kontaminirani okoliš, važno je odgovoriti na pitanja o boravku čovjeka ili životinje u prirodi, osobito u blizini voda i rijeka, te o mogućem kontaktu s rezervorima bolesti. Profesionalno izložene osobe (poljoprivrednici, veterinari) su izloženi većem riziku. Klinička očitovanja bolesti kod različitih domaćina su prethodno opisana, no obzirom na njihovu raznolikost uvijek je potrebno bolest potvrditi objektivnim metodama dijagnostike kojim dokazujemo uzročnika ili prisustvo specifičnih protutijela.

2.1.6.1. Dokaz uzročnika

2.1.6.1.1. Izdvajanje leptospira iz kliničkog materijala

Leptospire je moguće izdvojiti iz različitih kliničkih materijala. Tijekom prvih sedam do deset dana bolesti leptospire se mogu izdvojiti iz krvi, cerebrospinalne tekućine i većine parenhimskih organa. Nakon prvog tjedna bolesti dokazujemo ih u urinu i bubrezima (renokultura). Materijal bi trebalo uzorkovati prije početka antibiotske terapije, a za izdvajanje su nam potrebne odgovarajuće hranidbene podloge (EMJH ili Korthof) i mikrobiološka biozaštitna komora. Krv i cerebrospinalna tekućina se naciepljuje direktno na hranidbene podloge, a potrebno je dvije do tri kapi uzorka. Pri izdvajanju leptospira iz urina potrebno je prvotno neutralizirati kiseli pH urina, urin centrifugirati te dobiveni sediment naciepiti na hranidbenu podlogu. Dodatnim razrjeđenjima može se pokušati povećati uspješnost izdvajanja, a dodatkom fluorouracila možemo spriječiti kontaminaciju ostalim bakterijama iz urina (WOLF, 1954.; LEVETT i sur., 2005.). Pripremljene hranidbene podloge inkubiraju se na 28

do 30° C. Pomoću mikroskopa s tamnim vidnim poljem provjerava se rast leptospira svakih sedam dana kroz naredna tri do četiri mjeseca.

2.1.6.1.2. Izravni dokaz leptospira u tkivima ili tjelesnim tekućinama

U tjelesnim tekućinama leptospire su vidljive pomoću mikroskopa s tamnim vidnim poljem pod povećanjem od 100x i 400x. Činjenice da je potrebna velika koncentracija leptospira (10^4 leptospira/ml) te da se leptospire lako mogu zamijeniti za niti fibrina ili proteina čine ovu metodu nepreciznom i nepouzdanom. Nešto veću pouzdanost postići ćemo dokazivanjem leptospira histološkim preparatima nakon specifičnih bojanja (impregnacija srebrom i bojanje po Warthin-Starry-u) (WOLF, 1954.; TURNER, 1970.).

2.1.6.1.3. Dokaz leptospira molekularnim metodama

Lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase chain reaction*, PCR) i lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real Time-PCR*) su osnovne molekularne metode koje koristimo u dijagnostici leptospiroze. Ovim molekularnim metodama dokazuje se prisutnost genetskog materijala (DNK) leptospira u prethodno navedenom kliničkom materijalu. Obzirom da uzgoj leptospira može trajati i do nekoliko mjeseci ove metode imaju prednost jer omogućavaju brzo i objektivno postavljanje dijagnoze, a ujedno zahtijevaju i manju koncentraciju bakterija u pretraživanom uzorku. Važno je napomenuti da se koriste specifične početnice kojima se neće umnožiti DNK ostalih bakterija pa kontaminacija uzorka neće utjecati na rezultat. Opisan je velik broj početnica koje se mogu koristiti za dijagnostiku leptospiroze (BROWN i sur., 1995., MÉRIEN i sur., 1995., LEVETT i sur., 2005., SLACK i sur. 2006.; AHMED i sur., 2009.; HAAKE i LEVETT, 2015.). Nedostatak ovih molekularnih metoda je nemogućnost identifikacije infektivnog serovara, što nema kliničko značenje ali doprinosi razumijevanju epidemiologije i epizootiologije bolesti.

Obzirom da su se molekularne metode novije generacije pokazale važnima u filogenetskim, epidemiološkim i biološkim istraživanjima, postoji sve veći interes za njihovo korištenje u tipiziranju uzročnika izravno iz kliničkog materijala. Zahtjevan rast i uzgoj leptospira kao i niska koncentracija bakterijske DNK u kliničkom materijalu te činjenica da određeni serovari zahtijevaju obogaćivanje u hranidbenim podlogama značajno ograničavaju njihovo korištenje (HORNSBY i sur., 2020.). Ovo je posebno važno za patogene, koji se nalaze u malim koncentracijama u organizmu domaćina i čija je kultivacija posebno otežana. Nedavno je opisana molekularna metoda nove generacije, bazirana na cgMLST shemi, koja koristi biotinizirane RNK sonde dizajnirane specifično za DNK *L. interrogans* kako bi se identificirale

ključne regije genoma leptospira, izravno iz rutinskih dijagnostičkih uzoraka. Ovo istraživanje je po prvi put prikazalo uspješno i točno sekvenciranje genoma leptospira izravno iz bioloških uzoraka (GRILLOVA i sur., 2023.).

2.1.6.2. Serološke metode dijagnostike

Specifična protutijela u krvi mogu se dokazati između petog i sedmog dana bolesti raznim serološkim metodama kao što su mikroskopska aglutinacija, imunoenzimni testovi, reakcije vezanja komplementa i sl. Referentna metoda serološke dijagnostike je mikroskopska aglutinacija (MAT), razvijena 1918. godine (MARTIN i PETTIT, 1918.), kojom dokazujemo prisutnost IgM i IgG protutijela u pretraživanom serumu. MAT je kvalitativna i kvantitativna metoda kojom određujemo postoje li u pretraživanom serumu protutijela za određeni serovar te u kojem titru. Kvantitativni test izvodi se u dvostrukim serijskim razrjeđenjima istraživnog seruma, te se određuje titar protutijela za svaki pojedini antigen u panelu koji je u kvalitativnom dijelu reakcije dao pozitivan rezultat. Panel antigena koji čini niz referentnih sojeva, a ovisan je o epizootiološkim i epidemiološkim podacima geografskog područja, prilagođen je pojedinim životinjskim vrstama ili čovjeku (DIKKEN i KMETY, 1978.). Ovom subjektivnom metodom određuje se, pod mikroskopom s tamnim vidnim poljem, postotak aglutiniranih leptospira u odnosu na negativnu kontrolu. Svaki serum u kojem je aglutiniralo najmanje 50% leptospira smatra se pozitivnom reakcijom. Za dokaz akutne infekcije MAT-om se pretražuju parni serum. Četverostruki ili veći porast titra u drugom serumu dokaz je akutne infekcije. Vjerojatno infektivnim serovarom smatramo onaj koji je reagirao s najvišim titrom. Koaglutinacije koje se ponekad javljaju su posljedica unakrižne reakcije s heterolognim ali srodnim serovarom. Paradoksalnom reakcijom nazivamo onu reakciju (koja je česta u ranom stadiju) tijekom koje se najviši titar utvrđuje za onaj serovar koji nije uzrokovao infekciju (LEVETT, 2001.). Unatoč prednostima (specifičnost i mogućnost određivanja vjerojatno infektivnog serovara) MAT ima brojne tehničke nedostatke kao što su kompleksnost izvođenja, otežana standardizacija i unakrižne reakcije između seroloških skupina.

Od seroloških metoda dijagnostike još se koriste i komercijalni brzi testovi koji se temelje na imunoenzimnom testu (engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA). Ovi testovi potvrđuju prisutnost specifična IgM protutijela za proteine vanjske ovojnice u serumu, koji se pojavljuju u ranim fazama bolesti, već u prvih tjedan dana (ABDOEL i sur. 2011.).

2.1.7. Liječenje i prevencija

Liječenje leptospiroze uključuje antimikrobnu i potpurnu terapiju te kod teških oblika i invazivnije medicinske postupke (npr. dijaliza). Leptospire su osjetljive na velik broj antimikrobnih pripravaka kao što su beta-laktamski antibiotici, makrolidi, tetraciklini, fluorokinoloni i aminoglikozidi. Optimalna antimikrobna terapija težih kliničkih oblika uključuje kombinaciju antibiotika. U početnoj fazi bolesti liječenje započinje s penicilinskim pripravcima, poželjno u intravenskoj primjeni, kako bi suzbili bakterijemiju. Nakon stabilizacije pacijenta slijedi primjena tetraciklina kako bi uklonili leptospire iz bubrega i spriječili kliconoštvo (FAINE i sur., 1999.). Izuzetno je važno napomenuti da je izlučivanje moguće i nakon provedene antibiotske terapije (JUVET i sur., 2011., MAURO i HARKIN, 2019.), stoga treba obratiti pažnju na odgovarajuće provođenje iste. Optimalno trajanje antimikrobne terapije je potrebno dodatno istražiti.

Provođenje mjera opće profilakse gotovo je nemoguće u potpunosti provesti kod bolesti prirodnog žarišta. Kontrola brojnosti populacije glodavaca te nadzor subklinički inficiranih domaćih i divljih životinja predstavljaju glavne mehanizme provođenja mjera opće profilakse. Sveobuhvatno razumijevanje eko-epidemioloških i kulturnih karakteristika zajednice bitan je preduvjet za razvoj učinkovite i prihvatljive mjere kontrole. Cjepiva protiv leptospiroze učestalo se koriste u imunoprofilaksi određenih životinjskih vrsta (goveda, svinje i psi). Proizvedena su inaktivacijom cijele bakterijske stanice i stvaraju kratkotrajnu i djelomičnu imunost zbog nedostatka unakrižne zaštite između pojedinih seroloških skupina. Bakterinska cjepiva dostupna u Europi su uglavnom bivalentna ili četverovalentna i ovisno o proizvođaču sadrže serovare *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Grippotyphosa*, *Sejroe* ili *Bratislava*. Uzimajući u obzir da je došlo do promjene infektivnih serovara te da serovar *Pomona* ima sve veći značaj, bilo bi dobro imati na raspolaganju bakterijska cjepiva koja sadrže i spomenuti serovar. Važno je napomenuti da je takvo četverovalentno cjepivo dostupno u Sjevernoj Americi.

2.1.8. Zoonotski potencijal leptospira

Određena zanimanja povezana uz rad sa domaćim životinjama ili njihovim proizvodima jedan su od čimbenika rizika za pojavu leptospiroze u ljudi (LEVETT, 2001.; LAU i sur., 2010.; HAAKE i LEVETT, 2015.). Osobe koje su izložene riziku uključuju veterinare, stočare, poljoprivrednike, radnike i inspektore u klaonicama (LEVETT, 2001). Rizik od leptospiroze među veterinarima koji se primarno bave farmskim životinjama opisan je još 1986. godine

(KINGSCOTE, 1986.), no manje je poznato postoji li rizik i za veterinare koji rade u maloj praksi. Kontakt s urinom i krvlju inficiranih životinja rizični su čimbenici. Kao što je već spomenuto, urin predstavlja osobito značajan izvor infekcije jer psi urinom mogu izlučivati leptospire tjednima nakon primarne infekcije. PH urina pasa koji se kreće između 6 i 7,5 pogoduje održavanju leptospira, jer im najviše odgovara pH između 7,2 i 7,6. Stoga je provođenje biosigurnosnih mjera prilikom kontakta s urinom potencijalno inficiranog psa od iznimne važnosti. Nedavna istraživanja imala su za cilj odrediti čimbenike rizika kod veterinara male prakse koji su bili u kontaktu s inficiranim psima. Ustanovljeno je da iako postoji potencijal za prijenos patogenih leptospira s inficiranih pasa na ljude, čini se da je rizik od takvog prijenosa niži nego onaj u veterinara koji rade s farmskim životinjama (GUAGLIARDO i sur., 2019.).

2.1.8.1. Klinička slika u ljudi

Infekcija leptospirama u ljudi može biti subklinička ili se očitovati u blažem obliku uz pojavu povišene tjelesne temperature, glavobolje, bolova u mišićima i trbuhu, te povremeno mučnine, povraćanja i proljeva. Ovi klinički znakovi obično traju oko tjedan dana i u većini slučajeva su samolimitirajući. Nestanak kliničkih znakova podudara se sa nastankom protutijela. Oko 5-15 % pacijenata sa leptospirozom razvija teški, oblik koji se naziva i Weilova bolest. Weilova bolest karakterizirana je žuticom, zatajenjem bubrega, oštećenjem jetre i krvarenjima. Konjuktivalna krvarenja uz povišenu temperaturu i žuticu su gotovo patognomoničan nalaz leptospiroze u ljudi. Povećana sklonost krvarenju se može očitovati i pojavom petehija i ekhimoza te krvarenjem desni, usne šupljine i nosa. Može se javiti i subarahnoidalno krvarenje koje je povezano sa visokom smrtnosti. U ljudi se, kao i u pasa, bilježi porast pojavnosti LPHS-a koji je praćen stopom smrtnosti od oko 50% (VINETZ i WATT, 2020.).

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Leptospiroza je re-emergentna zoonoza koja se u pasa očituje različitim kliničkim oblicima, varirajući od vrlo blagih slučajeva do teških oblika sa letalnim ishodom. Zbog kompleksnosti etiologije i dobro poznate sposobnosti genske prilagodbe patogenih bakterija roda *Leptospira*, postizanje konsenzusa oko metode genotipizacije izrazito je važno. Molekularna epidemiologija nema samo za cilj definirati, identificirati i pratiti određeni patogen na različitim taksonomskim razinama, već i evaluirati kako genetska raznolikost utječe na kliničko očitovanje bolesti i ishode liječenja. Različiti serovari leptospira povezani su s različitim kliničkim očitovanjem bolesti. Ostaje za istražiti bi li identifikacija specifičnog genotipa mogla biti korisnija u predviđanju kliničkih ishoda, usmjeravanju liječenja i provedbi učinkovitih preventivnih mjera. Razvoj novih molekularnih metoda otvara mogućnost bržeg i taksonomski ispravnijeg načina identifikacije patogena. Slijedom navedenog, postavljeno je nekoliko ciljeva ovog istraživanja. Prvi cilj je prikupljanje kliničkih sojeva *Leptospira* izdvojenih iz pasa na području Republike Hrvatske. Izolacija patogena iz kliničkog materijala i uzgoj u laboratorijskim uvjetima ključna je za dobivanje reprezentativnih sojeva koji uzrokuju leptospirozu pasa u ovom geografskom području. Nakon prikupljanja izolata, idući cilj je tipizacija izdvojenih sojeva *Leptospira* serološkim (MAT) i konvencionalnim molekularnim (MLST) metodama te pomoću tehnologija sekvenciranja novih generacija (cgMLST). Rezultati dobiveni ovim molekularnim metodama usporediti će se kako bi se procijenila njihova učinkovitost u razlučivanju različitih kliničkih izolata. MLST omogućuje identifikaciju i uvid u filogenetske odnose izolata leptospira izdvojenih iz pasa, dok će cgMLST omogućiti dubinsku analizu genetske strukture sojeva. Fokus će biti na genima i regijama genoma koje su ključne za virulenciju i adaptaciju na domaćina, čime bi se omogućilo bolje razumijevanje bioraznolikosti vrste u cjelini. Primjena ove metode mogla bi riješiti izazove vezane uz ograničenu razlučivost srodnih izolata te omogućiti precizniju karakterizaciju kliničkih sojeva. Očekivani rezultat ovog istraživanja temelji se na primjeni tehnologija sekvenciranja novih generacija koje pridonose boljoj determinaciji kliničkih sojeva i razumijevanju genetskih čimbenika patogenosti i osjetljivosti domaćina. Bolja determinacija kliničkih sojeva *Leptospira* neophodna je za predviđanje težine kliničke slike i ishoda liječenja, ne samo kod pasa već i kod drugih domaćih životinja, ali i kod ljudi.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Odabir izolata

Broj potrebnih uzoraka temeljio se na izračunu očekivane proporcije pozitivnih životinja unutar istraživane populacije (HABUŠ i sur., 2017.) uz interval pouzdanosti od 95% i prihvatljivu marginalnu pogrešku od 5%, uzimajući u obzir da je izdvajanje leptospira iznimno zahtjevan, dugotrajan, ponekad i u trajanju od 6 mjeseci, te u visokom postotku neuspješan proces (ELLIS, 2015.). Kako bi se prikupio potreban broj izolata za genotipizaciju (n=20) u istraživanje su uključeni svi dostupni, arhivirani sojevi koji su izdvojeni iz pasa, a dio su zbirke Laboratorija za leptospire, Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, Veterinarskog fakulteta i svi novi izolati koji su, u procesu istraživanja, prikupljeni tijekom rutinske obrade pacijenata na Klinici za zarazne bolesti, pripadajućeg Zavoda. Svi prikupljeni izolati izdvojeni su iz pasa s područja Republike Hrvatske.

4.2. Uzgoj leptospira i određivanje serološke skupine

4.2.1. Izdvajanje i uzgoj leptospira

Odabrani klinički materijal (krv ili urin), uzorkovan prilikom rutinske obrade pacijenta, naciepljen je na hranidbenu podlogu po Korthofu te je inkubiran na temperaturi od 28-30 °C. Pri izdvajanju leptospira iz urina prvotno su učinjena dodatna razrijeđenja kako bi povećali uspješnost izdvajanja. Dodatkom fluorouracila spriječena je kontaminacija ostalim bakterijama iz urina. Kulture su pregledavane dva puta tjedno prvih 2-3 tjedna, potom jednom tjedno u ukupnom trajanju od četiri mjeseca. U slučaju porasta leptospira, izolati su precjepljivani svakih sedam dana dok nije postignut stabilan rast kulture i gustoća od $2-4 \times 10^8$ bakterija u mililitru prikladna za izvođenje daljnjih seroloških i molekularnih metoda.

Tekuća hranidbena podloga po Korthof-u

Sastav:	pepton	0,8 g
	NaCl	1,4 g
	NaHCO ₃	0,02 g
	KCl	0,04 g
	CaCl ₂	0,04 g
	KH ₂ PO ₄	0,18 g

Sastojci su otopljeni navedenim redoslijedom u 1 l destilirane vode i autoklavirani na 120 °C u trajanju od 1h. Dobivenu otopinu smo potom ohladili na sobnu temperaturu i dodali inaktivirani kunićji serum do konačne koncentracije od 10%. Kunićji serum je prethodno inaktiviran na temperaturi od 56 °C u trajanju od 30 minuta. pH hranidbene podloge je prilagođen na 7,4 a otopina je potom filtrirana kroz Seitz-ov filter, veličine pora 0,22 µm. U mikrobiološkoj biozaštitnoj komori profiltrirana hranidbena podloga je razdijeljena po 5 ml u staklene epruvete s čepom. Odmah nakon pripreme provedena je provjera sterilnosti hranidbenih podloga inkubacijom na temperaturama od 28 °C i 30 °C. Do upotrebe, hranidbene podloge pohranjene su u hladnjak na 4 °C.

Gustoća bakterijskih kultura određena je brojanjem bakterija u Petroff-Hauser komorici na sljedeći način: jednu kap bakterijske kulture razrijedilo se s fiziološkom otopinom u omjeru 1:10 prenijelo u komoricu te prekrilo pokrovnim stakalcem. Pod mikroskopom s tamnim vidnim poljem prebrojane su bakterije i dobivene vrijednosti uvrštene su u formulu:

$$N = \frac{n \times 2,0 \times 10^8 \times 10}{10 \times 16}$$

N = broj bakterija u ml

n = broj bakterija izbrojenih u komorici

$2,0 \times 10^8$ = gustoća kulture leptospira od ++++

10 u brojniku = razrjeđenje bakterija

10 u nazivniku = velika polja u komorici

16 u nazivniku = mala polja u velikim poljima komorice

Dio molekularnih analiza provedeno je u Institutu Pasteur, Pariz koji za uzgoj i održavanje kultura leptospira koristi EMJH hranidbenu podlogu (BABUDIERI i sur., 1961.; ELLINGHAUSEN i McCULLOUGH, 1965.; JOHNOSN i HARRIS, 1967.). Stoga su se po zaprimanju u Institut kulture leptospira morale precijepiti i prilagoditi na novu hranidbenu podlogu.

EMJH hranidbena podloga

Sastav dehidrirane krute baze (*Difco* Laboratories, Becton, Dickinson and Company, Michigan, SAD):

Na₂HPO₄ 1 g

KH₂PO₄ 0,3 g

NaCl 1 g

NH₄Cl 0,25 g

Tiamin 0,005 g

2,3 g baze otopljeno je u 900 ml destilirane vode te je dodano 100 ml albuminskog dodatka (goveđi serumski albumin, cinkov sulfat, magnezijev klorid, kalcijev klorid, glicerol, Tween 80, vitamin B12, natrijev piruvat, željezov sulfat). Pripremljena otopina je autoklavirana, te joj je pH prilagođen na 7,4. Otopina je zatim filtrirana kroz filter membranu pora veličine 0,22 µm i razdijeljena po 5 ml u staklene epruvete s čepom.

4.2.2. Određivanje serološke skupine

Pripadnost istraživanih izolata odgovarajućim serološkim skupinama određena je koristeći panel od 14 referentnih hiperimunih seruma proizvedenih na kunićima (Tablica 3.).

Materijal, pribor, oprema i reagensi:

- 20 izolata leptospira izdvojenih iz pasa
- 14 hiperimunih seruma proizvedenih na kunićima (OIE Reference Laboratory for Leptospirosis, AMC, Nizozemska)

- Višekanalna mikropipeta (Thermo Scientific)
- Jednokanalne mikropipete i pripadajući im nastavci (Eppendorf)
- Mikrotitracijska plitica s V dnom (Kartell, Noviglio, Italija)
- Mikroskop s tamnim vidnim poljem (Olympus BX53)
- Fosfatni pufer (PBS), 1X

U sve jažice mikrotitracijske plitice, koja je položena vodoravno, najprije je stavljen PBS. U jažice drugog stupca dodano je još 50 µl PBS-a i 4,2 µl odgovarajućeg hiperimunog seruma. Višekanalnom pipetom uz miješanje prebacivano je po 50 µl otopine u svaki idući stupac sve do posljednjeg stupca iz kojeg je preostalih 50 µl uklonjeno. Na ovaj način pripremljena su serijska dvostruka razrijeđenja hiperimunih seruma s fosfatnim puferom. Nadalje, u svaku pojedinu jažicu dodano je 50 µl ispitivane kulture leptospira. Na ovaj način dobivena su razrijeđenja od 1:50 do 1:25600. Plitice su inkubirane dva sata na 28-30 °C, a rezultat pretrage je očitao koristeći mikroskop s tamnim vidnim poljem. Najviši titar određen je najvećim razrijeđenjem u kojem je najmanje 50 % leptospira aglutinirano. Pripadnost pretraživanog izolata pojedinoj serološkoj skupini određena je prema hiperimunom serumu s kojim je izolat aglutinirao u najvećem titru.

Tablica 3. Hiperimuni serumi referentnih sojeva leptospira korišteni za određivanje serološke skupine izolata leptospira iz pasa

Rb.	Serološka skupina	Serovar	Soj
1	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
2	Sejroe	Sejroe	M 84
3	Australis	Australis	Ballico
4	Pomona	Pomona	Pomona
5	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
6	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
7	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin
8	Sejroe	Saxkoebing	Mus 24
9	Ballum	Ballum	Mus 127
10	Bataviae	Bataviae	Swart
11	Javanica	Poi	Poi
12	Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
13	Autumnalis	Rachmati	Rachmat
14	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis

4.3. Izdvajanje DNK

Materijal, pribor i oprema

- 20 izolata leptospira iz pasa
- Mikropipete i pripadajući nastavci (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Eppendorf epruvete od 1,5 ml
- Komercijalni kit za izdvajanje DNK (NucleoSpin Tissue, Macherey Nagel, Düren, Njemačka)
- Reagensi i puferne otopine: proteinaza K, T1, B3, BW, B5, BE, 96% etilni alkohol
- Mikrocentrifuga Mini spin plus (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Laboratorijska tresilica REAX (Heidolph, Schwabach, Njemačka)
- Termo-miješalica ThermoMixer (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

Po 1,5 ml pojedine kulture leptospira odvojeno je u Eppendorf epruvete te centrifugirano na 14500 okretaja/min. u trajanju od 15 minuta. Nakon što se odbacio supernatant, talogu je dodano 25 µl proteinaze K i nekoliko puta je promiješan mikropipetom, ispuštajući i uvlačeći istu tekućinu. U istu epruvetu dodano je 180 µl pufera T1. Sadržaj je promiješan stavljanjem epruvete u laboratorijsku miješalicu na 15 sekundi. Tako pripremljene otopine inkubirane su na 56 °C u termo-miješalici tijekom noći. Idući dan epruvete su centrifugirane na 1000 okretaja/min. 1 minutu kako bi se spustile kapljice tekućine sa stijenki i čepa epruveta. Potom je slijedilo dodavanje 200 µl B3 pufera, inkubiranje u termo-miješalici na 70 °C kroz 10 minuta te stavljanje epruveta u laboratorijsku tresilicu na nekoliko sekundi. Dodano je 210 µl 96% etilnog alkohola i ponovljen je postupak trešnje na laboratorijskoj tresilici i centrifugiranje. Dobivena otopina odpipetirana je u epruvetu s membranom, koja je prethodno umetnuta u sakupljačku epruvetu. Nakon centrifugiranja u trajanju od 1 minute na 11000 okretaja/min. epruvete s membranom su prebačene u nove sakupljačke epruvete, te je nakon toga u njih dodano 500 µl pufera BW. Nakon centrifugiranja na 11000 okretaja/min u trajanju od 1 minute, ponovljen je postupak odbacivanja stare i stavljanja nove sakupljačke epruvete, te je u epruvete s membranom dodano 600 µl pufera B5. Nakon centrifugiranja u trajanju na 11000 okretaja/min, u trajanju od 1 minute, epruvete sa membranom su prebačene u sterilnu Eppendorf epruvetu od 1,5 ml. Tada je dodano u njih 200 µl pufera BE, te su se inkubirale 1 minutu na sobnoj temperaturi te potom 1 minutu na 11000 okretaja/min. Eppendorf epruveta u kojoj se nalazila izdvojena DNK, pohranjena je na -20 °C do daljnje uporabe.

4.4. Molekularne analize

4.4.1. Lančana reakcija polimerazom (konvencionalna PCR metoda)

Materijal

- 20 DNK uzoraka izdvojenih iz izolata leptospira

Pribor i oprema

- Mikropipete i pripadajući im nastavci (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Erlenmayerova tikvica od 300 ml
- Eppendorf epruvete od 2 ml
- Epruvete za PCR reakciju od 0,2 ml
- Mikrovalna pećnica
- Analitička vaga (Adventurer Pro Ohaus, New Jersey, SAD)
- Mikrocentrifuga Mini Spin Plus (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- PCR uređaj (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Kalifornija, SAD)
- Mikrobiološka biozaštitna komora (Iskra Pio LFVP12, Šentjernej, Slovenija)
- Izvor el. stuje, kalup, kadica i češljici za elektroforezu (Power Pac, Bio-Rad Laboratories, Kalifornija, SAD)
- Komora za fotografiranje gelova s UV svjetlom (Gel Doc, Bio-Rad Laboratories, Kalifornija, SAD)

Reagensi

- EmeraldAmp MAX HS Master Mix, koji sadrži Hot Start PCR Taq polimerazu, mješavinu dNTP otopina, zelenu boju koja omogućuje direktnu gel elektroforezu i optimizirani pufer za provođenje PCR reakcije (Takara, Saint-Germain-en-Laye, Francuska)
- Agaroz (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka)
- Molekularni biljeg (100bp DNA Ladder, Invitrogen, Life Technologies, New York, SAD)
- Boja za DNK u agaroznom gelu Diamond TM (Promega Corporation, Wisconsin, SAD)
- TAE pufer 50x:
 - Tris baza (242 g)
 - Ledena octena kiselina (57,1 g)
 - EDTA (100 ml)
 - destilirana H₂O dodana do volumena od 1 l
- Odgovarajuće početnice sintetizirane i dostavljene od strane Invitrogen, Amsterdam,

4.4.2. Određivanje genomske vrste odabranih izolata leptospira iz pasa

Nakon izdvajanja DNK, pripadnost izolata određenoj genomskoj vrsti odredila se umnažanjem željenog odsječka *secY* gena PCR metodom, koristeći početnice SecY II (5'-GAATTTCTCTTTTGATCTTCG-3') i SecY IV (5'-GAGTTAGAGCTCAAATCTAAG-3'). Navedene početnice umnažaju 624 do 650 bp *SecY* gena. Genomska vrsta utvrđena je pomoću računalnih alata BioEdit, Chromas Lite i ClustalW kojima se uređuju sekvenciranjem dobiveni nukleotidni slijedovi nakon kojih slijede filogenetske analize istih u programu MEGA 11.

4.4.2.1. Umnažanje odsječka *secY* gena

Protokol reakcije

Za svaki uzorak pripremljena je sljedeća PCR smjesa

Ultračista voda za PCR	9,5 µl
Početnica SecY II F (10µm)	0,5 µl
Početnica SecY IV R (10µm)	0,5 µl
Emerald PCR smjesa, 2x	9,5 µl

U epruvetice volumena 0,2 ml dodano je po 22,5 µl PCR smjese i 2,5 µl DNK leptospira. Za negativnu kontrolu umjesto DNK, stavljeno 2,5 µl PCR vode. Tako pripremljeni uzorci inkubirani su prema programu temperaturnih izmjena u PCR uređaju T100 Thermal Cycler.

Program temperaturnih izmjena u PCR uređaju:

95 °C -----	10 min	
94 °C -----	1 min	} 34 x
54 °C -----	30 sec	
72 °C -----	1 min	
72 °C -----	10 min	
4 °C -----	∞	

4.4.2.1.1. Elektroforeza u gelu

Elektroforezom u gelu provjerena je uspješnost umnažanja odsječka *secY* gena veličine 624 do 650 bp za svaki izolat. Odvagano je 1,5 g agaroze koja je prebačena u Erlenmayerovu tikvicu te je dodano 100 ml TAE, 1X pufera. Agaroz je otopljen zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici. Tikvica s otopljenom agarozom ohlađena je na sobnoj temperaturi. Ohlađenoj, ali još uvijek tekućoj agarози dodano je 3 µl boje za DNK u agaroznom gelu (Diamond™). Tada je agaroz izlivena u kalup za gel te su umetnuti češljići. Nakon polimerizacije gela, izvađen je češljić, te je gel stavljen u kadicu za elektroforezu ispunjenu TAE puferom. Po 4 µl PCR

proizvoda stavljeno je u jažicu. U jednu jažicu dodano je 4 µl molekularnog biljega, veličine 100 bp. Kadica je zatim spojena na električnu struju napona 100 V i jakosti 80 mA kroz 40 min. Nakon završetka elektroforeze gel je stavljen u komoru s UV svjetlom gdje je njegova fotografija pohranjena u elektroničkom obliku.

Dobiveni i provjereni PCR proizvodi poslani su u Macrogen, Amsterdam, Nizozemska na sekvenciranje. Obrada nukleotidnih sljedova detaljno je pojašnjena u poglavlju 4.5.

4.4.3. Genska tipizacija na osnovu multilokusnih sekvenci

Koristeći metodu tipiziranja na osnovu multilokusnih sekvenci (AHMED i sur., 2004.). umnoženo je po šest odsječaka određenih gena za svaki izolat, koji uključuje analizu četiri evolucijski dobro očuvana održavateljska gena (*adk*, *icdA*, *rrs2*, *secY*) i dva gena koji sadrže varijabilne dijelove, a kodiraju proteine vanjske ovojnice (*lipL32*, *lipL41*). Za svaki izolat PCR-om su umnoženi odsječci gena koristeći specifične početnice (Tablica 4.) . Svi dobiveni PCR proizvodi provjereni su elektroforezom u gelu, nakon čega su sekvencirani. Dobiveni nukleotidni sljedovi, obrađeni su pomoću računalnog programa MEGA 11, uspoređeni su međusobno, zatim s nukleotidnim sljedovima referentnih sojeva leptospira iz banke gena (NCBI-GenBank), a onda i s nukleotidnim sljedovima izolata leptospira izdvojenih u ranijim istraživanjima na području Republike Hrvatske (Habuš, 2014.)

Tablica 4. MLST ciljni geni

Naziv gena	Funkcija gena	Nukleotidni slijedovi početnica	Veličina umnoženog PCR proizvoda (bp)
adk	adenilat kinaza	F-GGGCTGGAAAAGGTACACAA R-ACGCAAGCTCCTTTTGAATC	531
icdA	izocitrat dehidrogenaza	F-GGGACGAGATGACCAGGAT R-TTTTTTGAGATCCGCAGCTTT	674
lipL32	lipoprotein vanjske membrane lipL32	F-ATCTCCGTTGCACTCTTTGC R-ACCATCATCATCATCGTCCA	474
lipL41	lipoprotein vanjske membrane lipL41	F-TAGGAAATTGCGCAGCTACA R-GCATCGAGAGGAATTAACATCA	518
rrs2	16S ribosomalna RNK	F-CATGCAAGTCAAGCGGAGTA R-AGTTGAGCCCCGCAGTTTTC	452
secY	preproteinska translokaza secY	F-ATGCCGATCATTTTTGCTTC R-CCGTCCCTTAATTTTAGACTTCTTC	549

4.4.3.1. Umnažnje *adk*, *icdA*, *lipL 32*, *lipL 41*, *rrs2* i *secY* gena

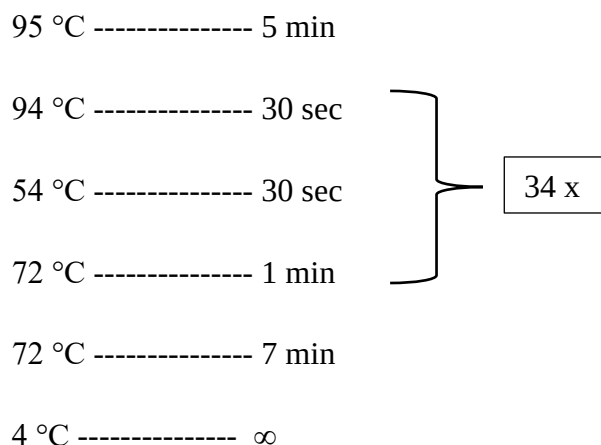
Protokol za umnažanje dijelova *aadk*, *icdA*, *lipL 32*, *lipL 41*, *rrs2* i *secY* gena

Za svaki uzorak pripremljena je sljedeća PCR smjesa:

Ultračista voda za PCR	10,75 µl
Uzvodna početnica (10µm)	0,5 µl
Nizvodna početnica (10µm)	0,5 µl
Emerald PCR smjesa, 2x	12 µl

U epruvetice volumena 0,2 ml dodano je po 23,75 µl PCR smjese i 1,25 µl DNK izolata. Za negativnu kontrolu umjesto DNK stavljeno je 1,25 µl PCR vode. Tako pripremljeni uzorci inkubirani su u PCR uređaju T100 Thermal Cycler, BioRad prema određenom protokolu temperaturnih izmjena.

Program temperaturnih izmjena u PCR uređaju:



Svi dobiveni PCR proizvodi su nakon umnažanja provjereni elektroforezom u gelu. Postupak je prethodno objašnjen u poglavlju 4.4.2.1.1. Dobiveni i provjereni PCR proizvodi poslani su u Macrogen, Amsterdam, Nizozemska na sekvenciranje. Obrada nukleotidnih sljedova detaljno je pojašnjena u poglavlju 4.5.

4.4.4. Sekvenciranje ključnih regija genoma (cgMLST)

Sekvenciranje ključnih regija genoma (cgMLST) odrađeno je u Institutu Pasteur, Pariz, Francuska. Nakon zaprimanja kultura iste su se precijepile na EMJH hranidbenu podlogu. Postupak uzgoja leptospira na hranidbenim podlogama i određivanje gustoće detaljno je opisano u poglavlju 4.2.1.

4.4.4.1. Izdvajanje i pročišćavanje DNK pomoću MagNA Pure 96 uređaja

Materijal

- 20 odabranih kultura izolata leptospira

Pribor i oprema

- MagNa Pure 96 uređaj (Roche, Bazel, Švicarska)
- Komercijalni kit za izdvajanje DNK (MagNa Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit) (Roche, Bazel, Švicarska)
- Mikrotitracijska plitica sa 96 polja (Roche, Bazel, Švicarska)
- Uređaj za određivanje broja stanica (Countess, Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)
- Fosfatni pufer (PBS)
- Mikrocentrifuga (Eppendorf, Model 5420, Hamburg, Njemačka)

- Mikropipete i pripadajući nastavci (Eppendorf)
- Eppendorf epruvete volumena 2 ml
- Ladice sa reagensima (Roche, Bazel, Švicarska)

Reagensi

- Ladica 1: puferi za ispiranje, puferi za lizu/povezivanje stanica
- Ladica 2: proteinaza K, elucijski pufer, pufer za ispiranje
- Magnetske staklene čestice

Kulture su prebačene u Eppendorf epruvete od 2 ml te centrifugirane na 300 okretaja/min u trajanju od 5 minuta. Supernatant je odbačen, a talogu je dodano 200 μ l ohlađenog PBS-a i ponovno je centrifugirano na 300 okretaja/min u trajanju 5 minuta. Izolati su pohranjeni na temperaturu -15 do -20 °C ukoliko izdavanje DNK nije odmah provedeno. Nakon otapanja izolata na sobnoj temperaturi ponovljen je postupak centrifugiranja, odbacivanja nadtaloga, dodavanja 200 μ l PBS-a. Nakon dodavanja PBS-a otopina je promiješana koristeći pipetu, uvlačeći i ispuštajući sadržaj. Provjerena je gustoća bakterija, kako ne bi bila veća od 1×10^6 stanica/200 μ l, što je optimalna gustoća za izdavanje DNK. 20 μ l otopine stavljeno je u uređaj za određivanje broja stanica. Dobivena koncentracija izražena je mjernom jedinicom broj stanica/ml. Ta vrijednost preračunata je u broj stanica/200 μ l. Ukoliko je broj stanica bio odgovarajući, po 200 μ l otopine svakog izolata stavljeno je u jažice mikrotitracijske plitice. Reagensi i mikrotitracijska plitica stavljeni su u uređaj, te je odabran program za izdavanje DNK iz bakterijskih kultura. Program uključuje: lizu stanica kako bi se oslobodila DNK, povezivanje DNK s magnetskim staklenim česticama pomoću odgovarajućeg pufera, ispiranje DNK uporabom elucijskog pufera. Plitica sa izvojenim DNK pohranjena je na -20 °C do sljedeće upotrebe.

4.4.4.2. Obrada izdvojene DNK i priprema za sekvenciranje ključnih regija genoma

Materijal

- 20 uzoraka izdvojene DNK

Pribor i oprema

- Komercijalni kit za sekvenciranje koji uključuje: TM pufer za označavanje DNK, mješavina regaensa za označavanje DNK (ATM), neutralizirajuće pufere (NT), pufere za razrjeđenje DNK (RSB), PCR mješavinu i adaptere za označavanje različitih uzoraka sa specifičnim barkodom (Nextera XT DNA Library Preparation Kit, Illumina Inc., San Diego, SAD)
- PCR uređaj (AerisTM, ESCO Life Sciences Group, Guangzhou, Kina)
- Mikrocentrifuga za mikrotitracijske plitice (model 5430, Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Laboratorijska mješalica (FisherbrandTM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)
- Eppendorf mikropipete i pripadajući im nastavci
- Eppendorf epruvete volumena 2ml
- Spektrofotometar (Nano Drop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)

Čistoća i koncentracija DNK u uzorcima provjerena je pomoću spektrofotometra. Omjeri čistoće odnose se na omjere absorpcije DNK i absorpciju proteina i organskih tvari korištenih u izdvajanju DNK, odnosno kontaminaciju istih. Vrijednost čistoće 2,00, bila je adekvatna za daljnju analizu. Koncentracija DNK od 1ng/μl dovoljna je za pripremu uzorka za sekvenciranje.

U Eppendorf epruveti od 2ml pripremljena je otopina za označavanje koja sadrži 10μl TM pufera, 5μl ATM-a i 5μl izdvojene DNK. Sadržaj je promiješan pipetom, te stavljen na 10 sekundi u laboratorijsku mješalicu kako bi se sa stijenke epruvete spustio sav sadržaj. Epruvete su inkubirane na 55 °C u trajanju 5 minuta. Neposredno nakon inkubacije je u epruvetu dodano 5μl NT pufera i otopina je promiješana pipetom te je inkubirana na sobnoj temperaturi kroz 5 minuta. Potom je u novoj epruveti pripremljena PCR smjesa koja je sadržavala 15μl komercijalne PCR smjese, po 5 μl svakog adaptera za označavanje i 20 μl otopine iz prethodno opisane reakcije. Dobivena reakcijska smjesa je promiješana pipetom te je bila spremna za stavljanje u PCR uređaj.

Program temperaturnih izmjena u PCR uređaju:

72 °C -----	3 min	
95 °C -----	30 sec	
95 °C -----	10 sec	} 12 x
55 °C -----	30 sec	
72 °C -----	30 sec	
72 °C -----	30 sec	
72 °C -----	5 min	
10 °C -----	∞	

Dobiveni PCR proizvodi spremni su za sekvenciranje na Illumina platformi.

4.4.4.3. Sekvenciranje ključnih regija genoma na Illumina platformi i obrada dobivenih nukleotidnih slijedova

Materijal

- 20 prethodno pripremljenih PCR produkata
- Ključne regije genoma odabrane su na temelju uzorka koji se sastojao od 327 sojeva 42 odabrane genomske vrste leptospira (Slika 10.)

Oprema

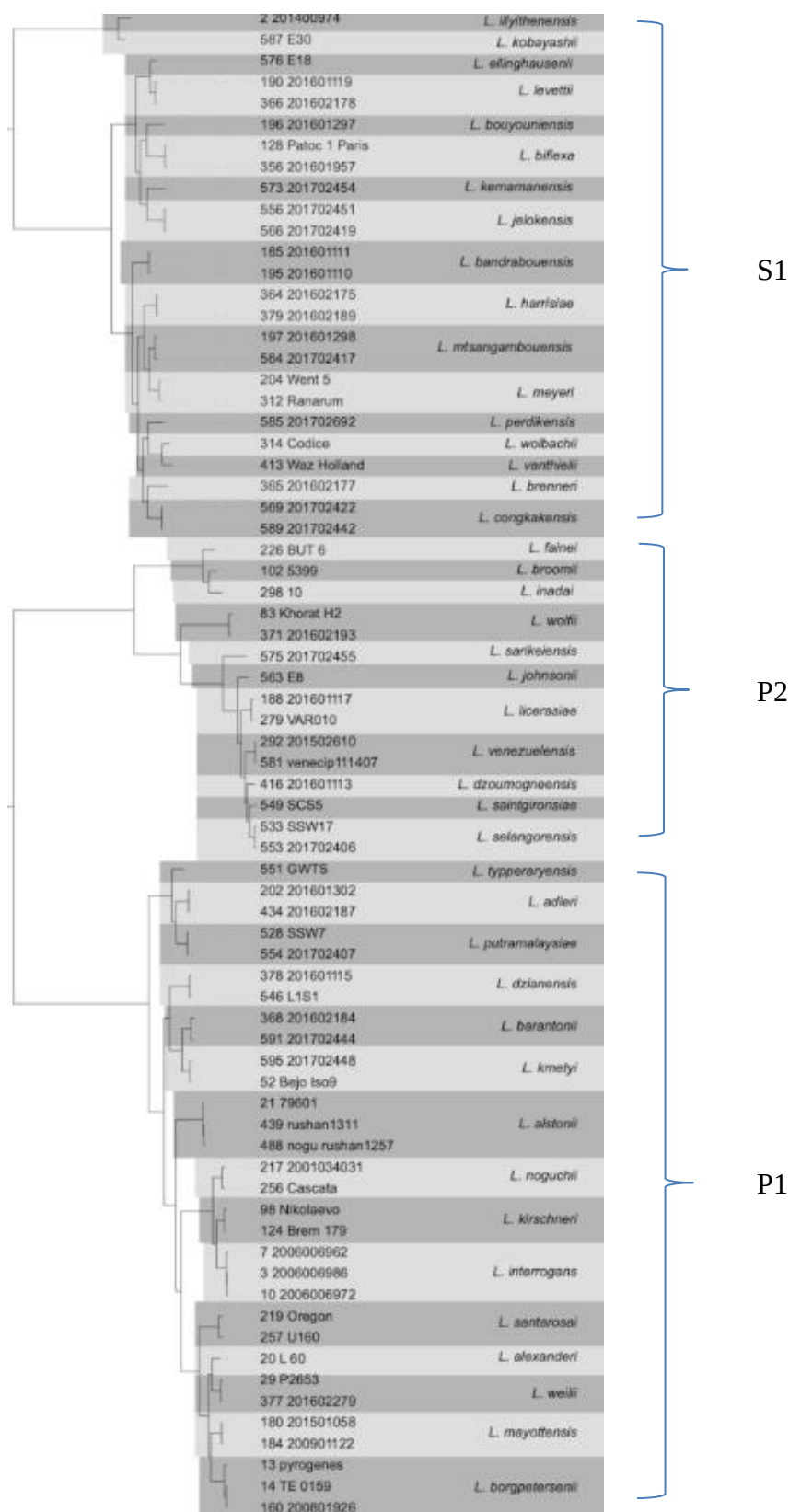
- Illumina NextSeq 500 uređaj (Illumina Inc., San Diego, SAD)

Računalni program

- Računalni model GLC Workbench Genomics 9 (Qiagen, Hilden, Njemačka)

Koristeći Illumina platformu iz svakog istraživaniog soja ekstrahirano je 545 gena, koji su potom ulančani i analizirani. Dobivene klonalne grupe (engl. *Clonal group*, CG) temelje se na jednostrukom povezivanju cgMLST alelnih profila s pragom od 40 alelnih razlika. Tip sekvence (engl. *Core Genome Sequence Type*, cgST) je određen kao jedinstvena identifikacija soja leptospira temeljen na alelnim profilima ključnih regija genoma. Dobiveni podatci su unešeni u BIGSdb bazu podataka (Institut Pasteur). BIGSdb baza podataka, je platforma dizajnirana za upravljanje i analizu bakterijskih genoma i može pohraniti i organizirati cjelokupne sekvence genoma zajedno s pridruženim podacima za različite bakterijske izolate.

Održava sveobuhvatne baze podataka alela i tipova sekvenci, podržavajući i konvencionalne MLST i cgMLST sheme. Dodatno, nudi niz bioinformatičkih alata za automatsku analizu sekvenci, uključujući sastavljanje sekvenci i određivanje alela. Olakšava komparativnu genomiku, omogućujući identificiranje genetskih razlika i sličnosti između izolata. Daljnja obrada dobivenih nukleotidnih sljedova detaljno je pojašnjena u poglavlju 4.5.



Slika 10. Filogenetsko stablo 42 genomske vrste *Leptospira* korištenih u cgMLST metodi prema analizi 545 gena, dobiveno koristeći IQ-TREE računalni program i algoritam maksimalne udaljenosti. Vrste su podijeljene u 3 podgrupe.

(Izvor: GUGLIEMINI i sur.,2029.)

4.5. Obrada podataka i usporedba molekularnih analiza

4.5.1. Obrada nukleotidnih sljedova dobivenih umnažanjem odsječaka *secY* gena

Dobiveni nukleotidni sljedovi su vizualizirani i inicijalno obrađeni koristeći programski alat Chromas Pro 2.6.2 (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Australija). Uporabom ovog programa nukleotidni sljedovi su skraćeni na 245 bp polimorfni sljedovi dostatni za filogenetsku analizu. Daljnja obrada, sravnjivanje i provjera kvalitete komplementarnih lanaca nukleotidnih sljedova izvršena je pomoću BioEdit 7.0 programa (Hall, 1999.). Nadalje je pomoću računalnog programa za molekularnu gensku analizu MEGA 11 (engl. *Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) (TAMURA i sur., 2021.) izvršeno sravnjivanje svih nukleotidnih sljedova izolata usporedbom s nukleotidnim sljedovima referentnih sojeva različitih genetskih vrsta leptospira preuzetih iz banke gena (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). Nakon toga su slijedile filogenetske analize. Filogenetsko stablo temeljilo se na proračunima izvorne udaljenosti Neighbour Joining algoritma. Evolucijska udaljenost procijenjena je „Tamura 3-parametar” modelom. Za procjenu vjernosti reprodukcije specifičnih svojstava filogenetskih stabala koristila se Bootstrap metoda sa 1000 poduzorkovanja.

4.5.2. Obrada nukleotidnih sljedova dobivenih sekvenciranjem na osnovi multilokusnih sekvenci

Kvaliteta komplementarnih nukleotidnih sljedova svakog uzorka provjerena je pomoću BioEdit 7.0 programa, te je dobivena zajednička tzv. *consensus* sekvenca. Za svaki izolat dobiveno je po šest nukleotidnih sljedova koji su spojeni u jedan, tzv. mega nukleotidni slijed (mega-lokus), redoslijedom *adk*, *icdA*, *lipL32*, *lipL41*, *rrs2*, *secY*. Pomoću računalnog programa MEGA 11 (TAMURA i sur., 2021.) izvršeno je sravnjivanje svih nukleotidnih slijedova izolata s referentnim sojevima različitih genetskih vrsta leptospira preuzetih iz banke gena (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). Uređeni nukleotidni slijed svakog izolata unesen je u bazu podataka koja je dostupna na mrežnoj stranici <https://pubmlst.org/organisms/leptospira-sppmlst.net> radi dobivanja tipa sekvence. Filogenetsko stablo temeljilo se na proračunima izvorne udaljenosti Neighbour Joining algoritma. Evolucijska udaljenost procijenjena je „Tamura – Nei + G” modelom. Za procjenu vjernosti reprodukcije specifičnih svojstava filogenetskih stabala koristila se Bootstrap metoda sa 1000 poduzorkovanja.

4.5.3. Obrada nukleotidnih sljedova dobivenih sekvenciranjem ključnih regija genoma

Dobiveni nukleotidni sljedovi cgMLST obrađeni su pomoću računalnog programa MAFFT v7. Filogenetska analiza odrađena je pomoću računalnih programa IQ-TREE v 2.2., MEGA 11, iTOL v6 (engl. Interactive Tree of Life) (LETUNIC i BORK, 2021.) te GrapeTree (ZHOU i sur., 2018.), a temeljeni su na proračunima izvorne udaljenosti Neighbour Joining algoritma uz uporabu Bootstrap metode procjene vjernosti reprodukcije specifičnih svojstava filogenetskog stabla od 1000 podudaranja.

Dobivenim sekvencama ključnih regija genoma ekstrahirane su 53 sekvence gena ribosomalnih proteinskih podjedinica (engl. Ribosomal protein subunit, rps), kao npr. rpsA, rpsB, rpsC, rpsD, rpsE, rpsF, rpsG, rpsH, rpsI, rpsJ, rplA, rplB, rplC, rplD, rplE i ostali. Ova analiza identificira točno podudaranje rMLST alela sekvenci pretraživanih izolata i izolata iz baze podataka. Njihovom usporedbom potvrdili smo pripadnost genomskoj vrsti.

Dobiveni podatci uspoređeni su međusobno, zatim s dobivenim podacima konvencionalnog MLST pristupa tipiziranja izolata, te s dostupnim nukleotidnim sljedovima referentnih sojeva leptospira kao i sojeva leptospira izdvojenih iz pasa pohranjenih u NCBI banci gena (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) i BIGsdb banci gena Instituta Pasteur (www.bigsdb.pasteur.fr/leptospira/).

4.6. Shema predviđanja kliničke slike i ishoda bolesti

Prikupljeni su podatci o kliničkim znakovima, laboratorijskim parametrima i ishodima liječenja iz zapisa ambulantnih protokola, Klinike za zarazne bolesti, Veterinarski fakultet Sveučilište u Zagrebu.

Prilikom prijema pacijenta uzeti su detaljni anamnestički podatci koji uključuju demografske podatke, podatke o kliničkim znakovima, trajanju bolesti, prethodnom liječenju te cjepnom statusu. Laboratorijskim i rendgenološkim nalazima je dodijeljena standardizacija prema određenim kriterijima. Pacijenti su kategorizirani prema broju zahvaćenih organskih sustava (0-4), uzimajući u obzir četiri najčešće zahvaćena organska sustava; jetru, bubrege, pluća i gastrointestinalni trakt. Anemija je prema postotku hematokrita (HCT) klasificirana kao blaga (30-40%), umjerena (20-30%) i teška (> 20%), prilikom čega su se uzele u obzir samo umjerene i teške anemije. Svako povišenje broja leukocita određeno je kao leukocitoza (0/1). Oštećenje jetre definirano je kao povišenje dva od četiri enzima (AST, ALT, GGT, AP). Ikterus, je određen povišenjem ukupnog bilirubina (TBIL) u serumu. Za potrebe ovog istraživanja uzeti

su u obzir samo stadiji III i IV zatajenja bubrega prema IRIS sustavu, temeljenom na koncentraciji kreatinina u serumu (IRIS, 2023.). Plućno zatajenje, odnosno LPHS definiran je kliničkim pregledom kao dispneja, abnormalni dišni šumovi i/ili rendgenološki izražen bronhoalveolarni crtež s krvarenjima po plućima. Definiran je broj dana hospitalizacije, broj dana od početka bolesti te ishod liječenja.

4.6.1. Statistička obrada podataka

Pomoću programskog paketa RStudio provela se statistička obrada podataka. Razlike u raspodjeli između skupina ispitanice su Fisherovim egzaktnim testom i χ^2 testom. Univarijabilna analiza provedena je koristeći Kaplan-Meier model za krivulju preživljavanja. Krivulje preživljavanja uspoređene su putem Log-Rank testa. Kategorijske i binarne varijable su uvedene u analizu u originalnom obliku, dok su kontinuirane varijable bilo prvo preoblikovane u binarne varijable na temelju medijalne vrijednosti. Pored toga, univarijabilna analiza je bila dodatno provedena putem Cox-ovog modela s proporcionalnim relativnim rizikom, gdje je statistička značajnost bila određena putem Likelihood- ratio test-a, dok je 95%-tni interval pouzdanosti bio temeljen na Wald testu. Razina od $p < 0,05$ smatrala se statistički značajnom.

5. REZULTATI

5.1. Pretraživana populacija i određivanje serološke skupine

Za potrebe ovog istraživanja prikupljeno je ukupno 20 izolata od 18 različitih pasa. Kod dvije životinje uspješno su prikupljeni izolati iz krvi i urina.

Pripadnost izolata određenoj serološkoj skupini određena je pomoću mikroskopske aglutinacije i panela od 14 hiperimunih seruma. U panelu svaka serološka skupina predstavljena je jednim serovarom, osim serološke skupine Sejroe koja je predstavljena sa tri serovara: Sejroe, Saxkoebing i Hardjoprajitno. Izolat je svrstan u onu serološku skupinu s čijim je predstavnikom reagirao u najvišem titru. Tako je sedam izolata svrstano u serološku skupinu Pomona, a preostalih 13 u serološku skupinu Icterohaemorrhagiae (Tablica 5.).

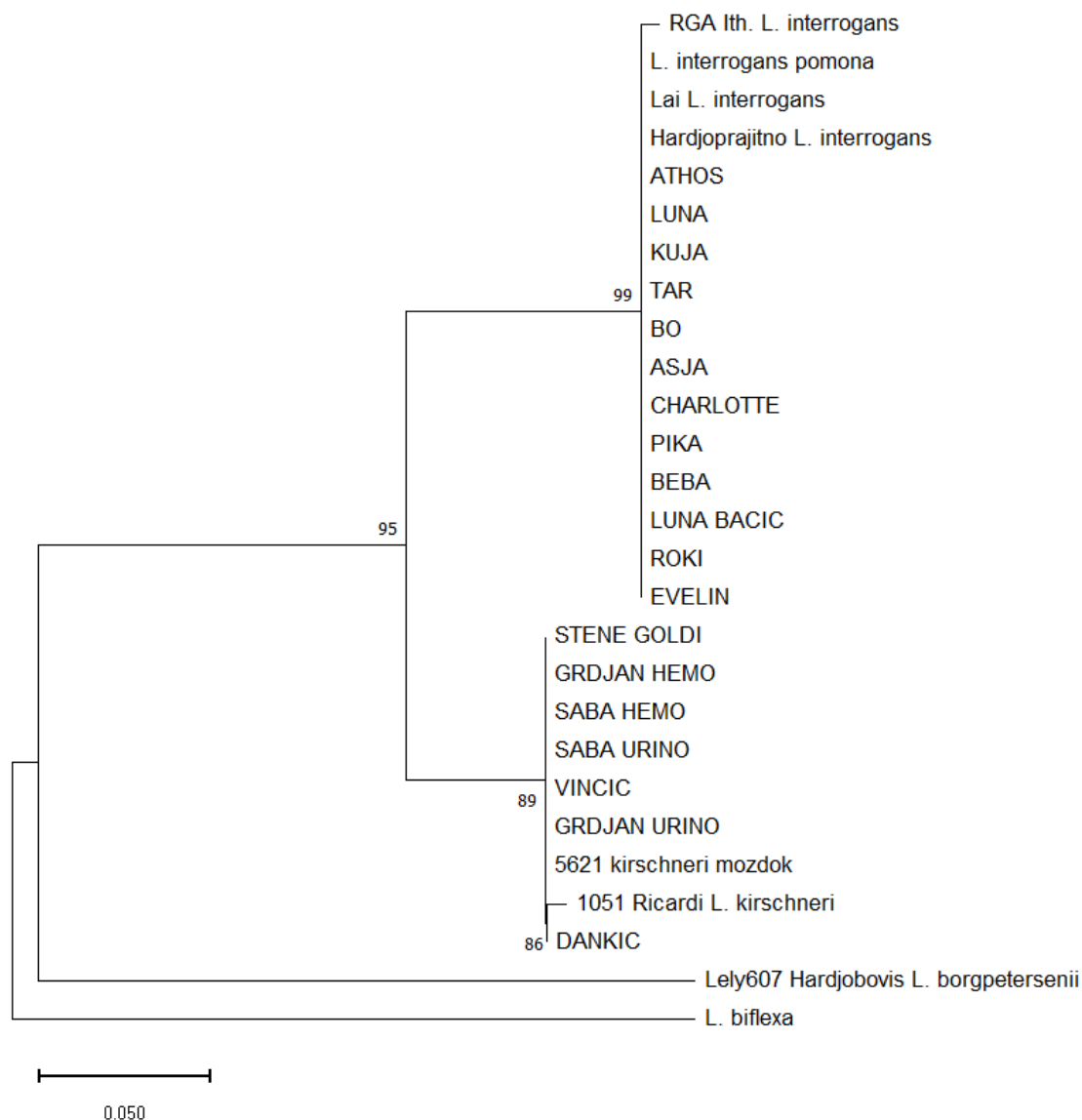
Tablica 5. Rezultati mikroskopske aglutinacije za određivanje seroloških skupina izolata hiperimunim serumom s najvišim titrom protutijela

Rb.	Izolat	Hiperimuni kunićji serum			Titar protutijela
		Serološka skupina	Serovar	Soj	
1	Pika	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	25600
2	Athos	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	6400
3	Štene Goldi	Pomona	Pomona	Pomona	12800
4	Evelin	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	3200
5	Grdjan Hemo	Pomona	Pomona	Pomona	6400
6	Grdjan Urino	Pomona	Pomona	Pomona	3200
7	Saba Hemo	Pomona	Pomona	Pomona	25600
8	Saba Urino	Pomona	Pomona	Pomona	6400
9	Luna Bačić	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	3200
10	Luna	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	6400
11	Roki	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	6400

12	Vinčić	Pomona	Pomona	Pomona	12800
13	Beba	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	6400
14	Charlotte	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	6400
15	Dankić	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	12800
16	Asja	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	6400
17	Bo	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	12800
18	Tar	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	3200
19	Kuja	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	3200
20	Bak	Pomona	Pomona	Pomona	6400

5.2. Određivanje genomske vrste umnažanjem i filogenetskom analizom *secY* gena

Lančanom reakcijom polimerazom koristeći početnice *SecY* II i *SecY* IV umnoženo je između 624 i 650 bp *secY* gena pretraženih izolata. Za filogenetsku analizu bio je potreban samo dio dobivenog nukleotidnog slijeda pa je, koristeći Chromas Pro 2.6.2 računalni program, sekvenca skraćena na način da je uklonjeno prvih 170 bp i posljednjih 200 do 235 bp. Daljnja obrada i filogenetska analiza provedena je na dobivenim nukleotidnim sljedovima od 245 bp i njihovom usporedbom s referentnim sojevima tri patogene genomske vrste koje su dokazano prisutne na području Republike Hrvatske (*L. interrogans*, *L. kirshneri* i *L. borgpetersenii*). *L. biflexa* je uzeta kao vanjska skupina. Stupanj različitosti genomskih vrsta prikazan je filogenetskim stablom temeljenim na proračunima izvorne udaljenosti Neighbour Joining algoritma. Evolucijska udaljenost procijenjena je „Tamura 3 parametar” modelom (Slika 11.). Dobiveni podatci ukazuju da 12 izolata pripada genomskoj vrsti *L. interrogans* (Evelin, Athos, Luna, Kuja, Tar, Bo, Charlotte, Beba, Roki, Luna Bačić, Pika i Asja), dok preostalih osam pripada genomskoj vrsti *L. kirschneri* (Štene Goldi, Saba Hemo, Saba Urino, Grdjan Hemo, Grdjan urino, Vinčić, Dankić i Bak).



Slika 11. Filogenetsko stablo. Analiza odsječaka *secY* gena izolata pasa i referentnih sojeva.

Stablo je dobiveno koristeći Neighbour joining algoritam. Evolucijske udaljenosti izračunate su metodom “Tamura 3-parametra”. Varijacija stope među mjestima modelirana je gama distribucijom. Uključene pozicije kodona bile su 1. + 2. + 3. + nekodirajuće pozicije. Ova analiza obuhvatila je 24 nukleotidna slijeda s ukupno 1383 pozicija u konačnom skupu podataka. Skala na dnu označava evolucijsku udaljenost.

5.3. Tipiziranje na osnovi multilokusnih sekvenci

Uporabom lančane reakcije polimerazom i specifičnih početnica umnoženi su odsječci *adk*, *icdA*, *lipL 32*, *lipL 41*, *rrs2* i *secY* gena svakog pretraženog izolata. Za filogenetsku analizu bili su potrebni samo varijabilni dijelovi nukleotidnih sljedova, stoga su isti obrezani kakao bi se dobili samo polimorfni sljedovi (Tablica 6.).

Tablica 6. Popis ciljnih gena s veličinom umnoženog proizvoda i polimorfnih sljedova gena unutar 6L MLST sheme

Naziv	Funkcija	Veličina umnoženog proizvoda (bp)	Polimorfni sljedovi (bp)
<i>adk</i>	adenilat kinaza	531	420
<i>icdA</i>	izocitrat dehidrogenaza	674	550
<i>lipL 32</i>	lipoprotein vanjske membrane <i>lipL 32</i>	474	450
<i>lipL 41</i>	lipoprotein vanjske membrane <i>lipL 41</i>	518	490
<i>rrs2</i>	16S ribosomalna RNK	452	450
<i>secY</i>	preproteinska translokaza <i>secY</i>	549	501

U 20 pretraženih izolata najmanje promjena uočeno je unutar *rrs2* gena sa jednim varijabilnim mjestom od 450 baza (0,22%) i *lipL32* gena s tri varijabilna mjesta od 450 baza (0,66%). Veća promjenjivost uočena je za *icdA* i *lipL41* gena s 22 varijabilna mjesta od 550 (4%) i 490 (4,5%). Najveća promjenjivost uočena je za *adk* i *secY* gene kod kojih je udio varijabilnih mjesta iznosio 44 od 420 baza (10,5%) i 46 od 501 baze (9,2%).

5.3.1. Obrada dobivenih MLST nukleotidnih sljedova

Ukupno je sekvencirano 120 genskih odsječaka. Dobiveni nukleotidni sljedovi svakog izolata spojeni su u jedan, tzv. mega nukleotidni slijed, koji se sastojao se od 2861 bp.

Unosom alelnih profila u PubMLST bazu podataka (<https://pubmlst.org/organisms/leptospira-spp>) dobiveni su tipovi sekvence. Unutar izolata determiniranih kao genomsku vrstu *L. interrogans* definiran je jedan tip sekvence (ST=2), dok su za genomsku vrstu *L. kirschneri* definirana dva različita tipa sekvence. (ST=98, ST=198).

Za dva od tri dobivena profila u bazi podataka postoji barem jedan odgovarajući izolat s istim tipom sekvence. Za tip sekvence ST=2 sveukupno u bazi postoji 159 izolata determiniranih kao *L. interrogans*, serološka skupina Icterohaemorrhagiae, serovar Copenhageni ili Icterhaemorrhagiae. Za tip sekvence ST=98, u bazi podataka postoji 13 izolata determiniranih kao *L. kirschneri*, serološka skupina Pomona, serovar Mozdok ili Tsaratsovo. Jednom od pretraživanih izolata (Dankić“) dodijeljen je jedinstveni tip sekvence ST=198, kojeg trenutno u bazi predstavlja samo naš izolat.

Stupanj podudarnosti između mega nukleotidnih slijedova pojedinih izolata prikazan je tzv. matricom identičnosti (engl. *Sequence Identity Matrix*). Matricom identičnosti nije utvrđena 100%-tna podudarnost svih pretraživanih izolata koji pripadaju istoj genomskoj vrsti te istom serovaru. Podudarnosti između *L. interrogans* i *L. kirschneri* bile su u rasponu od 86,8 do 95% (Tablica 7.). Najniže zabilježene podudarnosti od 90,7 % uočene su unutar vrste *L. kirschneri*. Izračunom matrice identičnosti, koja je uključivala po jedan izolat za svaki serovar obuhvaćen određenim tipom sekvence te pripadajući referentni soj, nije utvrđena 100%-tna podudarnost niti za jedan od tri odabrana para (Tablica 8.). Najviša podudarnost od 96,5% zabilježena je između izolata i referentnih sojeva serovara Mozdok i Copenhageni, a najniža od 88,8% između izolata i referentnih sojeva serovara Icterohaemorrhagiae. Referentni sojevi serovara Icterohaemorrhagiae i Copenhageni imali su podudarnost od 99,9%.

Tablica 7. Matrica identičnosti pretraživanih izolata.

Crvena boja- *L. kirschneri*, **Plava boja** – *L. interrogans*. **Zelena boja** – podudarnost između dvije genomske vrste.

	STENE G	SABA U	SABA H	GRDJAN U	GRDJAN H	VINCIC	DANKIC	ROKI	PIKA	LUNA	LUNA B	KUJA	EVELIN	CHARLOTTE	BO	BEBA	ATHOS	ASJA	TAR
STENE G	ID	0,911	1.000	0,911	0,911	1.000	0,994	0,868	0,952	0,868	0,868	0,952	0,95	0,952	0,952	0,952	0,868	0,952	0,952
SABA U	0,911	ID	0,911	1.000	1.000	0,911	0,907	0,95	0,868	0,95	0,95	0,868	0,867	0,868	0,868	0,868	0,95	0,868	0,868
SABA H	1.000	0,911	ID	0,911	0,911	1.000	0,994	0,868	0,952	0,868	0,868	0,952	0,95	0,952	0,952	0,952	0,868	0,952	0,952
GRDJAN U	0,911	1.000	0,911	ID	1.000	0,911	0,907	0,95	0,868	0,95	0,95	0,868	0,867	0,868	0,868	0,868	0,95	0,868	0,868
GRDJAN H	0,911	1.000	0,911	1.000	ID	0,911	0,907	0,95	0,868	0,95	0,95	0,868	0,867	0,868	0,868	0,868	0,95	0,868	0,868
VINCIC	1.000	0,911	1.000	0,911	0,911	ID	0,994	0,868	0,952	0,868	0,868	0,952	0,95	0,952	0,952	0,952	0,868	0,952	0,952
DANKIC	0,994	0,907	0,994	0,907	0,907	0,994	ID	0,868	0,951	0,868	0,868	0,951	0,952	0,951	0,951	0,951	0,868	0,951	0,951
ROKI	0,868	0,95	0,868	0,95	0,95	0,868	0,868	ID	0,911	1.000	1.000	0,911	0,911	0,911	0,911	0,911	1.000	0,911	0,911
PIKA	0,952	0,868	0,952	0,868	0,868	0,952	0,951	0,911	ID	0,911	0,911	1.000	0,998	1.000	1.000	1.000	0,911	1.000	1.000
LUNA	0,868	0,95	0,868	0,95	0,95	0,868	0,868	1.000	0,911	ID	1.000	0,911	0,911	0,911	0,911	0,911	1.000	0,911	0,911
LUNA B	0,868	0,95	0,868	0,95	0,95	0,868	0,868	1.000	0,911	1.000	ID	0,911	0,911	0,911	0,911	0,911	1.000	0,911	0,911
KUJA	0,952	0,868	0,952	0,868	0,868	0,952	0,951	0,911	1.000	0,911	0,911	ID	0,998	1.000	1.000	1.000	0,911	1.000	1.000
EVELIN	0,95	0,867	0,95	0,867	0,867	0,95	0,952	0,911	0,998	0,911	0,911	0,998	ID	0,998	0,998	0,998	0,911	0,998	0,998
CHARLOTTE	0,952	0,868	0,952	0,868	0,868	0,952	0,951	0,911	1.000	0,911	0,911	1.000	0,998	ID	1.000	1.000	0,911	1.000	1.000
BO	0,952	0,868	0,952	0,868	0,868	0,952	0,951	0,911	1.000	0,911	0,911	1.000	0,998	1.000	ID	1.000	0,911	1.000	1.000
BEBA	0,952	0,868	0,952	0,868	0,868	0,952	0,951	0,911	1.000	0,911	0,911	1.000	0,998	1.000	1.000	ID	0,911	1.000	1.000
ATHOS	0,868	0,95	0,868	0,95	0,95	0,868	0,868	1.000	0,911	1.000	1.000	0,911	0,911	0,911	0,911	0,911	ID	0,911	0,911
ASJA	0,952	0,868	0,952	0,868	0,868	0,952	0,951	0,911	1.000	0,911	0,911	1.000	0,998	1.000	1.000	1.000	0,911	ID	1.000
TAR	0,952	0,868	0,952	0,868	0,868	0,952	0,951	0,911	1.000	0,911	0,911	1.000	0,998	1.000	1.000	1.000	0,911	1.000	ID

Tablica 8. Matrica identičnosti. Prikaz međusobnih odnosa izolata određenog serovara s referentnim sojem istog serovara.

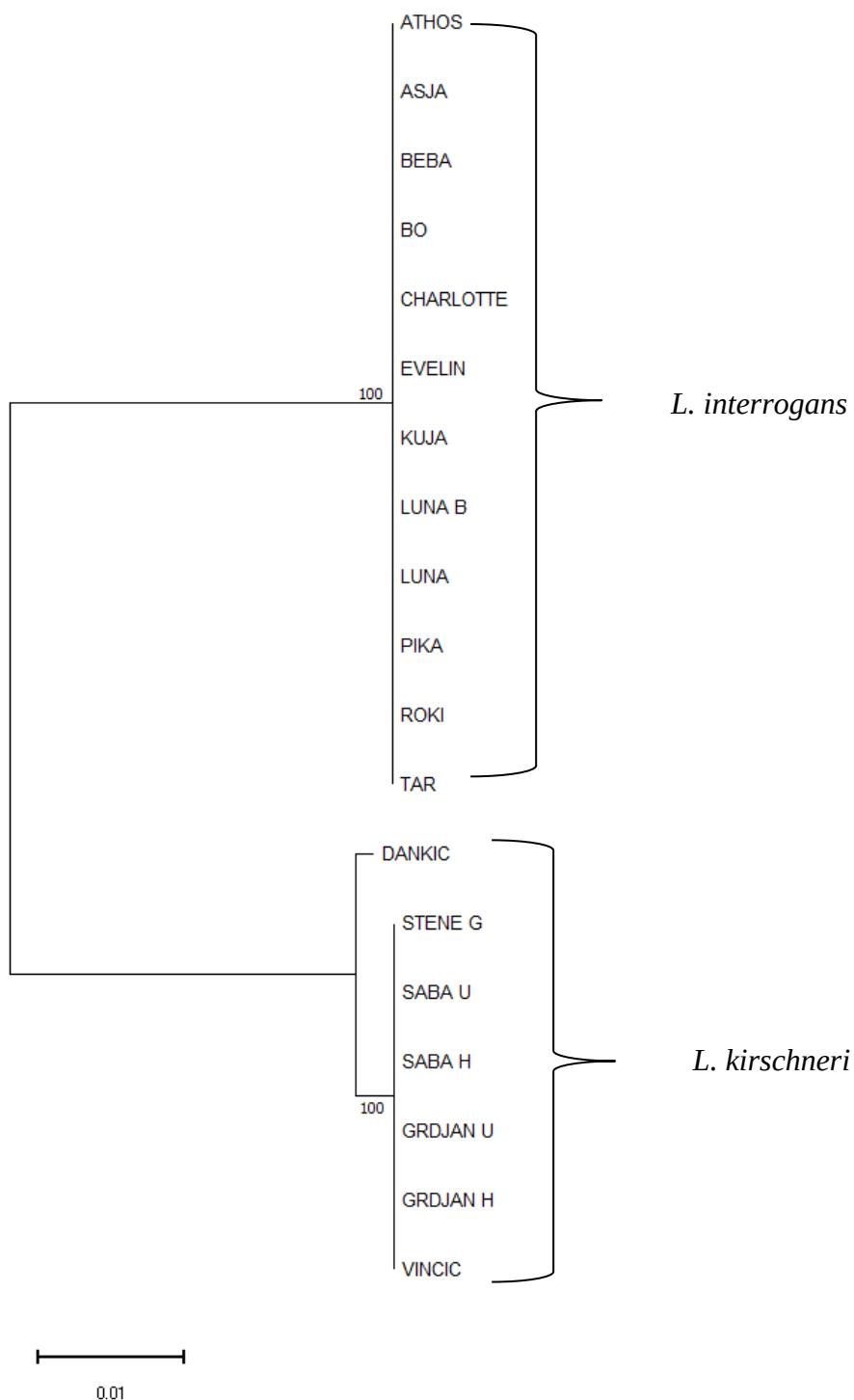
Seq->	VINCIC (Moz)	Mozdok 5621	BO (Cop)	Copenhageni M20	ATHOS (Icth)	Icth RGA
VINCIC (Moz)	ID	0,965	0,952	0,918	0,868	0,919
Mozdok 5621	0,965	ID	0,919	0,953	0,846	0,953
BO (Cop)	0,952	0,919	ID	0,965	0,911	0,965
Copenhageni M20	0,918	0,953	0,965	ID	0,888	0,999
ATHOS (Icth)	0,868	0,846	0,911	0,888	ID	0,888
Icth RGA	0,919	0,953	0,965	0,999	0,888	ID

Crvena boja – *L. kirschneri*, serološka skupina Pomona, serovar Mozdok.

Zelena boja – *L. interrogans*, serološka skupina Icterohaemorrhagiae, serovar Copenhageni.

Plava boja – *L. interrogans*, serološka skupina Icterohaemorrhagiae, serovar Icterohaemorrhagiae.

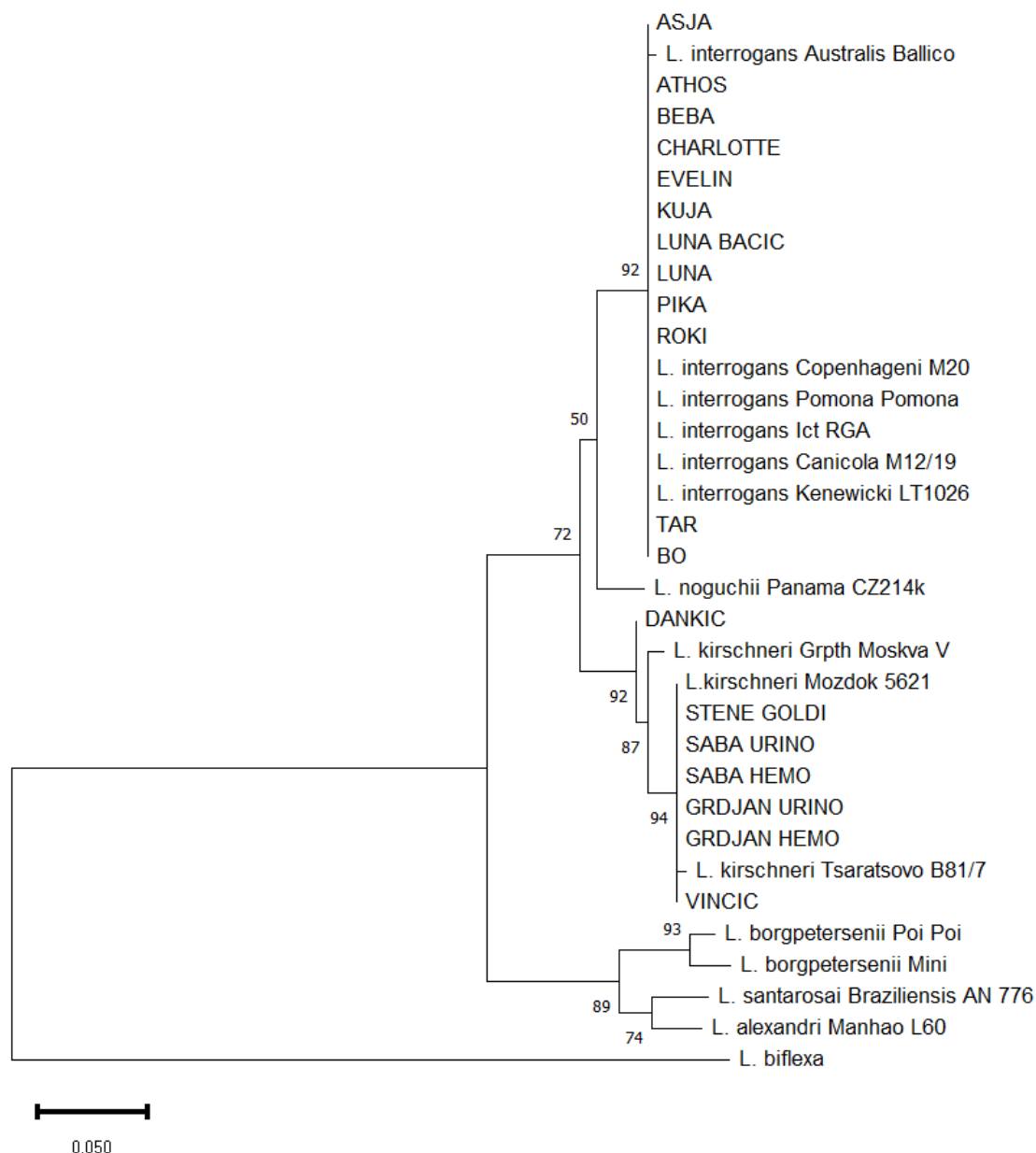
Filogenetska analiza dobivenih sekvenci koja je uključivala samo pretraživane izolate raspoređuje svih 20 izolata u dvije skupine koje odgovaraju već utvrđenim genomskim vrstama (Slika 12.). Unutar skupine *L. kirschneri*, uočena je dodatna podijela na dvije podskupine, pri čemu jedna uključuje samo jedan izolat nazvan 'Dankić'.



Slika 12. Filogenetsko stablo. Analiza mega nukleotidnih sljedova pretraživanih izolata.

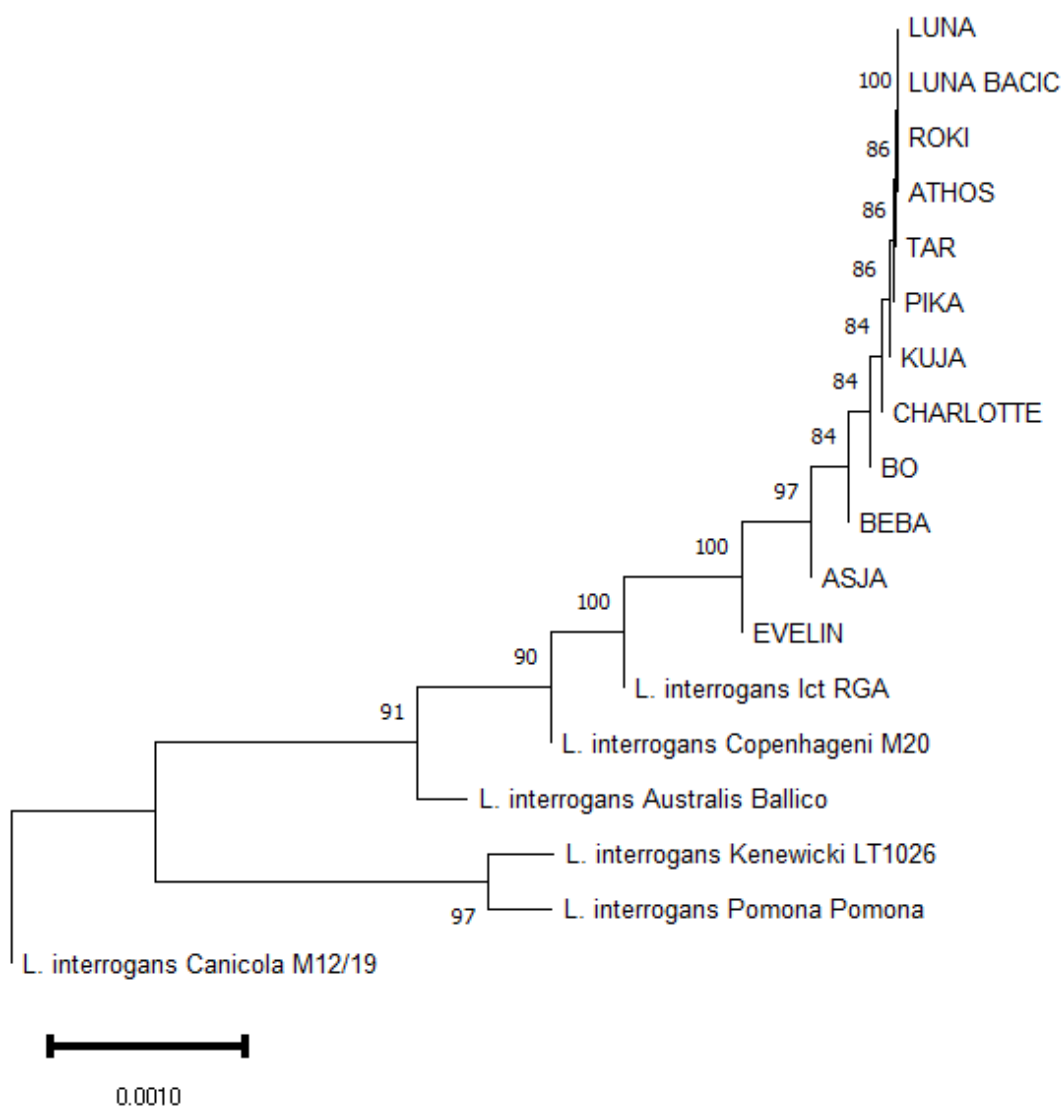
Stablo je dobiveno koristeći Neighbour joining algoritam. Evolucijske udaljenosti izračunate su metodom “Tamura 3 parametra”. Varijacija stope među mjestima modelirana je gama distribucijom. Uključene pozicije kodona bile su 1. + 2. + 3. + nekodirajuće pozicije. Ova analiza obuhvatila je 19 nukleotidna slijeda s ukupno 2876 pozicija u konačnom skupu podataka. Skala na dnu označava evolucijsku udaljenost.

Daljnjom filogenetskom analizom izolata koja je uključila odgovarajuće referentne sojeve, izolati se ponovno ispravno svrstavaju u dvije genomske vrste: *L. interrogans* i *L. kirschneri*. Predstavnici *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. alexandri* i *L. biflexa* korišteni su kao vanjske skupine (Slika 13.). Za bolji uvid u odnose unutar svake genomske vrste, svaka je prikazana zasebno (Slike 14. i 15.). Filogenetsko stablo koje prikazuje genomsku vrstu *L. kirschneri* jasno prikazuje kako se od sedam izolata, šest izolata pasa svrstava zajedno uz referentni soj serovara Mozdok, dok se jedan izolat (Dankić) svrstava u zasebnu skupinu. Unutar genomske vrste *L. interrogans* svih 12 pretraživanih izolata svrstalo se uz referentne sojeve serovara Copenhageni i Icterohaemorrhagiae.



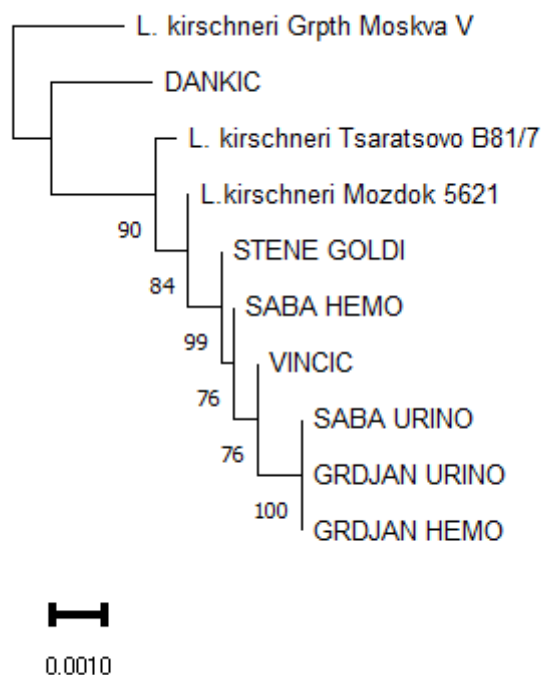
Slika 13. Filogenetsko stablo. Analiza mega nukleotidnih sljedova petraživanih izolata s referentnim sojevima.

Stablo je dobiveno koristeći Neighbour joining algoritam. Evolucijske udaljenosti izračunate su metodom “Tamura – Nei parametra”. Varijacija stope među mjestima modelirana je gama distribucijom. Uključene pozicije kodona bile su 1. + 2. + 3. + nekodirajuće pozicije. Ova analiza obuhvatila je 33 nukleotidna slijeda s ukupno 3244 pozicija u konačnom skupu podataka. Skala na dnu označava evolucijsku udaljenost.



Slika 14. Filogenetsko stablo. Analiza mega nukleotidnih sljedova petraživanih izolata s referentnim sojevima koji pripadaju genomske vrsti *L. interrogans*.

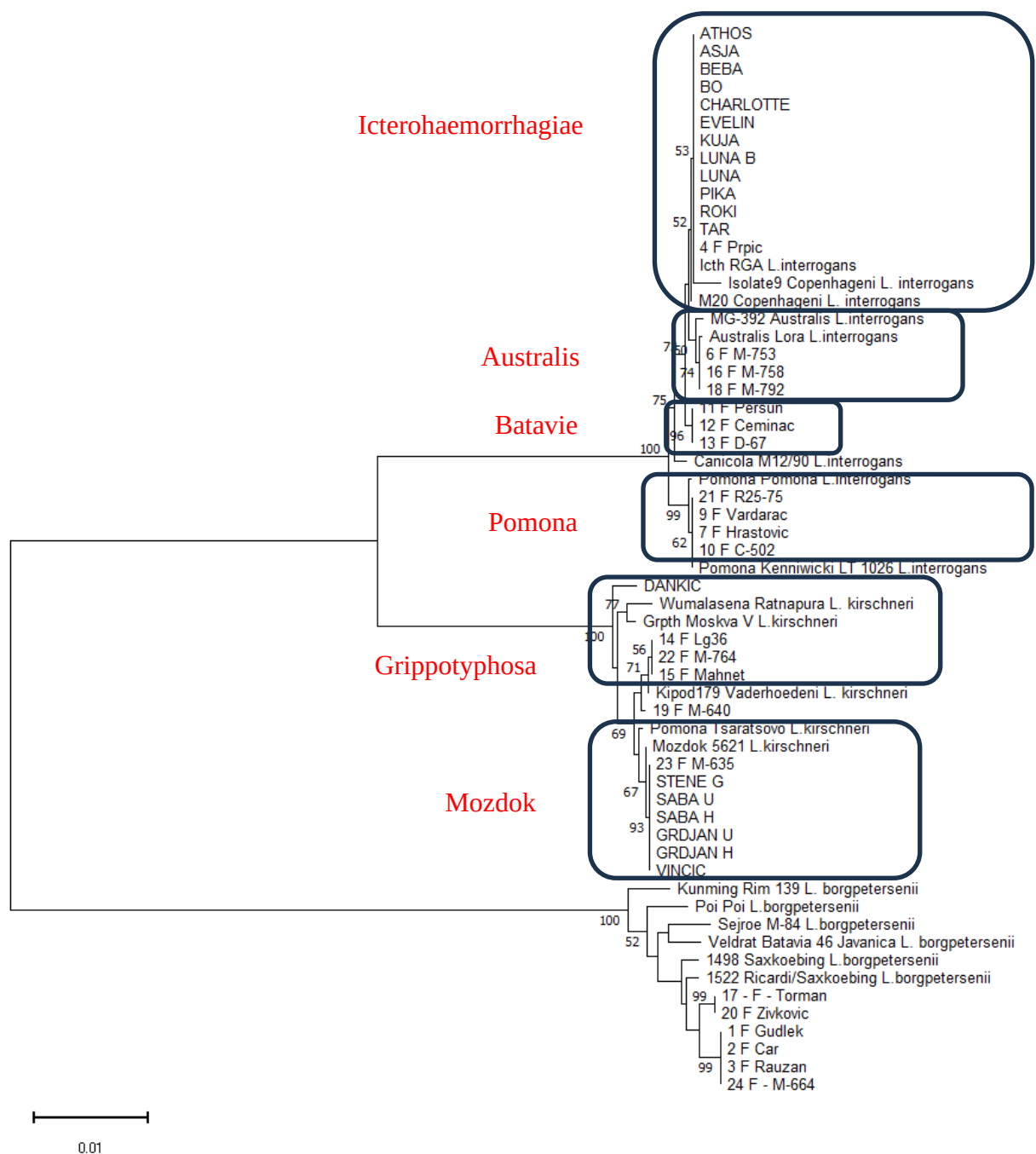
Stablo je dobiveno koristeći Neighbour joining algoritam. Evolucijske udaljenosti izračunate su metodom “Tamura – Nei parametra”.



Slika 15. Filogenetsko stablo. Analiza mega nukleotidnih sljedova pretraživanih izolata s referentnim sojevima koji pripadaju genomskoj vrsti *L. kirschneri*.

Stablo je dobiveno koristeći Neighbour joining algoritam. Evolucijske udaljenosti izračunate su metodom “Tamura – Nei parametra”.

Kako bi se dodatno povećala razlučivost filogenetske analize u istu su uključeni izolati izdvojeni iz različitih vrsta životinja i ljudi prikupljeni na području Republike Hrvatske i tipizirani tijekom ranijih istraživanja. Dobiveno filogenetsko stablo nudi sveobuhvatan pregled genetske raznolikosti među sojevima leptospira izdvojenim iz različitih izvora, ali unutar istog endemskog područja (Slika 16.). Stablo je podijeljeno u nekoliko glavnih skupina koje jasno grupiraju izolate u tri genomske vrste s podskupinama koje se, u najvećem dijelu, podudaraju s utvrđenim serološkim skupinama i/ili serovarima.

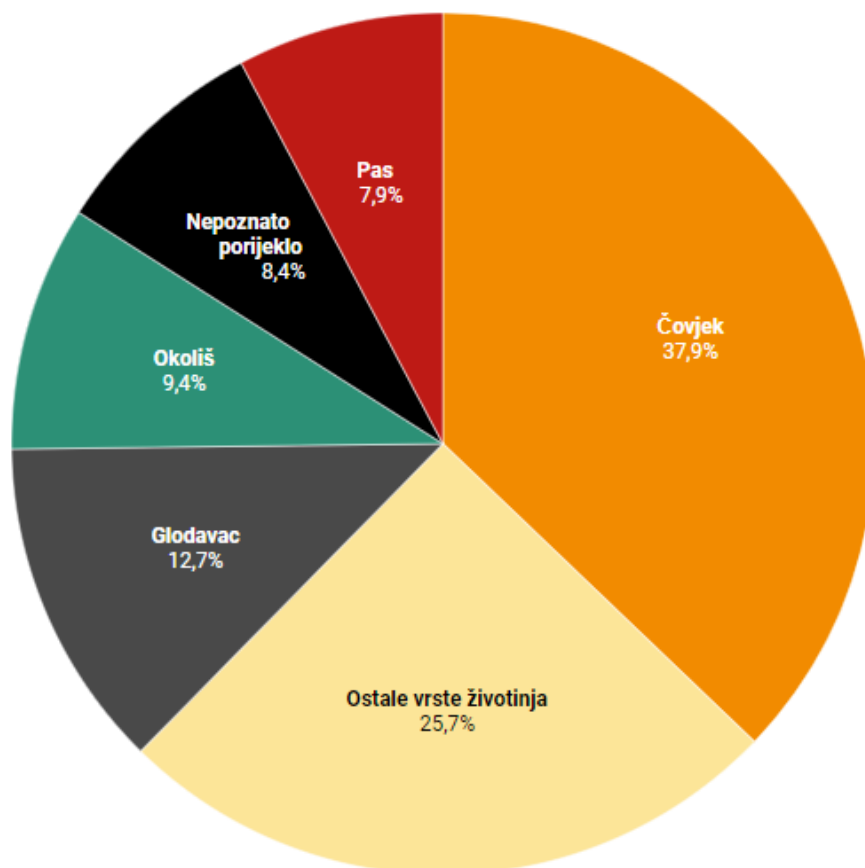


Slika 16. Filogenetska analiza. Analiza mega nukleotidnih sljedova pretraživanih izolata pasa s nukleotidnim sljedovima izolata različitih vrsta životinja i čovjeka iz ranijih istraživanja te referentnih sojeva koji pripadaju različitim genomskim vrstama.

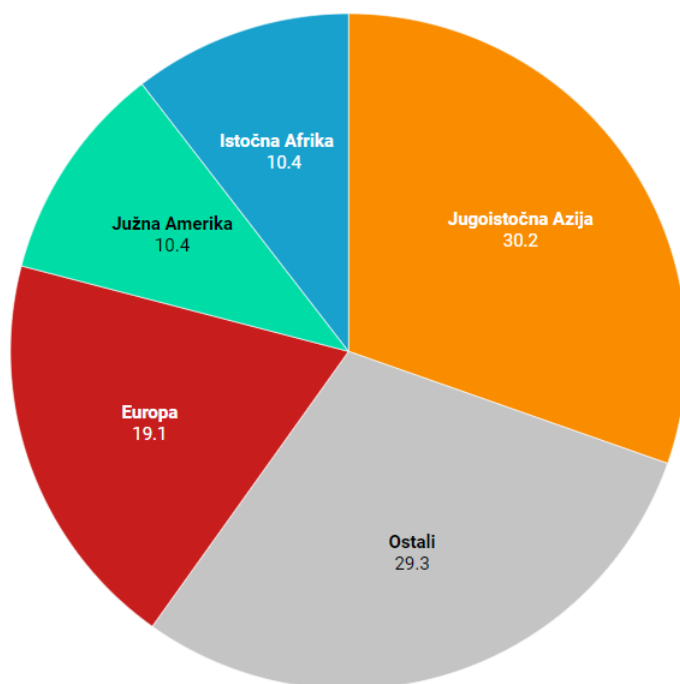
Stablo je dobiveno koristeći Neighbour joining algoritam. Evolucijske udaljenosti izračunate su metodom “Tajima – Nei parametra”. Varijacija stope među mjestima modelirana je gama distribucijom. Ova analiza obuhvatila je 60 nukleotidnih sljedova s ukupno 2844 pozicija u konačnom skupu podataka. Skala na dnu označava evolucijsku udaljenost.

5.4. BIGSdb baza podataka Instituta Pasteur, Pariz, Francuska

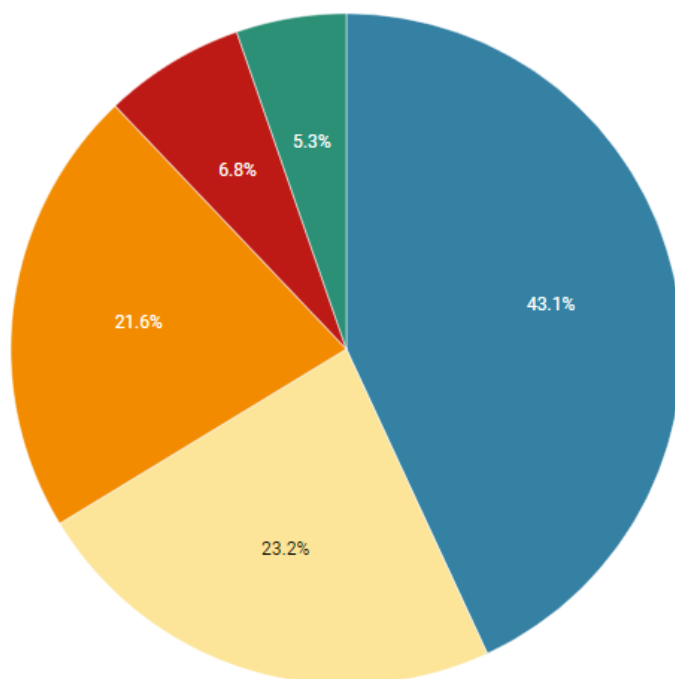
BIGSdb baza podataka, je platforma dizajnirana za upravljanje i analizu bakterijskih genoma i može pohraniti i organizirati cjelokupne sekvence genoma zajedno s pridruženim podacima za različite bakterijske izolate. Održava sveobuhvatne baze podataka alela i tipova sekvenci, podržavajući i konvencionalne MLST i cgMLST sheme. Trenutno baza podataka obuhvaća 1529 izolata genoma leptospira, od kojih je najviše izolata izdvojeno iz ljudi. Od ukupnog broja svega 7,9% izolata izdvojeno je iz pasa, uključujući i izolate iz ovog istraživanja. Detaljan prikaz zastupljenosti različitih izvora prikazan je na Slici 17. Značajne su i razlike u geografskom porijeklu prikupljenih izolata, od kojih najviše potječe iz Europe, Južne Amerike te Jugoistočne Azije (Slika 18.) te u zastupljenosti pojedinih genomskih vrsta. Udio najčešćih genomskih vrsta prikazan je na Slici 19.



Slika 17. Kružni grafikon. Prikaz zastupljenosti izvora izolata u BIGSdb bazi podataka.



Slika 18. Kružni grafikon. Prikaz geografskog porijekla izolata u BIGSdb bazi podataka.



Slika 19. Kružni grafikon. Prikaz najčešćih genomskih vrsta u BIGSdb bazi podataka. Skala boja po genomskim vrstama prikazana je u kazalu.

5.5. Molekularno tipiziranje na osnovi ključnih regija genoma

Zbog postizanja veće razlučivosti genetskih analiza te dobivanja boljeg uvida u genetske varijacije među sojevima svi prikupljeni izolati analizirani su pomoću novog pristupa molekularnog tipiziranja koje je uključivalo sekvenciranje 545 gena. Ova metoda omogućila je identificiranje klonalne grupe (CG) i tipa sekvence (cgST). Dobivene klonalne grupe temelje se na jednostrukom povezivanju cgMLST alelnih profila s pragom od 40 alelnih razlika dok je tip sekvence određen kao jedinstvena identifikacija soja leptospira temeljen na alelnim profilima ključnih regija genoma (Tablica 9). Više tipova sekvenci (u tablici odvojeni točka zarezom) ukazuje na podudaranje unutar alela za određene lokuse. Vidljivo je da da svaki izolat ima jedan jedinstveni tip sekvence, osim izolata Asja i Bo, koji osim sa drugim izolatima u bazi, dodatno dijele dva tipa sekvence, 990 i 997.

Tablica 9. Prikaz izolata, pripadajućeg tipa sekvence (cgST) i klonalne grupe (CG) dobivenih cgMLST-om

Naziv izolata	cgST	CG
ROKI	999	6
LUNA BAČIĆ	1000	6
BEBA	1001	6
EVELIN	1002	6
CHARLOTTE	1003	6
ASJA	199;275;749;752;755;756;757;758;759;760;777;990;997;1002; 1398;1400;1529;1575;1681;1686	6
BO	990;997;1093	6
TAR	1004	6
KUJA	1005	6
ŠTENE GOLDI	1011	73
GRDJAN HEMO	1012	73
SABA HEMO	1013	73
SABA URINO	1014	73
LUNA	1015	6
VINČIĆ	1016	73
ATHOS	1020	6
GRDJAN URINO	1021	73
PIKA	1387	6

Tablica 10 prikazuje podatke o duljini, udjelu G+C baza, duljini djelomično sastavljenog niza od nekoliko očitavanja – kontiga (engl. *Contig*) te broju i postotku označenih alela i lokusa za svaku dobivenu sekvencu.

Tablica 10. Sekvenciranje ključnih regija genoma. Prikaz duljine sekvenci, udjela G+C baza te broja označenih alela i lokusa

Naziv izolata	Broj kontiga	Duljina sekvence (bp)	%GC	Broj označenih alela	% označenih alela	Broj označenih lokusa	% označenih lokusa
ROKI	173	4626294	35,02	544	99,8	545	100
LUNA BAČIĆ	278	4633743	35,06	545	100	545	100
BEBA	271	4538942	35,1	544	99,8	544	99,8
EVELIN	303	4534454	35,12	542	99,4	544	99,8
CHARLOTTE	277	4602683	35,08	543	99,6	545	100
ASJA	181	4576653	35,04	545	100	545	100
BO	188	4585064	35,02	545	100	545	100
TAR	157	4589573	34,99	541	99,3	545	100
KUJA	170	4573947	35,01	540	99,1	544	99,8
ŠTENE GOLDI	146	4421041	35,88	544	99,8	545	100
GRDJAN HEMO	140	4606474	35,91	541	99,3	544	99,8
SABA HEMO	162	4431150	35,89	544	99,8	545	100
SABA URINO	130	4440598	35,85	543	99,6	545	100
LUNA	124	4660111	34,97	545	100	545	100
VINČIĆ	177	4612231	35,91	541	99,3	544	99,8
ATHOS	157	4578513	35,03	545	100	545	100
GRDJAN URINO	186	4562877	35,89	543	99,6	544	99,8
PIKA	210	4595761	35,06	544	99,8	545	100

Veličina sekvence, odnosno genoma kretala se u rasponu od 4,4 (Štene Goldi) do 4,6 (Luna) Mbp. Udio G+C baza kretao se u vrlo malom rasponu između 35,02 i 35,89%. Za svaku dobivenu sekvencu moguće je u BIGSdb bazi podataka pronaći detaljne podatke o duljini svakog kontiga te pretražiti svaki lokus zasebno (Slika 20.).

Sequence	Sequencing method	Original designation	Length	Comments	Locus	Start	End	Direction	Annotation
284130	Illumina	contig_00001	137936		LIC_RS08930	43665	44309	→	EMBL GBK
					C_LIC_RS08930	43675	44299	→	
					LIC_RS08935	44306	45367	→	
					C_LIC_RS08935	44316	45357	→	
					LIC_RS08940	45805	47115	←	
					C_LIC_RS08940	45815	47105	←	
					BACT000057 (rpmB)	58849	59133	←	
					LIC_RS09020	65653	66873	→	
					C_LIC_RS09020	65663	66863	→	
					LIC_RS09025	66890	67966	→	
					C_LIC_RS09025	66900	67956	→	
					LIC_RS09030	67983	68390	→	
					C_LIC_RS09030	67993	68380	→	
					LIC_RS09065	74697	74873	←	
					C_LIC_RS09065	74707	74863	←	
					LIC_RS09070	75246	76301	←	
					C_LIC_RS09070	75256	76291	←	
					LIC_RS09090	79453	80433	←	
					C_LIC_RS09090	79463	80423	←	
					LIC_RS09105	82079	82720	→	

Slika 20. Prikaz iz BIGSdb baze podataka. Primjer dobivanja podataka za svaki lokus zasebno.

5.5.1. Određivanje genomske vrste pomoću ribosomske multigenске tipizacije

Obzirom da su geni ribosomske multigenске tipizacija (rMLST) uključeni u ključne regije genoma, nakon cgMLST sekvenciranja bilo je moguće utvrditi pripadnost pretraživanih izolata genomskim vrstama (Slika 21.). Temeljem analize sekvenci 53 gena ribosomalnih proteinskih podjedinica potvrdili smo pripadnost izolata istim genomskim vrstama kao i pomoću umnažanja i analize odsječaka *secY* gena.

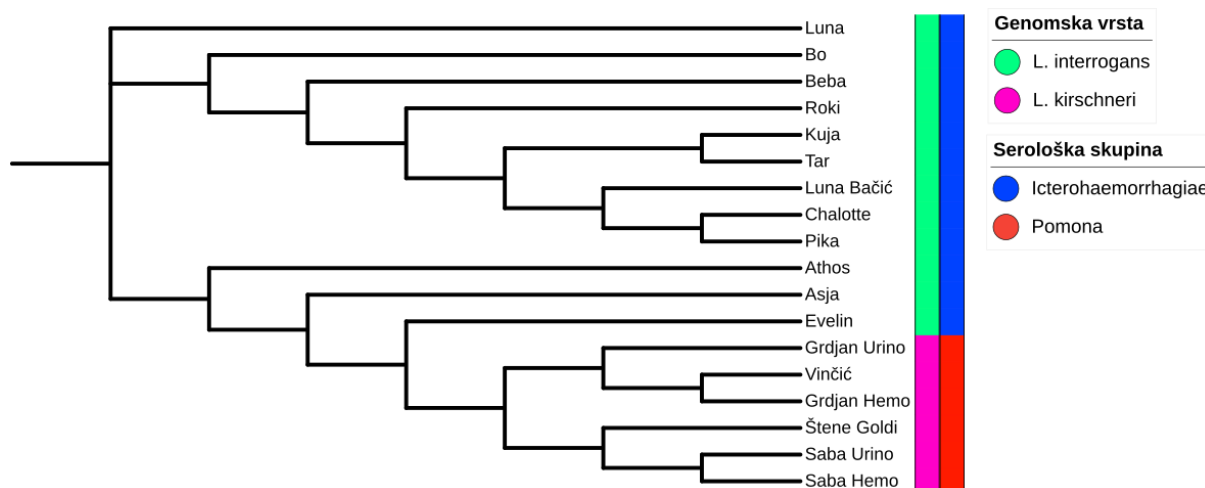
1	id	rank	taxon	taxonomy
2	ROKI	SPECIES	Leptospira interrogans	Spirochaetota > Spirochaetia > Leptospirales > Leptospiraceae > Leptospira > Leptospira interrogans
3	LUNA BAČIĆ	SPECIES	Leptospira interrogans	Spirochaetota > Spirochaetia > Leptospirales > Leptospiraceae > Leptospira > Leptospira interrogans
4	BEBE	SPECIES	Leptospira interrogans	Spirochaetota > Spirochaetia > Leptospirales > Leptospiraceae > Leptospira > Leptospira interrogans
5	PIKA	SPECIES	Leptospira interrogans	Spirochaetota > Spirochaetia > Leptospirales > Leptospiraceae > Leptospira > Leptospira interrogans
6	CHARLOTTE	SPECIES	Leptospira interrogans	Spirochaetota > Spirochaetia > Leptospirales > Leptospiraceae > Leptospira > Leptospira interrogans
7	ASJA	SPECIES	Leptospira interrogans	Spirochaetota > Spirochaetia > Leptospirales > Leptospiraceae > Leptospira > Leptospira interrogans
8	BO	SPECIES	Leptospira interrogans	Spirochaetota > Spirochaetia > Leptospirales > Leptospiraceae > Leptospira > Leptospira interrogans
9	TAR	SPECIES	Leptospira interrogans	Spirochaetota > Spirochaetia > Leptospirales > Leptospiraceae > Leptospira > Leptospira interrogans
10	KUJA	SPECIES	Leptospira interrogans	Spirochaetota > Spirochaetia > Leptospirales > Leptospiraceae > Leptospira > Leptospira interrogans
11	ŠTENE GOLDI	SPECIES	Leptospira kirschneri	Spirochaetota > Spirochaetia > Leptospirales > Leptospiraceae > Leptospira > Leptospira kirschneri
12	GRDJAN HEMO	SPECIES	Leptospira kirschneri	Spirochaetota > Spirochaetia > Leptospirales > Leptospiraceae > Leptospira > Leptospira kirschneri
13	SABA HEMO	SPECIES	Leptospira kirschneri	Spirochaetota > Spirochaetia > Leptospirales > Leptospiraceae > Leptospira > Leptospira kirschneri
14	SABA URINO	SPECIES	Leptospira kirschneri	Spirochaetota > Spirochaetia > Leptospirales > Leptospiraceae > Leptospira > Leptospira kirschneri
15	LUNA	SPECIES	Leptospira interrogans	Spirochaetota > Spirochaetia > Leptospirales > Leptospiraceae > Leptospira > Leptospira interrogans
16	VINČIĆ	SPECIES	Leptospira kirschneri	Spirochaetota > Spirochaetia > Leptospirales > Leptospiraceae > Leptospira > Leptospira kirschneri
17	ATHOS	SPECIES	Leptospira interrogans	Spirochaetota > Spirochaetia > Leptospirales > Leptospiraceae > Leptospira > Leptospira interrogans
18	GRDJAN URINO	SPECIES	Leptospira kirschneri	Spirochaetota > Spirochaetia > Leptospirales > Leptospiraceae > Leptospira > Leptospira kirschneri
19	EVELIN	SPECIES	Leptospira interrogans	Spirochaetota > Spirochaetia > Leptospirales > Leptospiraceae > Leptospira > Leptospira interrogans
20	DANKIĆ	SPECIES	Leptospira kirschneri	Spirochaetota > Spirochaetia > Leptospirales > Leptospiraceae > Leptospira > Leptospira kirschneri
21	BAK	SPECIES	Leptospira kirschneri	Spirochaetota > Spirochaetia > Leptospirales > Leptospiraceae > Leptospira > Leptospira kirschneri

Slika 21. Izvadak iz Excel tablice izvezen iz BIGSdb baze podataka.

Slika prikazuje rezultate ribosomske multigenске tipizacije, odnosno utvrđenu genomsku vrstu pretraženih izolata.

5.5.2. Filogenetska analiza dobivenih sekvenci ključnih regija genoma

Filogenetskom analizom ključnih regija genoma i usporedbom svih pretraživanih izolata potvrđena je prethodno određena pripadnost genomskim vrstama i serološkim skupinama (Slika 22.).

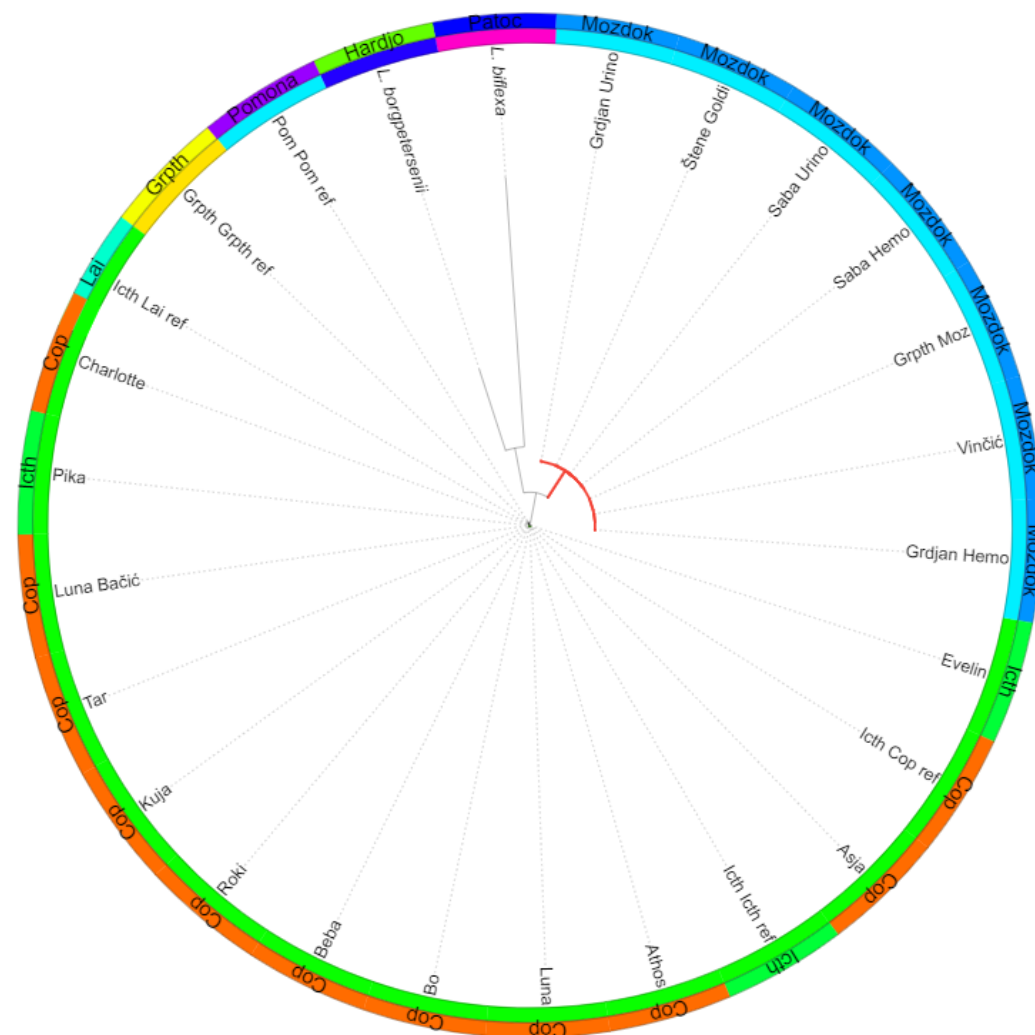


Slika 22. Filogenetsko stablo. Analiza 545 gena pretraživanih izolata.

Stablo je dobiveno koristeći Neighbour joining algoritam. Evolucijske udaljenosti izračunate su metodom “Tamura 3 parametra”. Generirano u ITOL-u (engl. *Interactive Tree of Life*). Unutarnji stupac označava pripadajuću genomsku vrstu, dok vanjski stupac označava pripadajuću serološku skupinu. Duljina grana nije značajna.

Daljnjom filogenetskom analizom izolati ovog istraživanja uspoređeni su s referentim sojevima preuzetim iz baze podataka. Kao vanjske skupine uzete su genomske vrste *L. borgpetersenii* i *L. biflexa*. Ustanovljeno je da se svi izolati koji pripadaju genomskoj vrsti *L. kirschneri*, svrstavaju sa izolatima determiniranim kao serološka skupina Pomona, serovar Mozdok. Svi izolati koji pripadaju genomskoj vrsti *L. interrogans*, svrstani su sa drugim izolatima koji pripadaju serovarima Copenhageni i Icterohaemorrhagiae, serološke skupine Icterohaemorrhagiae (Slika 23.).

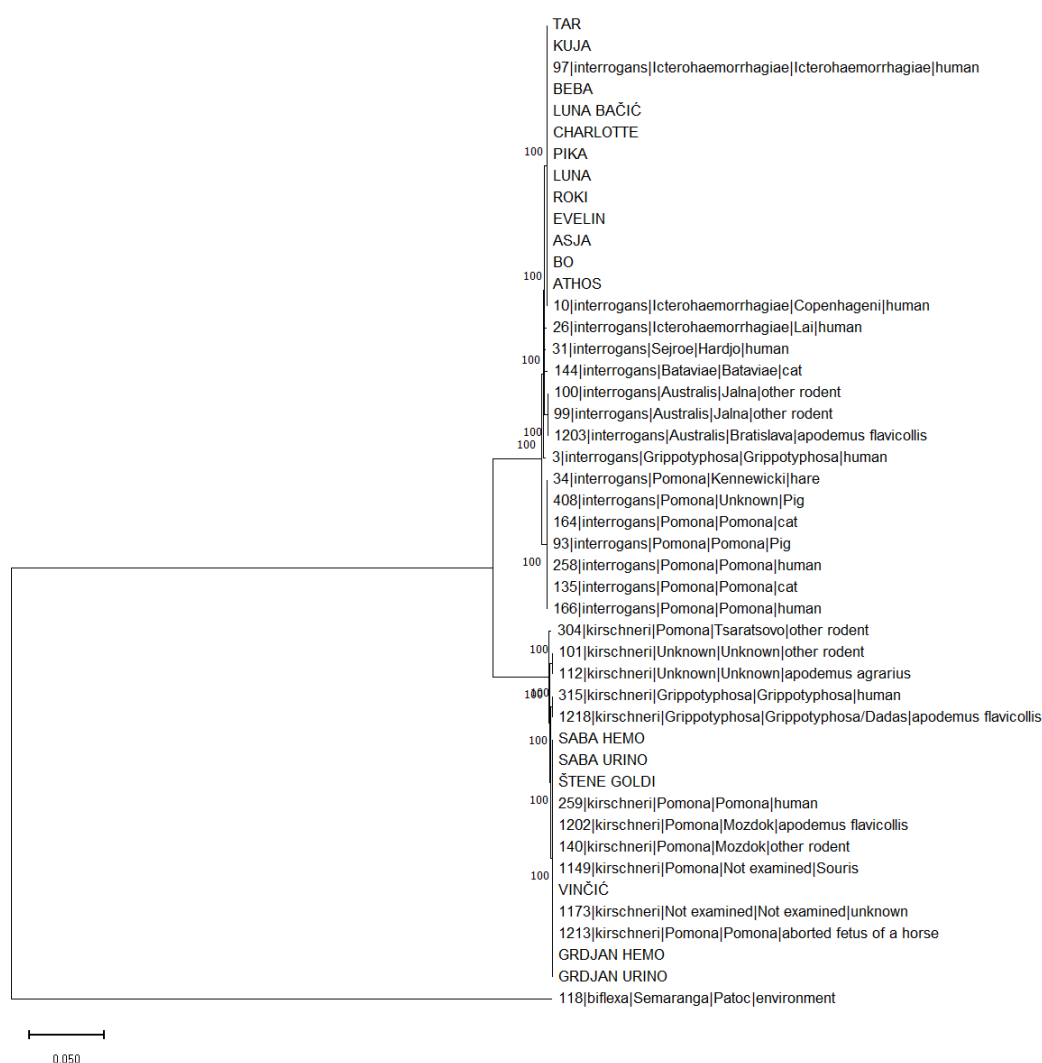
Tree scale: 0.1



Slika 23. Filogenetsko stablo. Analiza 545 gena svih pretraživanih izolata i odgovarajućih referentnih sojeva.

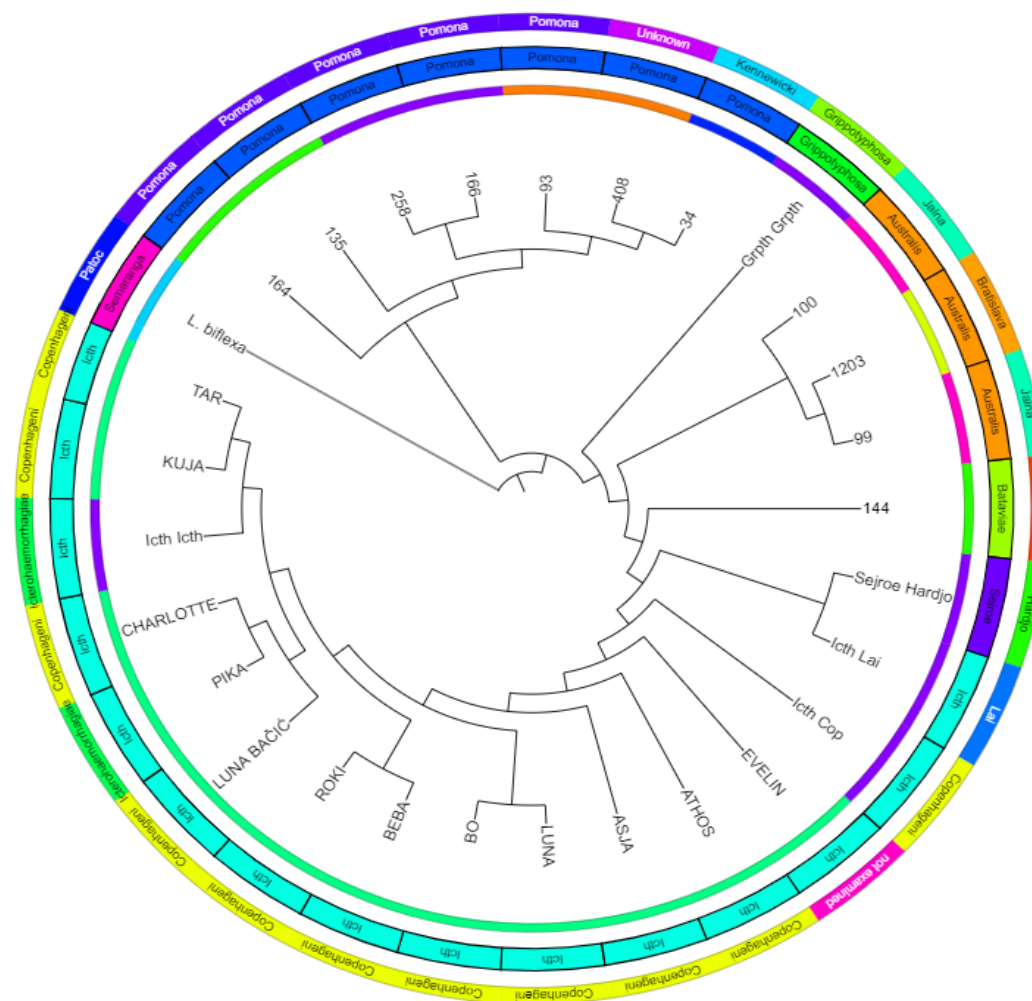
Stablo je dobiveno koristeći Neighbour joining algoritam. Evolucijske udaljenosti izračunate su metodom “Tamura 3 parametra”. Generirano u ITOL-u (engl. *Interactive Tree of Life*). Unutrašnji krug označava serološku skupinu, a vanjski krug označava pripadajući serovar (kazalo boja). Skala na vrhu označava evolucijsku udaljenost.

Kako bi detaljnije pojasnili međudnose za svaku pojedinu genomsku vrstu unutar istog geografskog područja analizirani su i prikazani svi izolati sa područja Republike Hrvatske i pripadajući referentni sojevi, dostupni u bazi podataka. Izolati iz ovog pretraživanja prikazani su imenom, za ostale je naveden identifikaciji broj izolata, pripadajuća genomski vrsta, serološka skupina i serovar kao i izvor (slika 24.). Dodatno je svaka genomski vrsta prikazana zasebno (Slika 25. i 26.). Filogenetska stabla ističu genetsku sličnost unutar skupina koje sadrže izolate izdvojene iz istih domaćina.



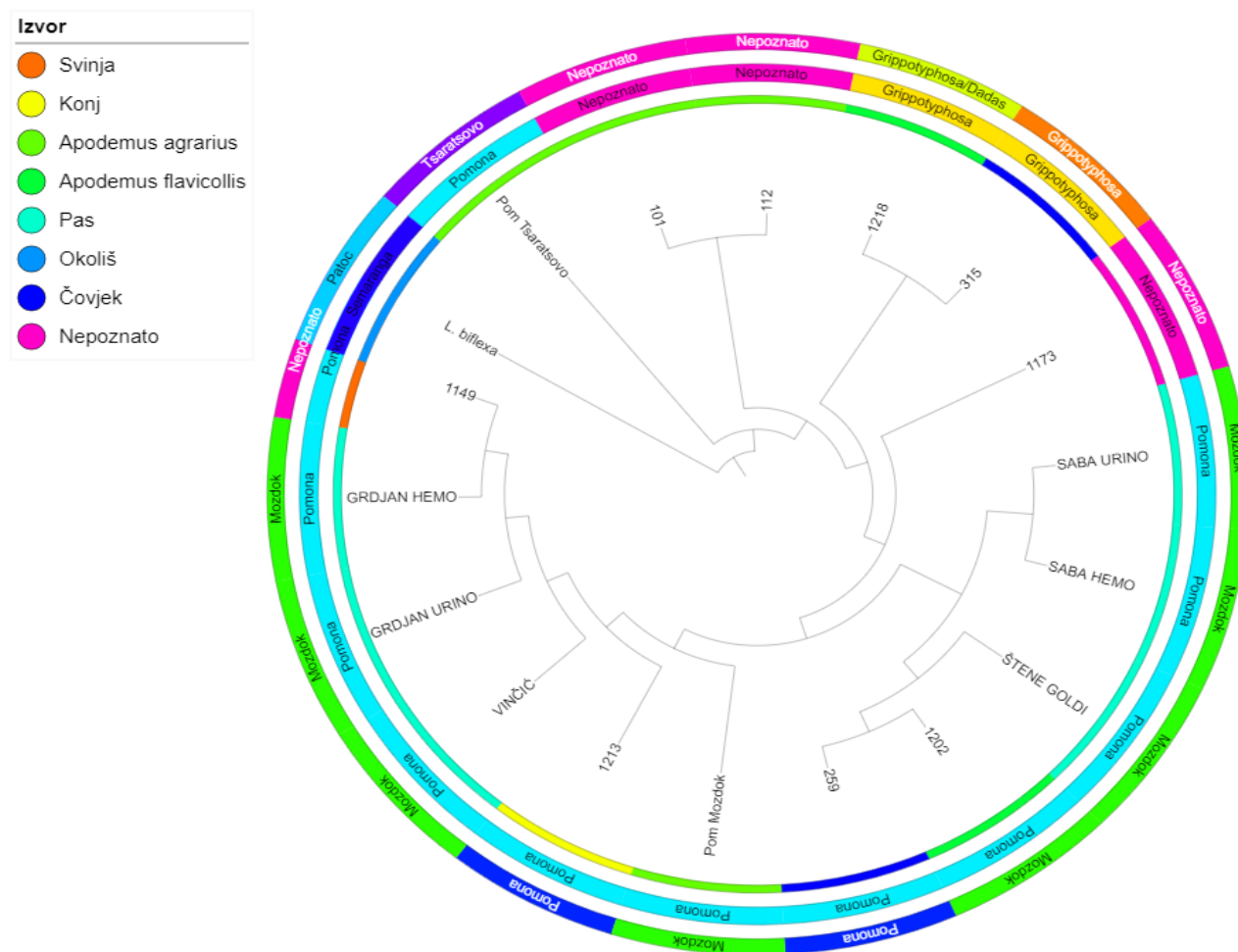
Slika 24. Filogenetska analiza. Analiza 545 gena izolata izdvojena s područja RH (n=37) i pripadajućih referentnih sojeva.

Kao vanjska skupina korištena je *L. biflexa*. Stablo je dobiveno koristeći Neighbour joining algoritam. Evolucijske udaljenosti izračunate su metodom „Tamura 3 parametra“. Varijacija stope među mjestima modelirana je gama distribucijom. Ova analiza obuhvatila je 46 nukleotidna slijeda s ukupno 484063 pozicija u konačnom skupu podataka. Skala na dnu označava evolucijsku udaljenost.



Slika 25. Filogenetsko stablo. Analiza 545 gena pretraživanih izolata koji pripadaju genomske vrsti *L. interrogans* i izdvojeni su s područja RH i odgovarajućih referentnih sojeva. *L. biflexa* korištena je kao vanjska skupina.

Stablo je dobiveno koristeći Neighbour joining algoritam. Evolucijske udaljenosti izračunate su metodom “Tamura 3 parametra”. Generirano u ITOL-u (engl. *Interactive Tree of Life*). Unutrašnji krug označava izvor izolata (kazalo boja), srednji krug označava serološku skupinu, a vanjski krug označava pripadajući serovar. Duljine grana nisu značajne.



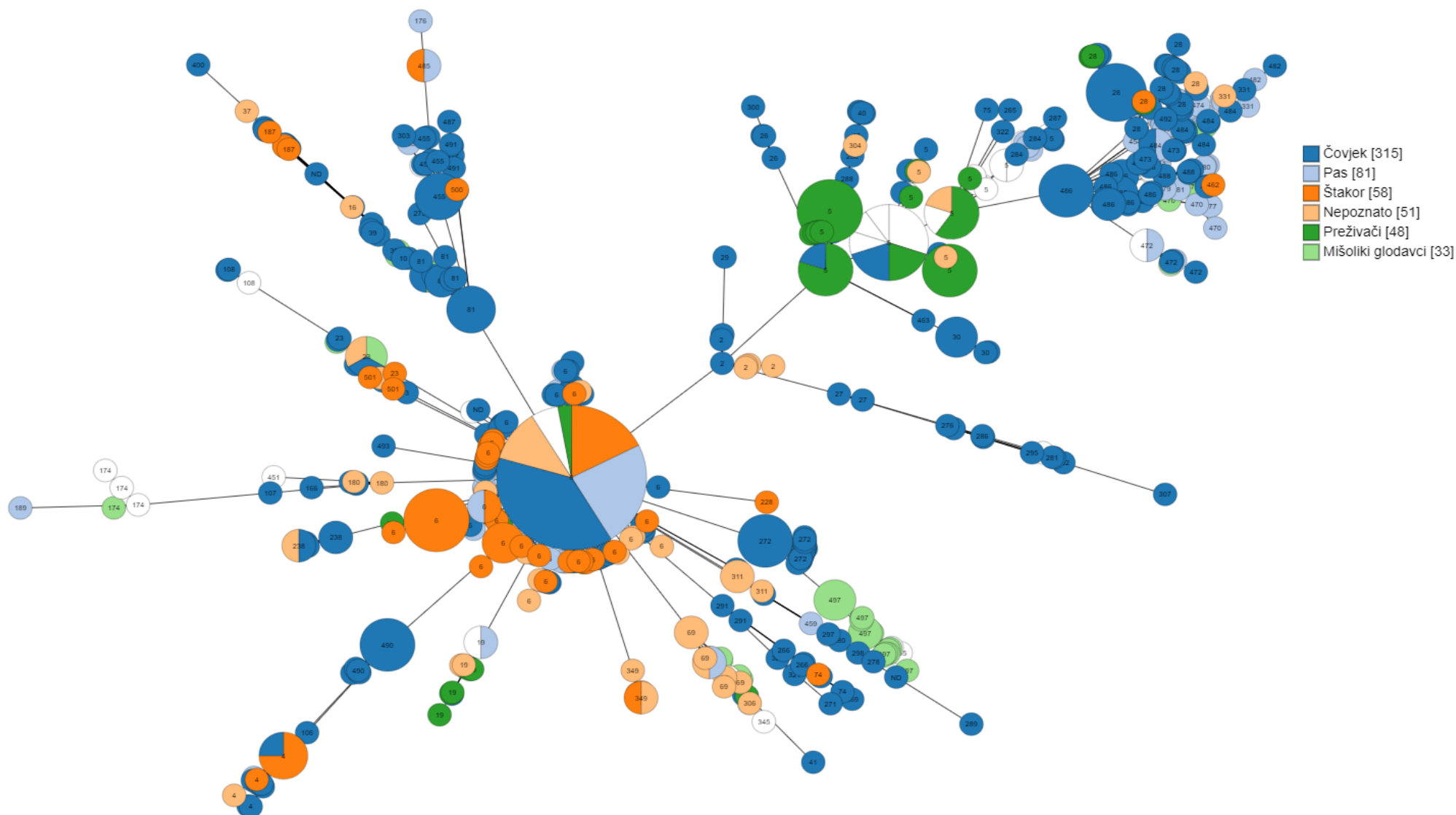
Slika 26. Filogenetsko stablo. Analiza 545 gena pretraživanih izolata koji pripadaju genomske vrsti *L. kirschneri* i izdvojeni su s područja RH i odgovarajućih referentnih sojeva. *L. biflexa* korištena je kao vanjska skupina.

Stablo je dobiveno koristeći Neighbour joining algoritam. Evolucijske udaljenosti izračunate su metodom “Tamura 3 parametra”. Generirano u ITOL-u (engl. *Interactive Tree of Life*). Unutrašnji krug označava izvor izolata (kazalo boja), srednji krug označava serološku skupinu, a vanjski krug označava pripadajući serovar. Duljine grana nisu značajne.

5.5.3. Identifikacija klonalnih grupa

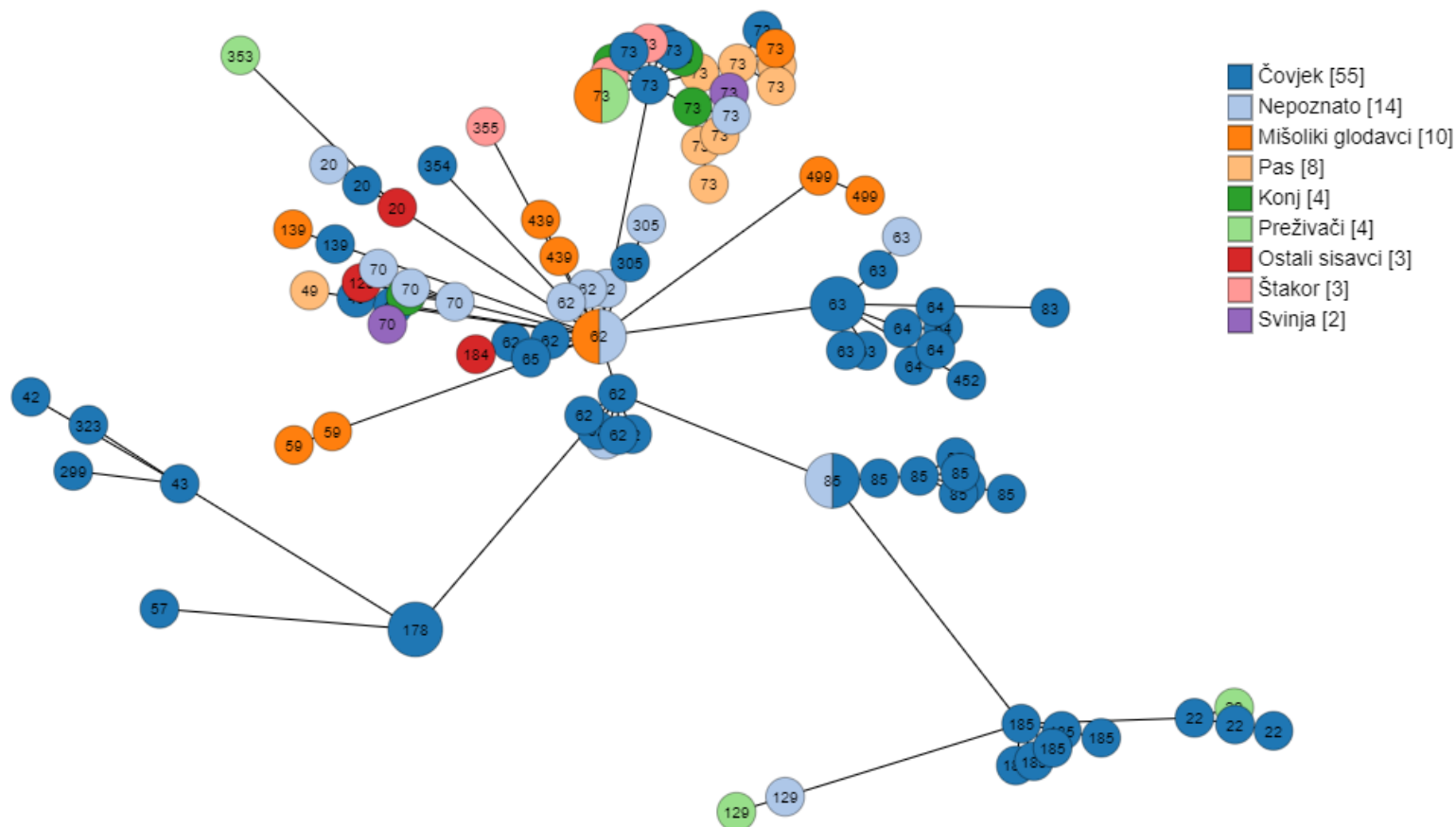
Ustanovili smo da svi pretraživani izolati genomske vrste *L. interrogans* pripadaju klonalnoj grupi 6, dok su izolati vrste *L. kirschneri* svrstani unutar klonalne grupe 73. Uvidom u bazu razvidno je da se unutar utvrđenih klonalnih grupa nalaze izolati koji pripadaju različitim serovarima, što znači da određivanje klonalne grupe ne omogućuje točnu determinaciju serovara. Klonalna grupa većinom odgovara serološkoj skupini, a veću razlučivost ima samo ukoliko serovari unutar serološke skupine pripadaju različitim genomskim vrstama.

Minimalnim razgranatim stablom (engl. *Minimum Spanning Tree*, MST) prikazani su međuodnosi dostupnih sojeva izdvojenih iz različitih izvora diljem svijeta za svaku genomsku vrstu pojedinačno (Slike 27. i 28.). Uvidom u dobivene prikaze razvidno je da je klonalna skupina 6 globalno najzastupljenija. Obje klonalne grupe utvrđene u pretraživanih izolata (6 i 73) prisutne su u populaciji različitih vrsta životinja ali i ljudi (Slika 30) što nam omogućuje da uspoređivanjem različitih klonalnih grupa unutar jedne genomske vrste identificiramo potencijalne izvore infekcije. Analiza prisutnosti određenih klonalnih grupa unutar različitih geografskih područja ukazuje da su u Europi najzastupljenije upravo ove dvije klonalne grupe, koje se i u ovom geografskom području izdvajaju iz različitih domaćina (Slika 29. i 30.). Analiza međuodnosa na razini Republike Hrvatske pokazuje da je klonalna grupa 6 prisutna isključivo unutar populacije pasa, dok je klonalna grupa 73 izdvojena iz više različitih vrsta životinja (Slika 31.). Rezultate analize međuodnosa na razini Republike Hrvatske treba vrlo oprezno tumačiti obzirom na vrlo mali broj izolata i činjenicu da se najveći udio tipiziranih izolata odnosi na one izdvojene iz pasa (rezultati ovog istraživanja).



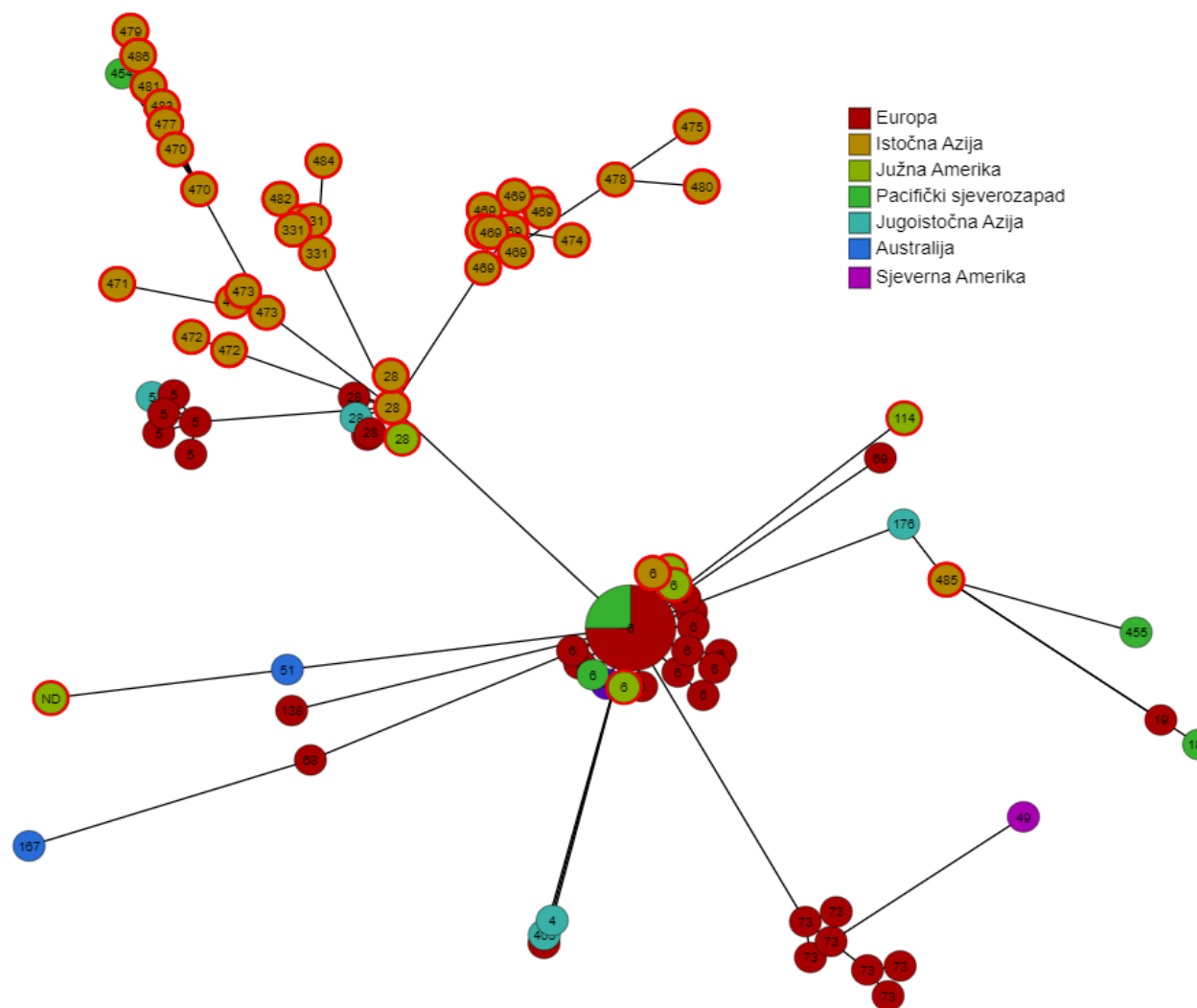
Slika 27. Minimalo razgranuto stablo svih izolata dostupnih u BIGSDB bazi podataka koji pripadaju genomskoj vrsti *L. interrogans*

Prikazane su klonalne grupe (naznačene unutar krugova) izolata. Bojama su označeni različiti izvori. Krugovi većih promjera obuhvaćaju veći broj izolata u usporedbi s manjima. Linije koje povezuju čvorove označavaju genetske veze između različitih klonalnih grupa.



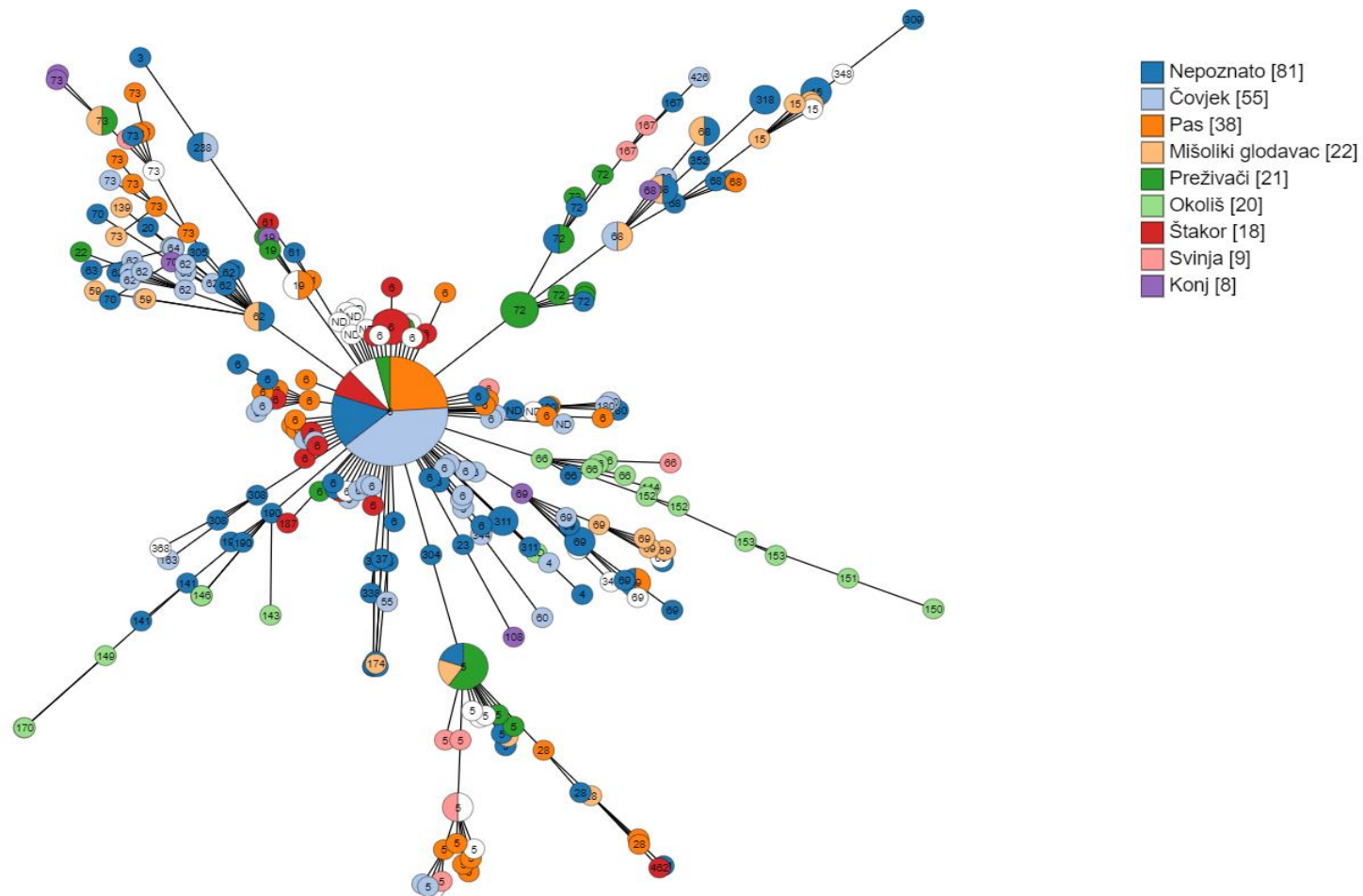
Slika 28. Minimalno razgranuto stablo svih izolata dostupnih u BIGSDB bazi podataka koji pripadaju genomskoj vrsti *L. kirschneri*.

Prikazane su klonalne grupe (naznačene unutar krugova) izolata. Bojama su označeni različiti izvori. Krugovi većih promjera obuhvaćaju veći broj izolata u usporedbi s manjima. Linije koje povezuju čvorove označavaju genetske veze između različitih klonalnih gupa.



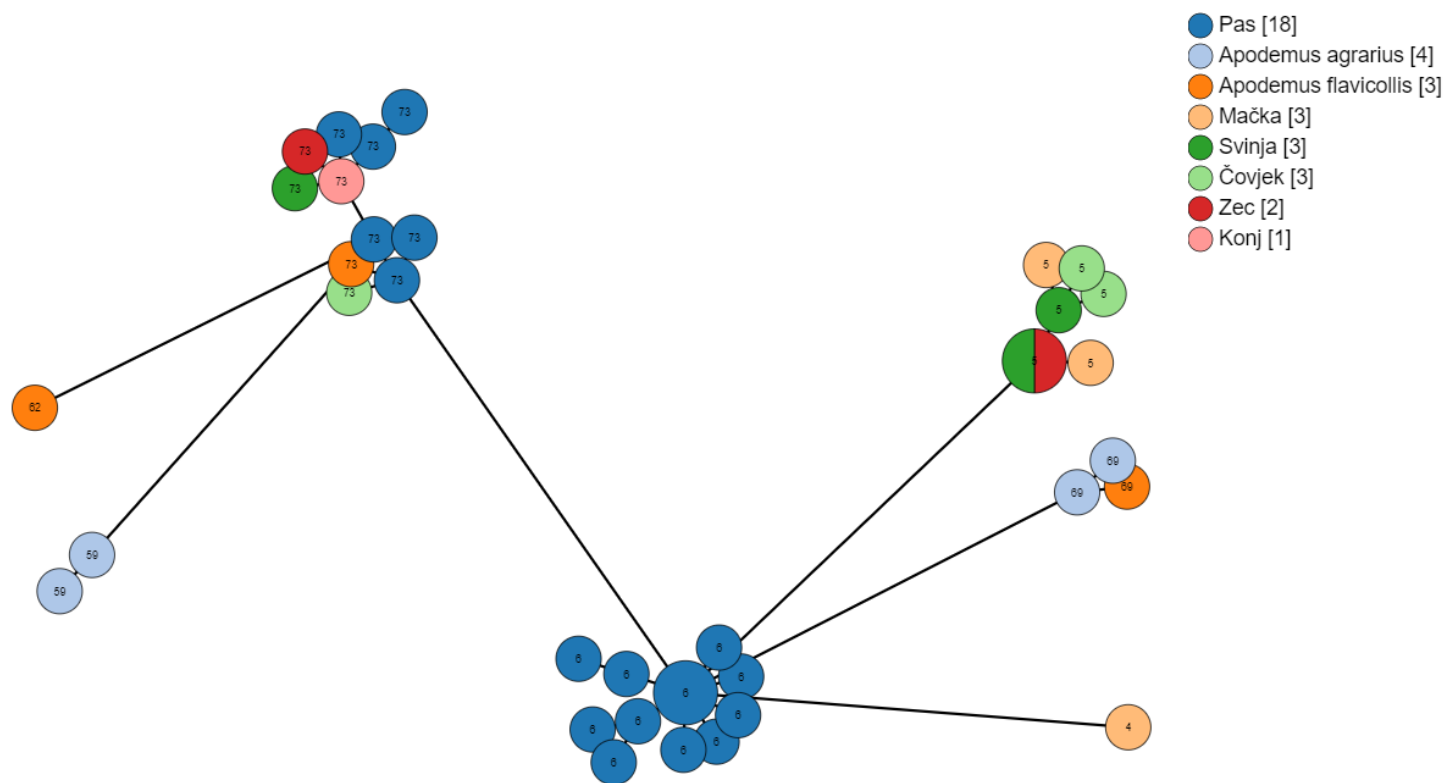
Slika 29. Minimalo razgranuto stablo koje pokazuje geografsku rasprostranjenost klonalnih grupa.

Prikazane su klonalne grupe (naznačene unutar krugova) izolata. Bojama su označena geografska područja. Krugovi većih promjera obuhvaćaju veći broj izolata u usporedbi s manjima. Linije koje povezuju čvorove označavaju genetske veze između različitih klonalnih grupa.



Slika 30. Minimalno razgranuto stablo koje pokazuje međudnose izolata koji pripadaju različitim klonalnim grupama, a koji su izdvojeni s područja Europe.

Prikazane su klonalne grupe (naznačene unutar krugova) izolata. Bojama su označeni različiti izvori. Krugovi većih promjera obuhvaćaju veći broj izolata u usporedbi s manjima. Linije koje povezuju čvorove označavaju genetske veze između različitih klonalnih grupa.



Slika 31. Minimalo razgranuto stablo svih izolata s područja Republike Hrvatske dostupnih u BIGSDB bazi podataka.

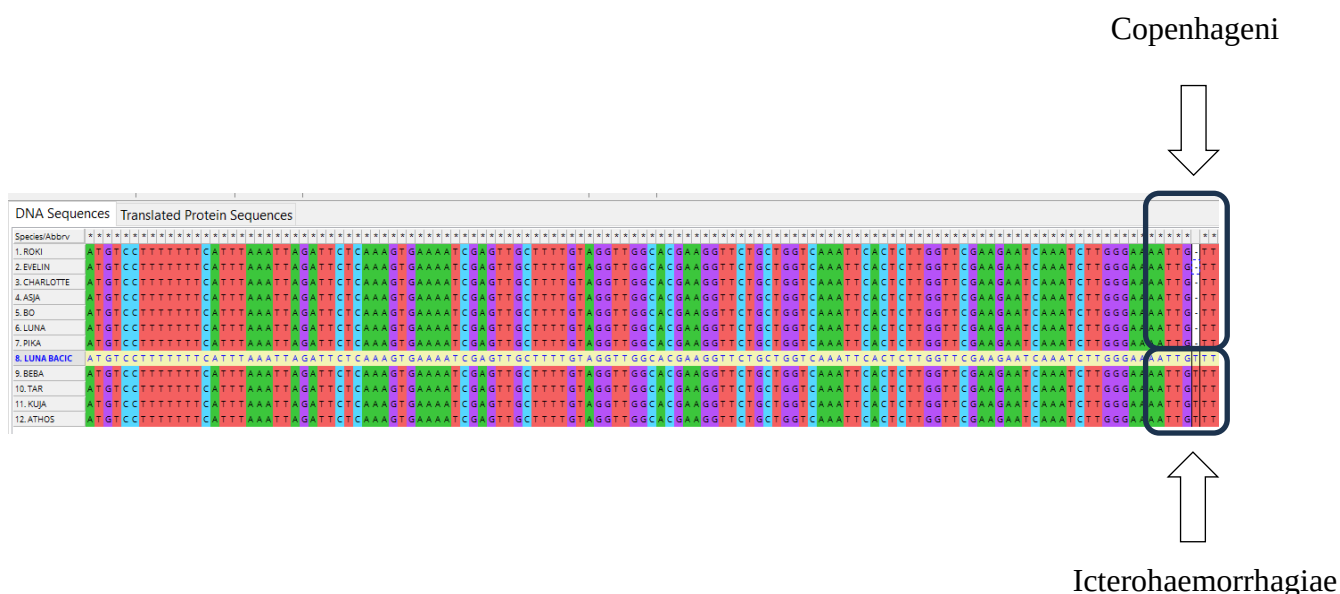
Prikazane su klonalne grupe (naznačene unutar krugova) izolata. Bojama su označeni različiti izvori. Krugovi većih promjera obuhvaćaju veći broj izolata u usporedbi s manjima. Linije koje povezuju čvorove označavaju genetske veze između različitih klonalnih grupa.

5.5.4. Usporedna analiza i razlikovanje serovara Mozdok i Pomona

Sekvenciranjem ključnih regija genoma nije moguće nedvosmisleno odrediti pripadnost izolata serovarima Mozdok i Pomona. Ipak, usporedbom izolata identificiranih kao serovar Mozdok s drugim izolatima iz BIGSdb baze podataka svrstali smo izolate ovog istraživanja u klonalnu grupu 73. Ta klonalna grupa odgovara serovaru Mozdok, serološke skupine Pomona, genomskoj vrsti *L. kirschneri*. S druge strane, izolati koji pripadaju serovaru Pomona, serološke skupine Pomona, genomskoj vrsti *L. interrogans*, pripadaju klonalnoj grupi 5 (Slika 32.).

5.5.5. Usporedna analiza i razlikovanje serovara Copenhageni i Icterohaemorrhagiae

Svakom pretraživanom izolatu koji je determiniran kao genomska vrsta *L. interrogans*, serološka skupina Icterohaemorrhagiae ekstrahiran je *lic12008* gen. *Lic12008*, ukupne veličine 726 bp, odgovoran je za biosintezu lipoplisahardinih ovojnica. Ustanovljeno je da je delecija nukleotidne baze T na 125 bp specifična za serovar Copenhageni (Slika 33.). Analizom navedenog gena, izolati Roki, Evelin, Charlotte, Asja, Bo, Luna i Pika su determinirani kao serovar Copenhageni, a izolati Luna Bačić, Beba, Tar, Kuja i Athos kao serovar Icterohaemorrhagiae.



Slika 33. Slika sekvenci gena *lic12008* u računalnom programu MEGA 11, za svakipretraživani izolat genomske vrste *L. interrogans*.

Prikaz delecije nukleotidne baze T serovara Copenhageni.

5.6. Klinička slika i statistička obrada podataka

Podaci o životinjama, vremenu prijema, kliničkim znakovima, laboratorijskim parametrima i ishodima liječenja iz zapisa ambulantnih protokola bili su dostupni za 16 životinja. Najveći broj pacijenata zaprimljen je tijekom ljeta (43,75%) i jeseni (43,75%). Unutar pretraživane populacije, 62,5% životinja bilo je križane pasmine, dok je preostalih 37,5% pripadalo čistokrvnim pasminama, predstavljenim s ukupno četiri različite pasmine. Oba spola bila su podjednako zastupljena ($M=43,75\%$; $\check{Z}=56,25\%$). Raspon dobi kretao se između 2 mjeseca i 11 godina (medijan=36 mjeseci), a tjelesna masa između 1,5 do 39,5 kg (medijan=17,85).

Ukoliko se pretraživana populacija podijeli na osnovu medijana mase i dobi, analiza vjerojatnosti preživljavanja nije pokazala statističku značajnost za dob životinje ($p=0,074$, $CI=0.9756-1.008$) iako su mlađe životinje češće bile povezane sa smrtnim ishodom. Nasuprot tome, utvrđena je statistički značajna razlika ako se u obzir uzmu podatci o tjelesnoj težini. Životinje manje tjelesne težine imale su nižu stopu preživljavanja od onih veće tjelesne težine ($p=0,004$, $CI=0.8542-0.9785$). Utvrđeno je da kako se tjelesna masa povećava za 1kg, rizik od smrtnog ishoda se smanjuje za faktor 0,9. Uzimajući u obzir dob i težinu u odnosu na genomsku vrstu leptospire koja je uzrokovala bolest utvrđeno je da su mlađe i lakše životinje bile češće inficirane *L. interrogans* (7/8), dok je u starijih i težih životinja udio infekcija genomskim vrstama *L. kirschneri* (4/8) i *L. interrogans* (4/8) bio podjednak.

Analiza je potvrdila i pozitivan utjecaj cijepljenja na preživljavanje. Sveukupno unutar pretraživane populacije samo su četiri životinje bile cijepljene i kod ove skupine životinja zabilježeno je samo jedno uginuće. Nasuprot, od 12 necijepljenih životinja uginulo je njih 10 ($p=0,04$). Među cijepljenim životinjama zabilježena je infekcija genomskom vrstom *L. interrogans* serovarom Copenhageni kod jedne životinje ($n=1$), dok su preostali bili inficirani *L. kirschneri* ($n=3$), odnosno serovarom Mozdok ($n=2$).

Klinička očitovanja bila su vrlo raznolika. Samo je jedan uzorak pojavnosti kliničkih očitovanja bio prisutan u dvije životinje, dok su ostale imale jedinstven uzorak pretraživanih parametara. Pozitivan ishod bolesti zabilježen je u svega 31,25% populacije, dok je kod preostalih 68,75% zabilježeno uginuće. Kod najvećeg broja životinja utvrđeno je oštećenje jetre (13/16, 81,25%), dok su klinički znakovi povraćanja i proljeva kao i oštećenje bubrega stupnja III i IV bili prisutni u 68,75% (11/16, $CI=0,537 - 0,950$) slučajeva. Prevalencija plućnog hemoragijskog sindroma bila je također vrlo visoka i iznosila je 43,75% (7/16, $CI=0,208 - 0,694$). Anemija i leukocitoza utvrđena je u 63% životinja. Oštećenje tri organska sustava bilo

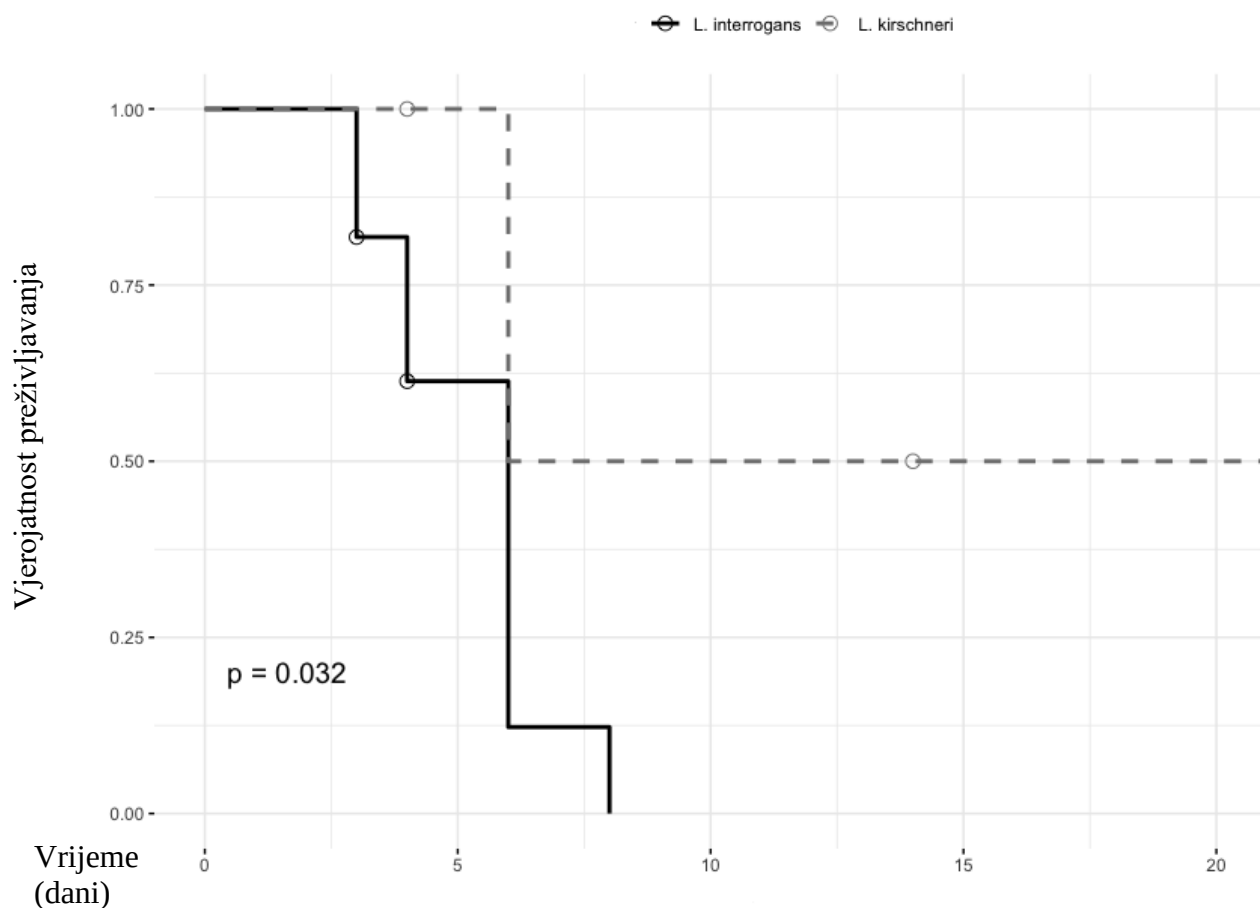
je prisutno u 18,75% životinja, dok u 6,25% slučajja (n=1) nije zabilježeno oštećenje niti jednog organskog sustava (kako je definirano ovim istraživanjem). Povezanost organskog oštećenja s letalnim ishodom bila je statistička značajna samo za životinje s kliničkim znakovim povraćanja i proljeva ($p=0,01$, CI=0,9688 – 61,8) te oštećenjem bubrega stupnja III i IV ($p=0,02$, CI=0,917 – 58,79).

Zabilježena klinička očitovanja i ishodi liječenja u odnosu na genomsku vrstu, serološku skupinu te serovar prikazani su u Tablici 11. Statističkim metodama nije utvrđena statistički značajna povezanost određenih kliničkih očitovanja s pojedinim genomskim vrstama, klonalnim grupama i serovarima, što je vjerojatno posljedica relativno malog uzorka (broja pacijenta) i velikog broja promatranih varijabli. Ipak deskriptivna analiza upućuje na određenu povezanost između utvrđenih serotipova/genotipova i oštećenja pojedinih organskih sustava.

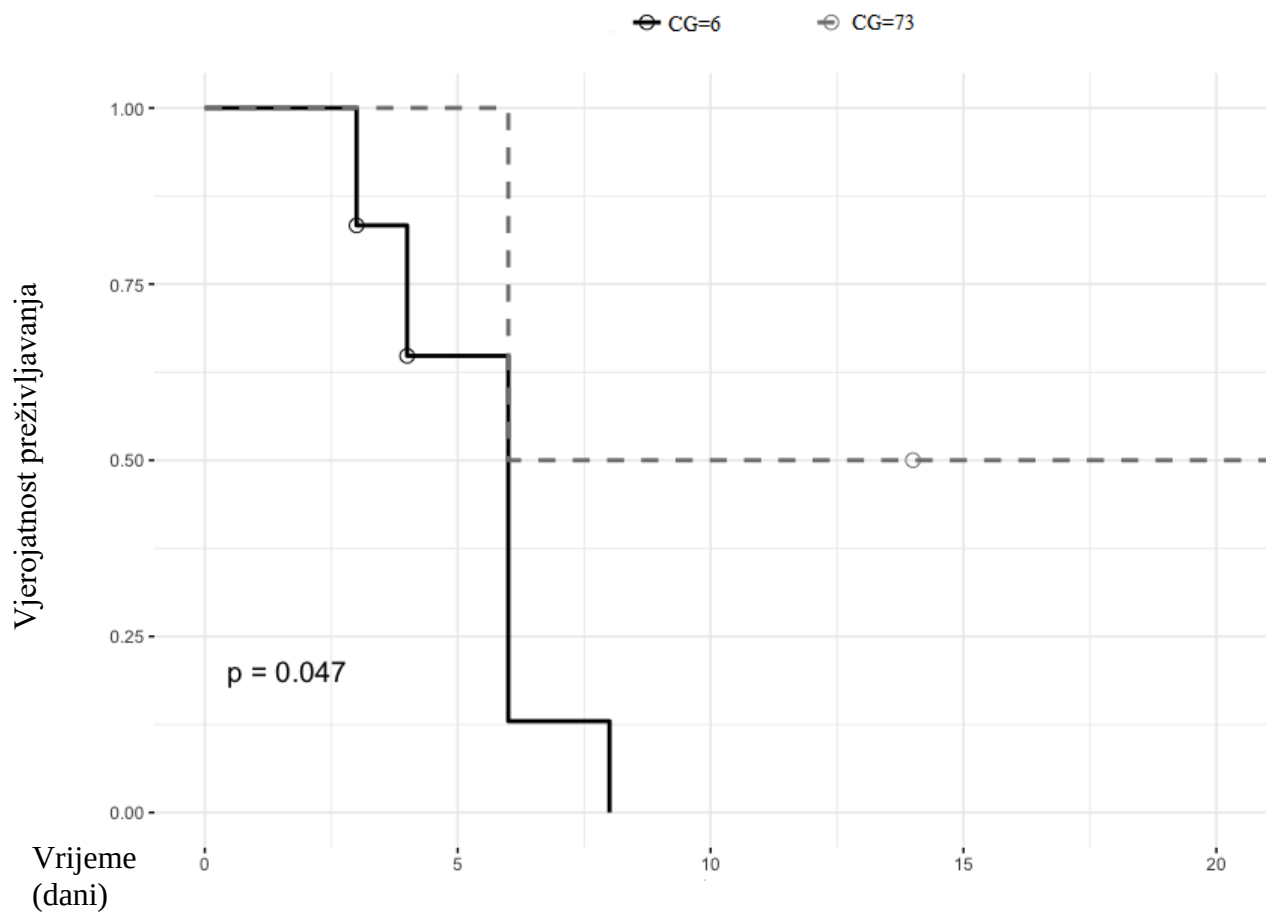
Tablica 11. Prikaz kliničkih očitovanja pretraživane populacije pasa u odnosu na genomsku vrstu, klonalnu grupu i serovar

	Genomska vrsta		Klonalna grupa		Serovar		
	<i>L. interrogans</i>	<i>L. kirschneri</i>	CG=6	CG=73	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Mozdok
Broj životinja (n)	11	5	12	4	4	7	4
Povraćanje/Proljev	9 (82%)	2 (40%)	9 (75%)	2 (50%)	4 (100%)	5 (71%)	2 (50%)
Bubrezi	9 (82%)	2 (40%)	9 (75%)	2 (50%)	3 (75%)	6 (86%)	2 (50%)
Jetra	9 (82%)	4 (80%)	9 (75%)	4 (100%)	4 (100%)	5 (71%)	4 (100%)
Ikterus	8 (73%)	3 (60%)	8 (67%)	3 (75%)	3 (75%)	5 (71%)	3 (75%)
LPHS	5 (45%)	2 (40%)	5 (42%)	2 (50%)	1 (25%)	4 (57%)	2 (50%)
Anemija	7 (64%)	3 (60%)	7 (58%)	3 (75%)	4 (100%)	3 (43%)	3 (75%)
Leukocitoza	7 (64%)	3 (60%)	7 (58%)	3 (75%)	2 (50%)	5 (71%)	3 (75%)
Uginuće	9 (82%)	2 (40%)	9 (75%)	2 (50%)	3 (75%)	6 (86%)	2 (50%)

Statističkim analizama dokazano je da su genomska vrsta, serološka skupina i dobivena klonalna grupa utjecali na vrijeme i ishod bolesti. Životinje inficirane *L. interrogans* imale su 4x veći relativni rizik od smrtnog ishoda ($p=0,032$, $CI=0,868 - 19,4$), dok su životinje inficirane klonalnom grupom 6, odnosno serološkom skupinom Icterohaemorrhagiae imale 3,8x veći relativni rizik od smrtnog ishoda ($p=0,047$ $CI=0,79 - 18,07$) (Slika 34. i 35.).

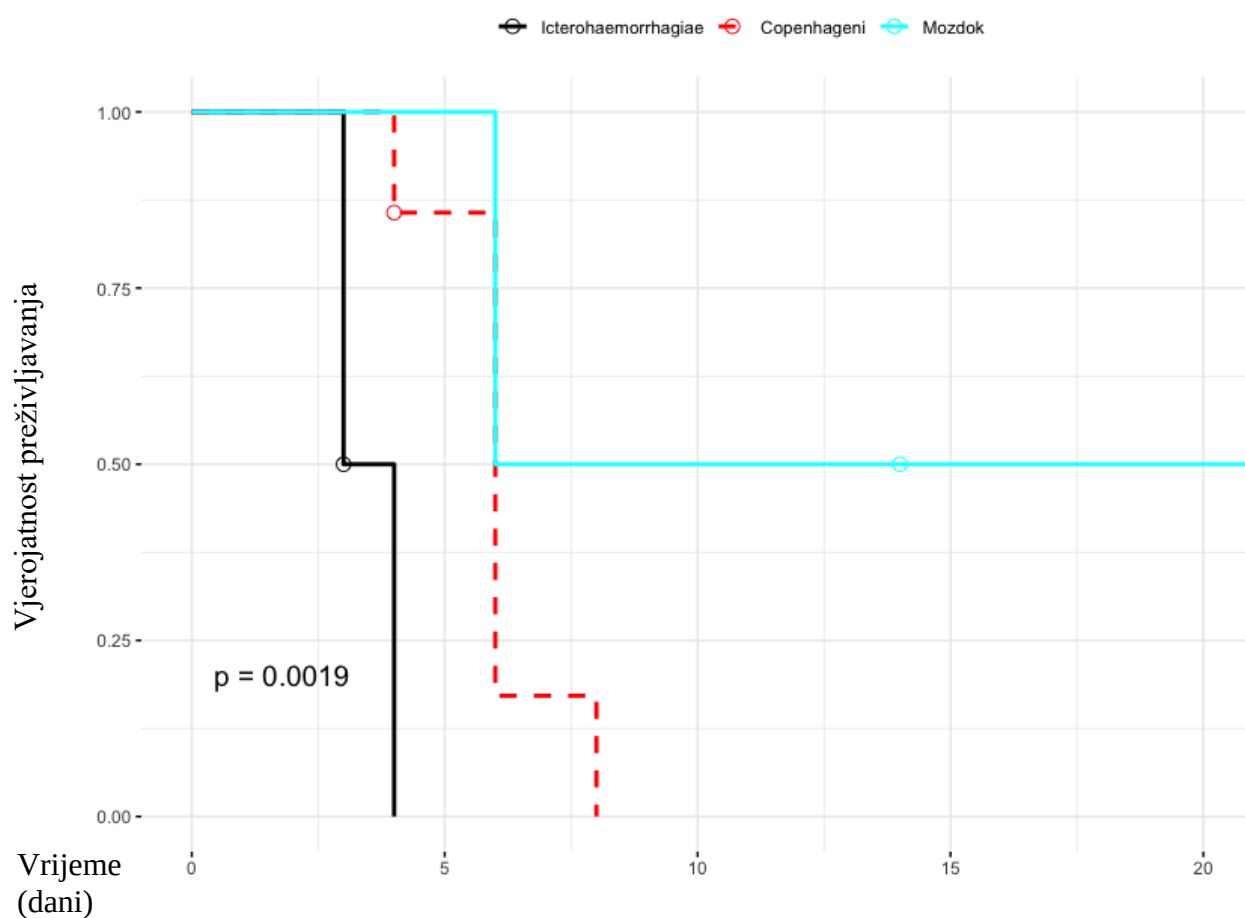


Slika 34. Grafički prikaz vjerojatnosti preživljavanja pretraživane populacije u odnosu na genomsku vrstu.



Slika 35. Grafički prikaz vjerojatnosti preživljavanja pretraživane populacije u odnosu na klonalnu grupu.

Serovar je također bio statistički značajno povezan s ishodom, odnosno stopom smrtnosti ($p=0,0019$, $CI=0,004867-0,6082$). Relativni rizik od uginuća za životinje inficirane serovarom Copenhageni iznosio je 5,4% od rizika u skupini životinja inficiranih serovarom Icterohaemorrhagiae ($p=0,02$, $CI=0,5\%-60\%$), dok je rizik od uginuća za životinje inficirane serovarom Mozdok bio 1,7% od rizika u životinja inficiranih serovarom Icterohaemorrhagiae ($p=0,004$, $CI=0,1\%-27,3\%$). Na slici 36. je jasno vidljivo da infekcija serovarom Icterohaemorrhagiae vremenski brže dovodi do uginuća što nam govori da je i relativni rizik veći u odnosu na druge serovare.



Slika 36. Grafički prikaz vjerojatnosti preživljavanja pretraživane populacije u odnosu na serovar.

6. RASPRAVA

Unatoč njihovoj morfološkoj sličnosti, bakterije iz roda *Leptospira* pokazuju značajnu fenotipsku i genetsku raznolikost. Tradicionalno su leptospire klasificirane koristeći serološki klasifikacijski sustav temeljen na njihovim fenotipskim svojstvima i identifikaciji različitih serovarova. S druge strane, molekularni klasifikacijski sustav utvrđuje stupanj genetske povezanosti identificirajući različite genotipove ili vrste (ADLER i DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010.). Ova dva klasifikacijska sustava nisu uvijek u istom međuođnosu, serološki slični sojevi mogu se genetski razlikovati i obrnuto, stvarajući složenu taksonomsku razdiobu (CERQUEIRA i PICARDEAU, 2009.). Nedostatak korelacije između serološke i molekularne klasifikacije predstavlja značajne poteškoće u točnom tipiziranju leptospira te može dovesti do pogrešne identifikacije, otežavajući epidemiološka istraživanja i razvoj ciljanih dijagnostičkih metoda.

U ovom istraživanju za tipizaciju sojeva koji su uzrokovali kliničko očitovanje bolesti u pasa koristile su se serološke i konvencionalne molekularne metode tipizacije kao i molekularne metode novije generacije s većom razlučivosti. Dvije primarne metode za određivanje genomske vrste *Leptospira* su sekvenciranje *secY* gena i ribosomalna multigenetska tipizacija (rMLST). Sekvenciranje *secY* gena idealno je za početnu identifikaciju vrsta zbog svoje specifičnosti, dok rMLST pruža veću razlučivost. Gen *secY* kodira preproteinsku translokazu koja prenosi proteine preko unutarnje membrane bakterija i koristi se zbog svoje genetske varijabilnosti i visoke specifičnosti (MOREY i sur., 2006.). Metodologija za amplifikaciju i sekvenciranje *secY* gena dobro je uspostavljena, financijski nezahtjevna i pogodna za rutinsku dijagnostiku (AHMED i sur., 2009.). Međutim, kao metoda jednog lokusa, sekvenciranje *secY* gena ne odražava cjelokupnu genetsku varijabilnost prisutnu u cijelom genomu. Ciljanjem više ribosomskih lokusa, rMLST obuhvaća širi spektar genetske raznolikosti, poboljšavajući točnost filogenetskih analiza (JOLLEY i sur., 2012.; BOURHY i sur., 2014.). Ova metoda je standardizirana i široko prihvaćena u epidemiološkim istraživanjima svih bakterijska vrsta, ali zahtijeva opsežnije sekvenciranje i bioinformatičke resurse (AHMED i sur., 2009.). U ovom istraživanju uspoređene su metode određivanja genomske vrste pomoću *secY* gena i rMLST lokusa, pri čemu je utvrđena ista razlučivost, a u pretraživanoj populaciji pasa utvrđene su dvije genomske vrste, *L. interrogans* i *L. kirschneri*. Ovi rezultati podupiru pretpostavku da upravo ove dvije genomske vrste najčešće, ali ne i isključivo, uzrokuju bolest u pasa (ELLIS, 2010.).

Tipiziranje na osnovi multilokusnih sekvenci (MLST) pokazalo se kao učinkovit alat za proučavanje genetske raznolikosti i epidemiologije vrsta roda *Leptospira*. Razvijene su tri MLST sheme, svaka sa svojim specifičnim ciljevima. Dok je jedna omogućila visoku razlučivost za razlikovanje sojeva (AHMED i sur., 2006.), druga je unaprijedila praćenje epidemiologije za ciljanu genomsku vrstu (BOONSILP i sur., 2013.). Kako bi se postigla ravnoteža između jednostavnosti i isplativosti, a sa istom razlučivosti, razvijena je i shema na manjem broju gena (VARNI i sur., 2014.). Različite MLST sheme pokazale su različite razine diskriminatorne moći. Ističe se važnost odabira odgovarajućih lokusa za MLST kako bi se osigurala visoka rezolucija tipizacije i učinkovito praćenje raznolikosti unutar roda *Leptospira* koje bi potom bilo iskoristivo u epidemiološkim istraživanjima. Primjenom tzv. 6L MLST sheme koja obuhvaća četiri održavateljska i dva promjenjiva gena (*adk*, *icdA*, *lipL32*, *lipL41*, *rrs2* i *secY*) analizirali smo polimorfna mjesta različitih lokusa pretraživanih izolata. Zamijećene su značajne razlike u odnosu na prethodna istraživanja gdje su najveću varijabilnost pokazivali geni *icdA* i geni koji kodiraju lipopolisaharide vanjske ovojnice (THAIPADUNGPANIT i sur., 2011.). U ovom istraživanju značajna varijabilnost u broju alela i polimorfni mjesta utvrđena je u *adk* i *secY* gena. Dodatno, filogenetskom analizom prikazanom kao matrica identičnosti nije utvrđena 100%-tna podudarnost svih pretraživanih izolata koji pripadaju istoj genomskoj vrsti i istom serovaru. Utvrđena raznolikost unutar iste genomske vrste i serovara može se objasniti prirodnim mutacijama koje se događaju tijekom vremena, a koje se očituju razlikama u sekvencama gena koji se analiziraju (AHMED i sur., 2012.). Osim toga, kao i mnoge druge bakterije, leptospire imaju mehanizme koji im omogućuju horizontalan prijenos gena. Ovaj proces može dovesti do genetske raznolikosti među izolatima iste vrste i serovara (ADLER i DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010.). Također, obzirom da MLST metoda obuhvaća samo nekoliko gena, velika je mogućnost da se njenom uporabom neće utvrditi sve varijacije prisutne u genomu. Varijabilnosti u rezultatima mogu biti i posljedica razlika u laboratorijskim uvjetima i metodama ekstrakcije DNK, amplifikacije i sekvenciranja (LEVETT, 2001.).

Filogenijskim analizama mega nukleotidnih sljedova, izolati izdvojeni iz pasa s područja Hrvatske uspješno su razvrstani u odgovarajuće serološke skupine i genomske vrste, a unošenjem sekvenci u PubMLST bazu podataka određeni su njihovi MLST tipovi. Provedena komparativna analiza otkrila je da iako ova MLST shema pruža određeni uvid u raznolikost roda, kombiniranje više lokusa i uzimanje u obzir raznolikosti polimorfni mjesta moglo bi povećati pouzdanost i primjenjivost ove metode.

Vrlo slične rezultate dobili su i drugi autori koji su istraživali primjenu nekih drugih konvencionalnih MLST shema. Zajednički zaključak je da ova metoda pruža vrijedne uvide u genetski sastav patogena i njihove epidemiološke odnose, ali još uvijek postoje određena ograničenja u njenoj razlučivosti (AHMED i sur., 2011.). Razvojem novih tehnologija (npr. sekvenciranja nove generacije) postaju dostupni novi alati i metode koje bi mogli nuditi bolji uvid u heterogenost unutar roda *Leptospira*. Krajnji cilj bio bi razviti metodu koja bi omogućavala sveobuhvatan pristup u identifikaciji različitih serovara i genotipova, ali i razumijevanju njihovih patogenih mehanizama. Sekvenciranje ključnih regija genoma (cgMLST) koje uključuje značajno veći broj lokusa, njih 545, razvija se upravo u tu svrhu (GUGLIEMINI i sur., 2019., CAIMI i sur., 2020.). Uporaba ove metode doprinijela je razumijevanju bioraznolikosti pretraživanih izolata prepoznajući, s visokom razlučivosti, različite tipove sekvence i klonalne grupe. U pojedinim slučajevima utvrdila je i razlike između pojedinih serovara. Svaka jedinstvena kombinacija alela tvori poseban tip sekvence. Budući da izolati moraju biti identični u svojim alelnim profilima kako bi dijelili isti ST, cgMLST može rezultirati velikim brojem različitih ST-ova, što otežava analizu podataka. Upravo su različiti ST-ovi, za svaki pojedini izolat, i rezultati ovog istraživanja. Zanimljivo je za primjetiti da nisu bili identični čak ni izolati koji su izdvojeni iz različitog kliničkog materijala (krv i urin), ali iz iste životinje.

Velika prednost cgMLST-a je mogućnost usporedbe izolata s postojećim izolatima upisanim u BIGSdb bazu podataka. BIGSdb kojeg vodi Institut Pasteur, Francuska služi kao sveobuhvatna platforma za upravljanje i analizu sekvenci genoma *Leptospira*. Ova platforma olakšava dijeljenje podataka, pružajući standardizirane sheme tipizacije poput cgMLST i MLST za dosljedne i usporedive analize. Korisnički pristupačno sučelje, napredni analitički alati i integracija genetskih podataka s metapodacima povećavaju uporabljivost baze podataka u epidemiološkim istraživanjima. Međutim, trenutna ograničenja uključuju relativno mali broj izolata, potencijalne pristranosti u prijavi podataka, ovisnost o kvaliteti sekvenciranja i potrebu za značajnim računalnim resursima. Unatoč tim izazovima, BIGSdb ostaje vrijedno sredstvo za unapređenje razumijevanja genetike i epidemiologije *Leptospira*, s očekivanjem da će njegova primjenjivost rasti s unosom većeg broja podataka. Korištenjem ove baze podataka, pretraživani izolati uspješno su grupirani u klonalne grupe. Iako se klonalne grupe ne podudaraju u potpunosti sa serovarima, njihovim određivanjem mogli smo razlikovati usko povezane serovare koji pripadaju različitim genomskim vrstama, kao što su primjerice Mozdok i Pomona. Međutim, mora se naglasiti da su klonalne grupe široke klasifikacijske kategorije koje imaju

ograničenu upotrebu u epidemiološkim istraživanjama, što ilustrira široka geografska distribucija izolata koji pripadaju pojedinim klonalnim grupama. Iako je potpuno jasno da niti jedna molekularna metoda nije namjenjena serološkoj klasifikaciji, idealna metoda za klasifikaciju *Leptospira* bila bi ona koja bi mogla spojiti oba klasifikacijska sustava. Iako postoji poveznica između cgMLST tipizacije i serološke klasifikacije, jer se sojevi koji pripadaju istom serovaru i istoj genomskoj vrsti obično grupiraju zajedno, ta poveznica nije potpuna. Naime, izolati koji pripadaju istoj klonalnoj grupi utvrđenoj cgMLST-om pripadaju i istoj serološkoj skupini (GUGLIEMINI i sur., 2019.). Veću „serološku“ razlučivost postižemo samo zbog toga što istovremeno određujemo i genomsku vrstu, pa se pretraživani izolati grupiraju uz one serovare iz baze koji pripadaju toj genomskoj vrsti. Sposobnost razlikovanja između različitih seroloških skupina pomaže i u razumijevanju distribucije i prevalencije *Leptospira* na različitim geografskim područjima i domaćinima (LEVETT, 2001). Međutim veliki nedostatak ove metode je potreba za živim kulturama leptospira te nemogućnost točnog određivanja serovara. Ovo ograničenje je značajno u epidemiološkim kontekstima gdje je precizna identifikacija serovara bitna za praćenje puteva prijenosa i provođenje ciljnih mjera kontrole (ADLER i DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010.). Unatoč navedenim nedostacima, cgMLST-a pokazao se iznimno korisnim u identifikaciji potencijalnog izvora infekcije i analizi geografske distribucije određenih klonalnih grupa. Kao što je već prethodno naglašeno, limitirajući čimbenik, sobito za ovaj dio analize, je relativno mali broj pretraženih izolata koji se mogu koristiti za usporedbu.

U ovom istraživanju utvrđeno je da pretraživani izolati pripadaju klonalnim grupama 6 i 73 koje pak odgovaraju serološkim skupinama Icterohaemorrhagiae i Pomona. Serološka istraživanja leptospiroze u pasa u Europi upućuju na široku rasprostranjenost i visoku prevalenciju infekcija u pasa uzrokovanih upravo ovim serološkim skupinama (ARENT i sur., 2012., MAJOR i sur., 2014., KNÖPFLE i sur., 2017., LOPEZ i sur., 2019.). Serološka skupina Icterohaemorrhagiae s najvećom se učestalošću javlja u urbanim područjima, a glavni rezervoari većine serovara iz ove serološke skupine su štakori (SCHULLER i sur., 2015.). Serološka skupina Icterohaemorrhagiae trenutno obuhvaća 16 serovara, od kojih su najzastupljenija dva, usko vezana serovara, Icterohaemorrhagiae i Copenhageni (BOEY i sur., 2019.). Arent i sur. u populaciji domaćih, divljih životinja i ljudi u Ujedinjenom Kraljevstvu, utvrdili su vrlo visoku prevalenciju infekcija uzrokovanih serovarom Copenhageni (84,2% izolata) (ARENT i sur., 2023.). Iako do sad u Republici Hrvatskoj nije potvrđeno prisustvo ovog serovara rezultati ovog istraživanja ukazuju da je Copenhageni zapravo najučestaliji infektivni serovar u pasa. Od onih

izolata pasa koji pripadaju serološkoj skupini *Icterohaemorrhagiae*, većina je determinirana kao serovar Copenhageni (58,33%), a manji dio kao serovar *Icterohaemorrhagiae* (41,67%). U pretraživanoj skupini utvrđeno je i 35% izolata koji pripadaju serološkoj skupini Pomona. Infekcijama serovarima serološke skupine Pomona na području Europe nije se davalo previše pozornosti (ELLIS, 2010.), iako su pojedine države, primjerice Hrvatska, prijavljivale da je najveći udio zabilježenih infekcija uzrokovan upravo sojevima ove serološke skupine (ŠTRITOF i sur., 2012., HABUŠ i sur., 2020.). U posljednjih nekoliko godina i druge europske države bilježe porast broja infekcija uzrokovanih serološkom skupinom Pomona (KNÖPFLE i sur., 2017., LOPEZ i sur., 2019.), no još uvijek ne postoji konsenzus oko pitanja koji serovari ove serološke skupine zapravo uzrokuju bolest u pasa. Naime, pojedini autori navode da veći broj infekcija uzrokuje serovar Mozdok (RENAUD i sur., 2012.), dok druga istraživanja upućuju na višu seroprevalenciju serovara Altodouro (ARENT i sur., 2013.). Oba navedena serovara u pretraživanim područjima održavaju populacije mišolikih glodavaca. S druge strane, američka istraživanja navode da su infekcije pasa uzrokovane ovom serološkom skupinom najčešće u regijama s ekstenzivnim stočarstvom (WARD i sur., 2002., STOKES i sur., 2007.), što pak upućuje na infekcije serovarom Pomona. Nedostatak velike većine spomenutih istraživanja je korištenje metoda dijagnostika koje ne mogu razlučivati različite serovare unutar iste serološke skupine. Točna identifikacija infektivnih sojeva i podatak o prevalenciji u određenom geografskom području ključni su za razvoj učinkovitih strategija prevencije i kontrole. U Europi bi naponi mogli biti više usmjereni na kontrolu populacija mišolikih glodavaca i štakora, dok bi u Americi strategije mogle uključivati poboljšanje higijenskih uvjeta u ruralnim područjima. Također, razvoj cjepiva koja pokrivaju serovare koji najčešće uzrokuju bolest mogao bi pružiti sveobuhvatniju zaštitu (SCHREIBER i sur., 2021.). Nedostatak učinkovitih cjepiva posebno je izražen u Europi gdje, unatoč opisanoj promjeni u vjerojatnim infektivnim serovarima, niti jedno registrirano cjepivo ne sadrži serovare iz serološke skupine Pomona (BERTASIO i sur., 2020.). Cjepiva koja sadrže najzastupljenije i najvirulentnije sojeve mogla bi smanjiti učestalost teških slučajeva leptospiroze. Iako cjepiva koja bi pokrivala sve serološke skupine prisutne na određenom području nisu dostupna, rezultati ovog istraživanja ipak upućuju na pozitivan utjecaj cijepljenja na preživljavanje. Naime, u ovom istraživanju stopa smrtnosti kod životinje inficirane serovarom Mozdok, serološke skupine Pomona bila je značajno niža unutar skupine cijepljenih životinja.

Leptospiroza u pasa očituje se raznolikim kliničkim pojavnostima, od subkliničkih infekcija do teških septikemijskih oblika bolesti s otkazivanjem bubrega i plućnim hemoragijskim

sindromom, praćenim visokom stopom smrtnosti. Težina kliničkih znakova ovisit će o imunološkom statusu psa, infektivnoj dozi i soju (tipu) bakterije koja je uzrokovala bolest. Iako je u različitim istraživanjima utvrđena dosljednost u pojavi određenih kliničkih znakova, klinička slika leptospiroze ipak može biti vrlo raznolika. Primjerice u ovom istraživanju isti uzorak pojavnosti kliničkih znakova ustanovljen je u samo dvije jedinke. Najčešći opisani klinički znakovi, u početnoj fazi bolesti, uključivali su povišenu tjelesnu temperaturu, letargiju, anoreksiju, povraćanje i proljev. Akutno oštećenje bubrega, praćeno azotemijom i proteinurijom te oštećenje jetre, praćeno povišenjem jetrenih enzima i hiperbilirubinemija bili su dominantni kliničko-patološki nalaz, kao i u većini drugih kliničkih istraživanja (GOLDSTEIN i sur., 2006., SYKES i sur., 2011.). Uz navedeno, tipični laboratorijski nalazi uključivali su i leukocitozu te trombocitopeniju. Zadnjih nekoliko godina, slično kao i u ljudi, i u pasa se bilježi porast pojavnosti leptospiroznog plućnog hemoragijskog sindroma (LPHS) koji je bio prisutan u 43,75% naših pacijenata. LPHS se očitovao akutnim respiratornim distresom, dispnejom i hemoptizom i predstavljao značajan klinički izazov zbog svog brzog napredovanja i visoke stope smrtnosti.

Identifikacija serovara, odnosno sojeva i razumijevanje genetske raznolikosti patogena od iznimne je važnosti obzirom da su određeni serovari skloni uzrokovati teže kliničke oblike od drugih (AHMED i sur., 2012.; THAIPADUNGPANIT i sur., 2011.; LEVETT, 2001.; MATSUNAGA i sur., 2020.). Kako bi utvrdili postoje li poveznice između soja koji je uzrokovao bolest i njenog kliničkog očitovanja određeni su klinički parametri gdje je naglasak stavljen na tri organska sustava (bubrezi, jetra i pluća) i prateće laboratorijske nalaze. U obzir su uzeti i demografski podatci. Dob i težina životinja, koje su većinom u proporcionalnom odnosu, pokazale su se značajnim rizičnim čimbenicima u odnosu na težinu kliničke slike i ishod bolesti. Slične rezultate opisuju i drugi autori koji su istraživali kliničke slike i ishode leptospiroze kod pasa. Prema istraživanju Greene i sur. (2012.), mlađi psi i oni manjeg tjelesnog rasta imali su značajno lošiju prognozu, dok su cijepljeni psi imali veću stopu preživljavanja. Nadalje, Schuller i sur. (2015.) također su utvrdili da je težina psa značajan prognostički čimbenik u predviđanju ishoda bolesti, i da lakši psi imaju veći rizik od smrtnog ishoda. Uzimajući u obzir dob i težinu u odnosu na genomsku vrstu leptospire koja je uzrokovala bolest u ovom je istraživanju utvrđeno da su mlađe i lakše životinje bile češće inficirane *L. interrogans*, dok je u starijih i težih životinja udio infekcija genomskim vrstama *L. kirschneri* i *L. interrogans* bio podjednak. Također, utvrđeno je da su infekcije određenim genomskim vrstama, klonalnim grupama, serološkim skupinama odnosno serovarima povezane sa lošijim

ishodima. Životinje inficirane genomskom vrstom *L. interrogans*, klonalnom grupom 6 odnosno serološkom skupinom Icterohaemorrhagiae imale su značajno veći rizik od smtnog ishoda. Jedinke inficirane serovarom Mozdok imale su značajno nižu stopu smrtnosti od onih inficiranih serovarom Copenhageni ili Icterohaemorrhagiae. Unatoč utvrđenoj povezanosti između soja leptospira i ishoda, u ovom istraživanju nije bilo moguće utvrditi korelaciju između infektivnog soja i određenog kliničkog očitovanja, vjerojatno zbog relativno malog broja promatranih jediniki u odnosu na velik broj kliničkih varijabli. Ostaje za istražiti i da li je prisutnost vrlo ograničenog broja seroloških/genomskih tipova utvrđenih u ovom istraživanju zapravo uvjetovana težinom kliničke slike i činjenicom da se u Sveučilišnu bolnicu zaprimaju uglavnom referalni pacijenti, odnosno oni s najtežim kliničkim oblicima.

Molekularna epidemiologija usredotočena je na razumijevanje genetske raznolikosti i puteve prijenosa patogena. Analizom dobivenih podataka moguće je preciznije pratiti izbijanja bolesti i identificirati izvore infekcije. Ovaj pristup, koji ima za cilj kombinirati rezultate genetske tipizacije s kliničkom prezentacijom i ishodima, unapređuje našu sposobnost razvijanja ciljnih intervencija i strategija kontrole leptospiroze, i u konačnici povećava kvalitetu liječenja. Integrirani pristupi koji uzimaju u obzir upravljanje okolišem, cijepljenje i javnu svijest ključni su za smanjenje incidencije ove zoonotske bolesti (HAAKE i LEVETT, 2015.).

7. ZAKLJUČCI

1. Standardizirane metodologije amplifikacije *secY* gena dostatne su za određivanje limitiranog broja genomskih vrsta na našem geografskom području.

2. Sekvenciranje ključnih regija genoma omogućuje veću diskriminatornu moć u usporedbi s konvencionalnim MLST-om te se pokazalo korisnim za praćenje puteva i proučavanje evolucijskih odnosa među sojevima *Leptospira*. Utvrđena raznolikost tipova sekvence upućuje na visoku razlučivost metode ali trenutno ne omogućava grupiranje izolata na razini koja bi se mogla koristiti za epidemiološke ili kliničke predikcije. Ograničeni broj izolata u BIGSdb bazi podataka naglašava potrebu za njenim proširenjem. Povećanje broja izolata povećat će pouzdanost i primjenjivost cgMLST-a u tipizaciji *Leptospira*.

3. Utvrđeno je da unutar pretraživane populacije najveći broj infekcija kao i najteže kliničke slike praćene lošim ishodom uzrokuje serovar Copenhageni, čije prisustvo je sada prvi puta dokazano u Republici Hrvatskoj. Dobiveni podatci upućuju na potrebu uključivanja ovog serovara u antigene panele koji se koriste u serološkoj dijagnostici leptospiroze.

4. Visoka prevalencija infekcija serovarom Mozdok, serološke skupine Pomona utvrđene tijekom ovog istraživanja ponovno dovodi u pitanje učinkovitost i potrebu za prilagodbom postojećeg cjepiva. Unatoč tome, utvrđena je djelomična zaštita što cijepljenje i dalje čini vrijednim alatom u prevenciji i kontroli leptospiroze u pasa.

5. Ovo istraživanje dokazuje da se genotipizacija i serotipizacija uzročnika može koristiti u predviđanju ishoda bolesti. Infekcije uzrokovane genomskom vrstom *L. interrogans*, serološkom skupinom Icterohaemorrhagiae, klonalnom grupom 6 te serovarom Copenhageni povezani su s lošijim ishodom.

6. Unatoč utvrđenoj povezanosti između soja leptospira i ishoda, u ovom istraživanju nije bilo moguće utvrditi korelaciju između soja koji je uzrokovao infekciju i kliničkog očitovanja, vjerojatno zbog relativno malog broja promatranih jedinki u odnosu na velik broj kliničkih varijabli.

7. Daljnja istraživanja kliničkog očitovanja i ishoda liječenja te povezivanje podataka s određenim genotipovima trebala bi biti provedena na većem broju uzoraka i uključiti izolate iz različitih geografskih područja. Ukoliko bi se tim podacima pridodali i podatci o genotipizaciji izolata izdvojenih iz različitih domaćina, ali s istog geografskog područja omogućilo bi se i sveobuhvatnije razumijevanje genetske raznolikosti i epidemiologije leptospiroze.

8. POPIS LITERATURE

- ABDOEL, T. H., D. J. HOUWERS, A. M. VAN DONGEN, A. A. ADESIYUN, M. JIMÉNEZ-COELLOE, L. CARDOSO, S. M. SUEPAUL, A. ORTEGA-PACHECO, H. L. SMITS (2011): Rapid test for the serodiagnosis of acute canine leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 150, 211–213. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.01.015.
- ACKERMANN, K., R. KENNGOTT, M. SETTLES, H. GERHARDS, J. MAIERL, B. WOLLANKE (2021): In vivo biofilm formation of pathogenic leptospira spp. In the vitreous humor of horses with recurrent uveitis. *Microorganisms* 9, doi: 10.3390/microorganisms9091915.
- ADLER, B., A. DE LA PEÑA MOCTEZUMA (2010): *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 140, 287–296. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.03.012.
- AGAMPODI, S. B., A. C. MORENO, J. M. VINETZ, M. A. MATTHIAS (2013): Short Report: Utility and Limitations of Direct Multi-Locus Sequence Typing on qPCR-Positive Blood to Determine Infecting *Leptospira* Strain. 88, 184–185. doi: 10.4269/ajtmh.2012.12-0526.
- AGERHOLM, J. S., E. M. KLAS, P. DAMBORG, N. BOREL, H. G. PEDERSEN, M. CHRISTOFFERSEN (2021): A Diagnostic Survey of Aborted Equine Fetuses and Stillborn Premature Foals in Denmark. *Front. Vet. Sci.* 8, doi: 10.3389/fvets.2021.740621.
- AHMED, A., M. F. M. ENGELBERTS, K. R. BOER, N. AHMED, R. A. HARTSKEERL (2009): Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. *PLoS One* 4, doi: 10.1371/journal.pone.0007093.
- AHMED, N., S. MANJULATA, D. †1, M. DE LOS Á VALVERDE, P. VIJAYACHARI, R. S. MACHANG’U, W. A. ELLIS, R. A. HARTSKEERL (2006): Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. doi: 10.1186/1476-0711-5.
- ALSTON, J. M., AND BROOM, J. C. (1958): *Leptospirosis in Man and Animals*, Edinburgh, Livingstone. 5

- ALTHEIMER, K., P. JONGWATTANAPISAN, S. LUENGYOSLUECHAKUL, R. PUSOONTHORNTHUM, N. PRAPASARAKUL, A. KURILUNG, E. M. BROENS, J. A. WAGENAAR, M. G. A. GORIS, A. A. AHMED, N. PANTCHEV, S. REESE, K. HARTMANN (2020): Leptospira infection and shedding in dogs in Thailand. BMC Vet. Res. 16, doi: 10.1186/s12917-020-2230-0.
- ALTON, G. D., O. BERKE, R. REID-SMITH, D. OJKIC, D., J. F. PRESCOTT (2009): Increase in seroprevalence of canine leptospirosis and its risk factors, Ontario 1998-2006. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, 73(3), 167–175.
- ANDRÉ-FONTAINE, G. (2006): Canine leptospirosis - Do we have a problem? Vet. Microbiol. 117, 19–24. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.04.005.
- ANDRE-FONTAINE, G., F. AVIAT, C. THORIN (2015): Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic Leptospira spp. in Fresh Water. Curr. Microbiol. 71, 136–142. doi: 10.1007/s00284-015-0836-4.
- ANTUNOVIĆ-MIKAČIĆ, S. (1935): O prvom slučaju Weilove bolesti na našem Primorju (The first case of Weil's disease on our coastal region). Lij. Vjes. 57, 377.
- ARBOUR, J., M. C. BLAIS, L. CARIOTO, D. SYLVESTRE (2012): Clinical leptospirosis in three cats (2001-2009). J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 48, 256–260. doi: 10.5326/JAAHA-MS-5748.
- ARENT, Z. J., C. GILMORE, J. M. SAN-MIGUEL AYANZ, L. Q. NEYRA, F. J. GARCÍA-PENÑA (2017): Molecular Epidemiology of Leptospira Serogroup Pomona Infections Among Wild and Domestic Animals in Spain. Ecohealth 14, 48–57. doi: 10.1007/s10393-017-1210-8.
- ARENT, Z. J., S. ANDREWS, K. ADAMAMA-MORAITOU, C. GILMORE, D. PARDALI, W. A. ELLIS (2013): Emergence of novel Leptospira serovars: A need for adjusting vaccination policies for dogs? Epidemiol. Infect. 141, 1148–1153. doi: 10.1017/S0950268812002087.
- ARENT, Z., C. GILMORE, L. PARDYAK, K. DUBNIEWICZ, B. MCINERNEY, W. ELLIS (2023): The serological and genetic diversity of the Leptospira interrogans

- Icterohaemorrhagiae serogroup circulating in the UK. J. Vet. Res. 67, 529–536. doi: 10.2478/jvetres-2023-0063.
- AZÓCAR-AEDO, L., G. MONTI (2016): Meta-Analyses of Factors Associated with Leptospirosis in Domestic Dogs. Zoonoses Public Health 63, 328–336. doi: 10.1111/zph.12236.
- BABIĆ, I. (1927): Typhus canum u Zagrebu (Typhus canum in Zagreb). Jug. Vet. Glas. 7,21.
- BABUDIERI, B. (1961): Laboratory Diagnosis of Leptospirosis. Bull. Wld. Hlth. Org. 24, 45.
- BARIL, C., J. L. HERMANN, C. RICHAUD, D. MARGARITA, I. SAINT GIRONS (1992): Scattering of the rRNA genes on the physical map of the circular chromosome of *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. J. Bacteriol. 174, 7566-7571.
- BARRAGAN, V., J. CHIRIBOGA, E. MILLER, S. OLIVAS, D. BIRDSELL, C. HEPP, H. HORNSTRA, J. M. SCHUPP, M. MORALES, M. GONZALEZ, S. REYES, C. DE LA CRUZ, P. KEIM, R. HARTSKEERL, G. TRUEBA, T. PEARSON (2016): High *Leptospira* Diversity in Animals and Humans Complicates the Search for Common Reservoirs of Human Disease in Rural Ecuador. PLoS Negl. Trop. Dis. 10, doi: 10.1371/journal.pntd.0004990.
- BARRAGAN, V., S. OLIVAS, P. KEIM, T. PEARSON (2017): Critical knowledge gaps in our understanding of environmental cycling and transmission of *Leptospira* spp. Appl. Environ. Microbiol. 83, doi: 10.1128/AEM.01190-17. American Society for Microbiology.
- BARTHÉLEMY, A., A. VIOLÉ, M. CAMBOURNAC, B. RANNOU, J. M. BONNET-GARIN, J. Y. AYOUB, E. BOSELLI, C. POUZOT-NEVORET, I. GOY-THOLLOT (2020): Hematological and Hemostatic Alterations Associated with a Single Extracorporeal Renal Replacement Therapy in Dogs With Acute Kidney Injury Associated Leptospirosis: A Pilot Study. Top. Companion Anim. Med. 38, doi: 10.1016/j.tcam.2020.100406.
- BERTASIO, C., A. PAPETTI, E. SCALTRITI, S. TAGLIABUE, M. D'INCAU, M. B. BONIOTTI (2020): Serological survey and molecular typing reveal new leptospira serogroup pomona strains among pigs of northern Italy. Pathogens 9, doi: 10.3390/pathogens9050332.

- BIERQUE, E., R. THIBEAUX, D. GIRAULT, M. E. SOUPÉ-GILBERT, C. GOARANT (2020): A systematic review of *Leptospira* in water and soil environments. *PLoS One* 15, doi: 10.1371/journal.pone.0227055.
- BOEY, K., K. SHIOKAWA, S. RAJEEV (2019): *Leptospira* infection in rats: A literature review of global prevalence and distribution. *PloS Negl. Trop. Dis.* 13, doi: 10.1371/journal.pntd.0007499.
- BOLIN, C.A. (1994): Diagnosis of leptospirosis in swine. *J Swine Health Prod.* 2(3):23-24.
- BOONSILP, S., J. THAIPADUNGPANIT, P. AMORNCHAI, V. WUTHIEKANUN, M. S. BAILEY, M. T. G. HOLDEN, C. ZHANG, X. JIANG, N. KOIZUMI, K. TAYLOR, R. GALLOWAY, A. R. HOFFMASTER, S. CRAIG, L. D. SMYTHE, R. A. HARTSKEERL, N. P. DAY, N. CHANTRATITA, E. J. FEIL, D. M. AANENSEN, B. G. SPRATT, S. J. PEACOCK (2013): A Single Multilocus Sequence Typing (MLST) Scheme for Seven Pathogenic *Leptospira* Species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, doi: 10.1371/journal.pntd.0001954.
- BOURHY, P., C. HERRMANN STORCK, R. THEODOSE, C. OLIVE, M. NICOLAS, P. HOCHEDÉZ, I. LAMAURY, F. ZININI, S. BRÉMONT, A. LANDIER, S. CASSADOU, J. ROSINE, M. PICARDEAU (2013): Serovar Diversity of Pathogenic *Leptospira* Circulating in the French West Indies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, doi: 10.1371/journal.pntd.0002114.
- BOURHY, P., I. SAINT GIRONS (2000): Localization of the *Leptospira interrogans* metF gene on the CII secondary chromosome.
- BOURSAUX-EUDE, C., I. SAINT GIRONSL, R. ZUERNER (1995) IS7500, an IS3-like element from *Leptospira interrogans* *Microbiology*. vol 141, 2165-2173
- BRADLEY, E. A., G. LOCKABY (2023): Leptospirosis and the Environment: A Review and Future Directions. *Pathogens* 12, doi: 10.3390/pathogens12091167.
- BRANDES, K., B. WOLLANKE, G. NIEDERMAIER, S. BREM, H. GERHARDS (2007): Recurrent Uveitis in Horses: Vitreal Examinations with Ultrastructural Detection of Leptospire. *J. Vet. Med. A* 54, 270–275.

- BRENNER, D. J., A. F. KAUFMANN, K. R. SULZER, A. G. STEIGERWALT, F. C. ROGERS, R. 5 WEYANT (n.d.) Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* vol 49, 839-858.
- BROWN, P. D., C. GRAVEKAMPS, G. H. CARRINGTONY VAN DE KEMPS, R. A. HARTSKEERLS, C. N. EDWARDS, R. EVERARDP, W. J. TERPSTRA, P. N. LEVETT (1995): Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J. Med. Microbiol.* 43,110-114.
- BULACH, D. M., R. L. ZUERNER, P. WILSON, T. SEEMANN, A. MCGRATH, P. A. CULLEN, J. DAVIS, M. JOHNSON, E. KUCZEK, D. P. ALT, B. PETERSON-BURCH, R. L. COPPEL, J. I. ROOD, J. K. DAVIES, B. ADLER (2006): Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *PNAS.* 103, 14560-14565.
- BUSER, F. C., A. SCHWEIGHAUSER, M. IM HOF-GUT, B. BIGLER, E. MARTI, J. MIRKOVITCH, T. FRANCEY (2019): Evaluation of C-reactive protein and its kinetics as a prognostic indicator in canine leptospirosis. *J. Small Anim. Pract.* 60, 477–485. doi: 10.1111/jsap.13004.
- CAGLIERO, J., S. Y. A. M. VILLANUEVA, M. MATSUI (2018): Leptospirosis pathophysiology: Into the storm of cytokines. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, doi: 10.3389/fcimb.2018.00204. Frontiers Media S.A.
- CAIMI, K., P. RUYBAL, I. De AGROBIOTECNOLOGÍA, M. IABIMO, I. NACIONAL, D. T. AGROPECUARIA, C. NACIONAL, D. I. CIENTÍFICAS (2020): Infection, Genetics and Evolution *Leptospira* spp., a genus in the stage of diversity and genomic data expansion. *Infect. Genet. Evol.* 81, 104241. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104241.
- CAIMI, K., V. VARNI, Y. MELENDEZ, A. KOVAL, B. BRIHUEGA, P. RUYBAL (2012): A combined approach of VNTR and MLST analysis: improving molecular typing of Argentinean isolates of *Leptospira interrogans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 644–651.

- CARLETON, O., N. W. CHARON, P. ALLENDER, S. O'BRIEN² (1979): Helix Handedness of *Leptospira interrogans* as Determined by Scanning Electron Microscopy J. Bacteriol. 137, 1413-1416.
- CASANOVAS-MASSANA, A., A. T. VINCENT, P. BOURHY, V. K. NEELA, F. J. VEYRIER, M. PICARDEAU, E. A. WUNDER (2021): *Leptospira dzianensis* and *leptospira putramalaysiae* are later heterotypic synonyms of *leptospira yasudae* and *leptospira stimsonii*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 71, doi: 10.1099/ijsem.0.004713.
- CASANOVAS-MASSANA, A., C. HAMOND, L. A. SANTOS, D. DE OLIVEIRA, K. P. HACKER, I. BALASSIANO, F. COSTA, M. A. MEDEIROS, M. G. REIS, A. I. KO, E. A. WUNDER (2020): *Leptospira yasudae* sp. Nov. and *Leptospira stimsonii* sp. nov., two new species of the pathogenic group isolated from environmental sources. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 70, 1450–1456. doi: 10.1099/ijsem.0.003480.
- CERQUEIRA, G. M., M. PICARDEAU (2009): A century of *Leptospira* strain typing. Infect. Genet. Evol. 9, 760–768. doi: 10.1016/j.meegid.2009.06.009.
- CHARON, N. W., S. F. GOLDSTEIN, S. M. BLOCK, K. CURCI, J. D. RUBY, J. A. KREILING, R. J. LIMBERGER (1992): Morphology and dynamics of protruding spirochete periplasmic flagella. Journal of Bacteriology. 174, 832–840.
- CHARON, N. W., S. F. GOLDSTEIN (2002): Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: The spirochetes. Annu. Rev. Genet. 36, 47–73. doi: 10.1146/annurev.genet.36.041602.134359.
- CHIANI, Y., P. JACOB, V. VARNI, N. LANDOLT, M. F. SCHMELING, N. PUJATO, K. CAIMI, B. VANASCO (2016): Isolation and clinical sample typing of human leptospirosis cases in Argentina. Infect. Genet. Evol. 37, 245–251. doi: 10.1016/j.meegid.2015.11.033.
- CHOU, L. F., H. Y. YANG, C. C. HUNG, Y. C. TIAN, S. H. HSU, C. W. YANG (2023): Leptospirosis kidney disease: Evolution from acute to chronic kidney disease. Biomed. J. 46, doi: 10.1016/j.bj.2023.100595. Elsevier B.V.
- CHOW, E., J. DEVILLE, J. NALLY, M. LOVETT, K. NIELSEN-SAINES (2012): Prolonged *Leptospira* Urinary Shedding in a 10-Year-Old Girl. Case Rep. Pediatr. 1–3. doi: 10.1155/2012/169013.

- COBURN, J., M. PICARDEAU, C. W. WOODS, T. VELDMAN, D. A. HAAKE (2021): Pathogenesis insights from an ancient and ubiquitous spirochete. *PLoS Pathog.* 17, doi: 10.1371/journal.ppat.1009836.
- COLEMAN, G. A., A. A. DAVÍN, T. A. MAHENDRARAJAH, L. L. SZÁNTHÓ, A. SPANG, P. HUGENHOLTZ, G. J. SZÖLLSI, T. A. WILLIAMS (2021): A rooted phylogeny resolves early bacterial evolution. *Science*. 372, doi: 10.1126/science.abe 0511.
- COOK, C. S. i D. E. HARLING (1983): Equine recurrent uveitis. *Equine Vet. J.* 2, 2–15.
- CORDONIN, C., M. TURPIN, M. BRINGART, J. L. BASCANDS, O. FLORES, K. DELLAGI, P. MAVINGUI, M. ROCHE, P. TORTOSA (2020): Pathogenic *Leptospira* and their animal reservoirs: testing host specificity through experimental infection. *Sci. Rep.* 10, doi: 10.1038/s41598-020-64172-4.
- CRODA, J., A. N. D. NETO, R. A. BRASIL, C. PAGLIARI, A. C. NICODEMO, M. I. S. DUARTE (2010): Leptospirosis pulmonary haemorrhage syndrome is associated with linear deposition of immunoglobulin and complement on the alveolar surface. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 593–599. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02916.x.
- DAVIGNON, G., J. CAGLIERO, L. GUENTAS, E. BIERQUE, P. GENTHON, P. GUNKEL-GRILLON, F. JUILLOT, M. KAINIU, C. LAPORTE-MAGONI, M. PICARDEAU, N. SELMAOUI-FOLCHER, M. E. SOUPÉ-GILBERT, C. TRAMIER, J. VILANOVA, K. WIJESURIYA, R. THIBEAUX, C. GOARANT (2023): Leptospirosis: toward a better understanding of the environmental lifestyle of *Leptospira*. *Front. Water* 5, doi: 10.3389/frwa.2023.1195094. Frontiers Media SA.
- DE AZEVEDO, S. S. (2024 (1. January)): Epidemiology of *Leptospira* sp. Infection: Current Status, Insights and Future Prospects. *Microorganisms* 12, doi: 10.3390/microorganisms12010022. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
- DEL CARLO BERNARDI, F., B. CTENAS, L. F. F. DA SILVA, A. C. NICODEMO, P. H. N. SALDIVA, M. DOLHNIKOFF, T. MAUAD (2012): Immune receptors and adhesion molecules in human pulmonary leptospirosis. *Hum. Pathol.* 43, 1601–1610. doi: 10.1016/j.humpath.2011.11.017.

- DELAUDE, A., S. RODRIGUEZ-CAMPOS, A. DREYFUS, M. J. COUNOTTE, T. FRANCEY, A. SCHWEIGHAUSER, S. LETTRY, S. SCHULLER (2017): Canine leptospirosis in Switzerland—A prospective cross-sectional study examining seroprevalence, risk factors and urinary shedding of pathogenic leptospires. *Prev. Vet. Med.* 141, 48–60. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.04.008.
- DI AZEVEDO, M. I. N., W. LILENBAUM (2021 (1. May)): An overview on the molecular diagnosis of animal leptospirosis. *Lett. Appl. Microbiol.* 72, 496–508. doi: 10.1111/lam.13442. John Wiley and Sons Inc.
- DIKKEN, H., E. KMETY (1978): Serological typing methods of leptospires. In: *Methods in Microbiology* (Bergan T. and Norris J. R eds. Vol. 11), New York: Academic Press, 259–307.
- DIRIENZO, J. M., R. A. MACLEOD (1978): Composition of the Fractions Separated by Polyacrylamide Gel Electrophoresis of the Lipopolysaccharide of a Marine Bacterium *J. Bacteriol.* 158–167.
- DIVERS, T. J., Y. F. CHANG, N. L. IRBY, J. L. SMITH, C. N. CARTER (2019): Leptospirosis: An important infectious disease in North American horses. *Equine Vet. J.* 51, 287–292. doi: 10.1111/evj.13069. Equine Veterinary Journal Ltd.
- ELLINGHAUSEN, H. C., W. G. MCCULLOUGH (1965): Nutrition of *Leptospira Pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am. J. Vet. Res.* 26, 45–51.
- ELLIS, W. A. (1995): International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira*: Minutes of the Meetings, Prague, Czech Republic. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 872–874.
- ELLIS, W. A. (2010): Control of canine leptospirosis in Europe: Time for a change? *Vet. Rec.* 167, 602–605. doi: 10.1136/vr.c4965.
- ELLIS, W. A. (2015): Animal Leptospirosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 387, 99–137. DOI: 10.1007/978-3-662-45059-8_6.

- ELLIS, W. A., J. J. O'BRIEN, J. A. CASSELLS, J. MONTGOMERY (1983): Leptospiral infection in horses in Northern Ireland: Serological and microbiological findings. *Equine Vet. J.* 15, 317–320. doi: 10.1111/j.2042-3306.1983.tb01809.x.
- ERICKSON, M.C., M. Y. HABTESELASSIE, J. LIAO, C. C. WEBB, V. MANTRIPRAGADA, L. E. DAVEY, M. P. DOYLE (2014): Examination of Factors for Use as Potential Predictors of Human Enteric Pathogen Survival in Soil. *J. Appl. Microbiol.* 116, 335–349.
- FABER, N. A., † Melissa CRAWFORD, R. B. LEFEBVRE, N. C. BUYUKMIHCI, J. E. MADIGAN, N. H. WILLITS (2000): Detection of *Leptospira* spp. in the Aqueous Humor of Horses with Naturally Acquired Recurrent Uveitis. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2731–2733.
- FAINE, S., B. ADLER, C. BOLIN, P. PÉROLAT (1999): *Leptospira* and Leptospirosis, Second Edition, MediSci, Melbourne, Australia.
- FÁVERO, J. F., H. L. DE ARAÚJO, W. LILENBAUM, G. MACHADO, A. A. TONIN, M. D. BALDISSERA, L. M. STEFANI, A. S. DA SILVA (2017): Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. *Microb. Pathog.* 107, 149–154. doi: 10.1016/j.micpath.2017.03.032.
- FERNANDES, L. G. V., N. E. STONE, C. C. ROE, M. G. A. GORIS, H. VAN DER LINDEN, J. W. SAHL, D. M. WAGNER, J. E. NALLY (2022): *Leptospira sanjuanensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from soil in Puerto Rico. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 72, doi: 10.1099/IJSEM.0.005560.
- FERNANDES, L. G., G. H. SIQUEIRA, A. R. F. TEIXEIRA, L. P. SILVA, J. M. FIGUEREDO, M. R. COSATE, M. L. VIEIRA, A. L. T. O. NASCIMENTO (2016): *Leptospira* spp.: Novel insights into host–pathogen interactions. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 176, 50–57. doi: 10.1016/J.VETIMM.2015.12.004.
- FERREIRA, A. S., A. AHMED, T. ROCHA, M. L. VIEIRA, M. das N. PAIVA-CARDOSO, J. R. MESQUITA, H. VAN DER LINDEN, M. GORIS, G. THOMPSON, R. A. HARTSKEERL, J. INÁCIO (2020): Genetic diversity of pathogenic leptospires from wild, domestic and captive host species in Portugal. *Transbound. Emerg. Dis.* 67, 852–864. doi: 10.1111/tbed.13409.

- FOUTS, D. E., M. A. MATTHIAS, H. ADHIKARLA, B. ADLER, L. AMORIM-SANTOS, D. E. BERG, D. BULACH, A. BUSCHIAZZO, Y. F. CHANG, R. L. GALLOWAY, D. A. HAAKE, D. H. HAFT, R. HARTSKEERL, A. I. KO, P. N. LEVETT, J. MATSUNAGA, A. E. MECHALY, J. M. MONK, A. L. T. NASCIMENTO, K. E. NELSON, B. PALSSON, S. J. PEACOCK, M. PICARDEAU, J. N. RICALDI, J. THAIPANDUNGPANIT, E. A. WUNDER, X. F. YANG, J. J. ZHANG, J. M. VINETZ (2016): What Makes a Bacterial Species Pathogenic?:Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. PLoS Negl. Trop. Dis. 10, doi: 10.1371/journal.pntd.0004403.
- FRAGA, T. R., L. ISAAC, A. S. BARBOSA (2016): Complement evasion by pathogenic *Leptospira*. Front. Immunol. 7, doi: 10.3389/fimmu.2016.00623. Frontiers Media S.A.
- GALLOWAY, R. L., P.N. LEVETT (2008): Evaluation of a modified pulsed-field gel electrophoresis approach for the identification of *Leptospira* serovars. The American journal of tropical medicine and hygiene. 68, 628–632.
- GAUTAM, R., C. C. WU, L. F. GUPTILL, A. POTTER, G. E. MOORE (2010): Detection of antibodies against *Leptospira* serovars via microscopic agglutination tests in dogs in the United States, 2000-2007. Journal of the American Veterinary Medical Association. 273, 293–298.
- GAY, N., M. E. G. SOUPÉ, C. GOARANT (2014): Though not reservoirs, dogs might transmit leptospira in New Caledonia. Int. J. Environ. Res. Public Health 11, 4316–4325. doi: 10.3390/ijerph110404316.
- GILGER, B. C., E. MALOK, T. STEWART, D. HOROHOV, P. ASHTON, T. SMITH, G. J. JAFFE, J. B. ALLEN (2000): Effect of an intravitreal cyclosporine implant on experimental uveitis in horses. Vet. Imm. 76, 239-255.
- GILGER, B. C., T. M. MICHAU (2004): Equine recurrent uveitis: New methods of management. Vet. Clin. North Am. - Equine Pract. 20, 417–427. doi: 10.1016/j.cveq.2004.04.010.
- GOLDSTEIN, R. E. (2010): Canine Leptospirosis. Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract. 40, 1091–1101. doi: 10.1016/j.cvsm.2010.07.008.
- GOLDSTEIN, S. F., N. W. CHARONT (1990): Multiple-exposure photographic analysis of a motile spirochete (motility/periplasmic flagella/Leptospiraceae). Proc. Nati. Acad. Sci.

- GOMARD, Y., K. DELLAGI, S. M. GOODMAN, P. MAVINGUI, P. TORTOSA (2021): Tracking animal reservoirs of pathogenic leptospira: The right test for the right claim. *Trop. Med. Infect. Dis.* 6, doi: 10.3390/tropicalmed6040205.
- GREENLEE, J. J., C. A. BOLIN, D. P. ALT, N. F. CHEVILLE, C. B. ANDREASEN (2004): Clinical and pathologic comparison of acute leptospirosis in dogs caused by two strains of *Leptospira kirschneri* serovar grippotyphosa. *Am. J. Vet. Res.* 65, 1100–1107.
- GRIEBSCH, C., N. KIRKWOOD, M. P. WARD, W. SO, L. WEERAKOON, S. DONAHOE, J. M. NORRIS (2022): Emerging leptospirosis in urban Sydney dogs: a case series (2017–2020). *Aust. Vet. J.* 100, 190–200. doi: 10.1111/avj.13148.
- GRILLOVÁ, L., M. T. ROBINSON, A. CHANTHONGTHIP, A. T. VINCENT, C. NIEVES, J. OPPELT, J. F. MARIET, C. LORIOUX, M. VONGSOUVATH, M. MAYXAY, O. PHONEMEEXAY, S. RATTANAVONG, K. PHOMMASONE, A. DOUANGNOUVONG, D. ŠMAJS, F. J. VEYRIER, P. N. NEWTON, M. PICARDEAU (2021): Genetic diversity of *Leptospira* isolates in Lao PDR and genome analysis of an outbreak strain. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 15, doi: 10.1371/journal.pntd.0010076.
- GRILLOVA, L., T. COKELAER, J. F. MARIET, J. P. DA FONSECA, M. PICARDEAU (2023): Core genome sequencing and genotyping of *Leptospira interrogans* in clinical samples by target capture sequencing. *BMC Infect. Dis.* 23, doi: 10.1186/s12879-023-08126-x.
- GUAGLIARDO, S. A. J., S. A. IVERSON, L. REYNOLDS, H. YAGLOM, H. VENKAT, R. GALLOWAY, C. LEVY, A. REINDEL, T. SYLVESTER, M. KRETSCHMER, M. LAFERLA JENNI, P. WOODWARD, N. BEATTY, A. ARTUS, R. KLEIN, R. SUNENSHINE, I. J. SCHAFER (2019): Despite high-risk exposures, no evidence of zoonotic transmission during a canine outbreak of leptospirosis. *Zoonoses Public Health* 66, 223–231. doi: 10.1111/zph.12557.
- GUGLIELMINI, J., P. BOURHY, O. SCHIETTEKATTE, F. ZININI, S. BRISSE, M. PICARDEAU (2019): Genus-wide *Leptospira* core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, doi: 10.1371/journal.pntd.0007374.

- HAAKE, D. A., P. N. LEVETT (2015): Leptospirosis in humans. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 387, 65–97. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8_5.
- HABUŠ, J., Z. MILAS, V. MOJČEC PERKO, Š. Š. MAJETIĆ (2012): Serological survey of canine leptospirosis in Croatia-the changing Serological survey of canine leptospirosis in Croatia-the changing epizootiology of the disease epizootiology of the disease. *Vet. Arh.* 82, 183–191.
- HABUŠ, J., Z. PERSIC, S. ŠPIČIĆ, S. VINCE, Z. ŠTRITOF, Z. MILAS, Z. CVETNIĆ, M. PERHARIĆ, N. TURK (2017): New trends in human and animal leptospirosis in Croatia, 2009–2014. *Acta Trop.* 168, 1–8. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.01.002.
- HABUŠ, J., Z. POLJAK, Z. ŠTRITOF, V. M. PERKO, Z. MILAS, M. PERHARIĆ, K. MARTINKOVIĆ, S. HAĐINA, V. STEVANOVIĆ, V. STAREŠINA, N. TURK (2020): Prognostic factors for survival of canine patients infected with leptospira spp. *Vet. Arh.* 90, 111–128. doi: 10.24099/vet.arhiv.0626.
- HACKER, K. P., G. A. SACRAMENTO, J. S. CRUZ, D. DE OLIVEIRA, N. NERY, J. C. LINDOW, M. CARVALHO, J. HAGAN, P. J. DIGGLE, M. BEGON, M. G. REIS, E. A. WUNDER, A. I. KO, F. COSTA (2020): Influence of rainfall on leptospira infection and disease in a tropical urban setting, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 26, 311–314. doi: 10.3201/eid2602.190102.
- HAMOND, C., MARTINS, G., LILENBAUM, W., PINNA, M., MEDEIROS, M. A. (2015): Infection by *Leptospira* spp. in cattle in a tropical region, Rio de Janeiro, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 92, 210.
- HARRISON, P. W., R. P. LOWER, N. K. KIM, J. P. YOUNG (2010): Introducing the bacterial chromid: not a chromosome, not a plasmid. *Trends Microbiol.* 18:141–148
- HARTMANN, K., M. G. PENNISI, R. DORSCH (2020): Infectious agents in feline chronic kidney disease – what is the evidence? *Adv. Small. Anim. Care.* 1, 189-206.
- HARTSKEERL, R. A., M. COLLARES-PEREIRA, W. A. ELLIS (2011): Emergence, control and re-emerging leptospirosis: Dynamics of infection in the changing world. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 494–501. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03474.x. Blackwell Publishing Ltd.

- HARTSKEERL, R. A., M. G. A. GORIS, S. BREM, P. MEYER, H. KOPP, H. GERHARDS, B. WOLLANKE (2004): Classification of *Leptospira* from the Eyes of Horses Suffering from Recurrent Uveitis.
- HORNSBY, R. L., D. P. ALT, J. E. NALLY (2020): Isolation and propagation of leptospire at 37 °C directly from the mammalian host. *Sci. Rep.* 10, 9620. doi: 10.1038/s41598-020-66526-4.
- HUBENER, E. A., i H. REITER (1915): Beitrage zur Aetiologie der Weilschen Krankheit. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 41:1275–1277, (Citirano iz Levett et al, 2001.)
- INADA, R., Y. IDO (1915): Eine zusammenfassende Mitteilung uber die Entdeckung des Errgers (eine neue Spezies *Sprochaeta*) der Weilschen Krankheit. *Tokyo. Ijishinski.* Nr. 1808, (Citirano iz GSELL, O. (1952): *Leptospirose*. Medizinischer Verlag Hans Huber, Bern)
- JOHNSON, D.I. (2018): *Leptospira* spp. U: Johnson D.I., editor. *Bacterial Pathogens and Their Virulence Factors*. Springer International Publishing; Cham, Switzerland. 289–294
- JOHNSON, R. C., S. FAINE (1984): *Leptospira*, 62-67. U: N.R. KRIEG i J.G. HOLT (ed.), *Bergey's manual of systemic bacteriology*, vol 1. Williams & Wilkins, Baltimore.
- JOHNSON, R. C., W. G. HARRIS (1967): Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire. Growth at low temperatures. *J. Bacteriol.* 94, 27-31.
- JOLLEY, K. A., C. M. BLISS, J. S. BENNETT, H. B. BRATCHER, C. BREHONY, F. M. COLLES, H. WIMALARATHNA, O. B. HARRISON, S. K. SHEPPARD, A. J. CODY, M. C. J. MAIDEN (2012): Ribosomal multilocus sequence typing: Universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology* 158, 1005–1015. doi: 10.1099/mic.0.055459-0.
- JORGE, S., F. S. KREMER, N. R. DE OLIVEIRA, G. D. O. S. V. NAVARRO, A. M. GUIMARÃES, C. D. SANCHEZ, R. D. dos S. WOLOSKI, K. F. RIDIERI, V. F. CAMPOS, L. da S. PINTO, O. A. DELLAGOSTIN (2018): Whole-genome sequencing of *leptospira interrogans* from southern Brazil: Genetic features of a highly virulent strain. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 113, 80–86. doi: 10.1590/0074-02760170130.

- ROSE, J. L., M. N. SUMANA (2016): Utilization of Faine's Criteria for the Diagnosis of Leptospirosis. IOSR-JDMS. 15,28–30.
- JUVET, F., S. SCHULLER, E. J. O'NEILL, P. A. O'NEILL, J. E. NALLY (2011): Urinary shedding of spirochaetes in a dog with acute leptospirosis despite treatment. *Vet. Rec.* 168, doi: 10.1136/vr.d740.
- KARPAGAM, K. B., B. GANESH (2020): Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance - an updated review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 39, 835–846. doi: 10.1007/s10096-019-03797-4. Springer.
- KINGSCOTE, B. F. (1986): Leptospirosis in red foxes in Ontario. *J. Wildl. Dis.* 22, 475–478. doi: 10.7589/0090-3558-22.4.475.
- KITAMURA K., HARA S. (1918): On the causative agent of Akiyami (autumn fever) (na Japanskom). *Tokyo Ijishinshi (Tokyo Med. J.)*. 2056, 25–32. 2057:116–22.
- KLARENBECK A., SCHUFFNER W. (1933): Het voorkomen van een afwijkend leptospiraras in Nederland. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 77, 37, 4271-4276.
- KLOPFLEISCH, R., B. KOHN, S. PLOG, C. WEINGART, K. NCKLER, A. MAYER-SCHOLL, A. D. GRUBER (2010): An emerging pulmonary haemorrhagic syndrome in dogs: Similar to the human leptospiral pulmonary haemorrhagic syndrome? *Vet. Med. Int.* 2010, doi: 10.4061/2010/928541.
- KMETY, E., H. DIKKEN (1993): Classification of the Species *Leptospira Interrogans* and History of Its Serovars, University Press Groningen, Groningen, Nizozemska
- KNIFIC, R. L., A. ČUTUK, G. G. GRAČNER, A. DOVČ (2019): Seroprevalence of leptospirosis in various categories of dogs in Bosnia and Herzegovina. *Vet. Arh.* 89, 627–640. doi: 10.24099/vet.arhiv.0407.
- KNÖPFLER, S., A. MAYER-SCHOLL, E. LUGE, R. KLOPFLEISCH, A. D. GRUBER, K. NÖCKLER, B. KOHN (2017): Evaluation of clinical, laboratory, imaging findings and outcome in 99 dogs with leptospirosis. *J. Small Anim. Pract.* 58, 582–588. doi: 10.1111/jsap.12718.

- KO, A. I., C. GOARANT, M. PICARDEAU (2009): *Leptospira*: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 736–747. doi: 10.1038/nrmicro2208.
- KOHN, B., K. STEINICKE, G. ARNDT, A. D. GRUBER, B. GUERRA, A. JANSEN, B. KASER-HOTZ, R. KLOPFLEISCH, F. LOTZ, E. LUGE, K. NÖCKLER (2010): Pulmonary Abnormalities in Dogs with Leptospirosis. *J. Vet. Intern. Med.* 24, 1277–1282. doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0585.x.
- KOIZUMI, N., M. MORITA, H. NURADJI, SUSANTI, S. M. NOOR, N. L. P. I. DHARMAYANTI, P. RANDUSARI, J. J. MU, R. M. SOLANTE, N. SAITO, K. ARIYOSHI, H. T. T. HA, T. WADA, Y. AKEDA, K. MIURA (2022): Comparative genomic analysis of *Leptospira* spp. isolated from *Rattus norvegicus* in Indonesia. *Infect. Genet. Evol.* 102, doi: 10.1016/j.meegid.2022.105306.
- KOIZUMI, N., M. PICARDEAU (2020): *Leptospira* spp.: methods and protocols. Humana Press.
- KORBA, A. A., LOUNICI, H., KAINIU, M., VINCENT, A. T., MARIET, J. F., VEYRIER, F. J., GOARANT, C., PICARDEAU, M. (2021): *Leptospira ainlahdjerensis* sp. nov., *Leptospira ainazelensis* sp. nov., *Leptospira abararensis* sp. nov. and *Leptospira chreensis* sp. nov., four new species isolated from water sources in Algeria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 71(12)
- KORTHOF, G. (1932): *Zbl. Bakt., I Abt. Orig.*, 125, 429
- MARTIN, L., A. PETTIT (1918). Sero-diagnostic de la spirochaetose ictero-haemorrhagique. *Bulletin et Mémoires de la Société Médicale des Hôpitaux de Paris.* 42, 672-675.
- LAU, C. L., L. D. SMYTHE, S. B. CRAIG, P. WEINSTEIN (2010): Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: Fuelling the fire? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 104, 631–638. doi: 10.1016/j.trstmh.2010.07.002.
- LAU, S. F., J. Y. WONG, K. H. KHOR, M. A. ROSLAN, M. S. ABDUL RAHMAN, S. K. BEJO, R. RADZI, A. R. BAHAMAN (2017): Seroprevalence of Leptospirosis in Working Dogs. *Top. Companion Anim. Med.* 32, 121–125. doi: 10.1053/j.tcam.2017.12.001.

- LEON, A., S. PRONOST, G. FORTIER, G. ANDRE-FONTAINE, R. LECLERCQ (2009): Multilocus sequence analysis for typing *Leptospira interrogans* and *Leptospira kirschneri*. *J. Clin. Microbiol.* 48, 581–585.
- LEONARD, F., P. QUINN, W. ELLIS, K. O'FARRELL (1992): Duration of urinary excretion of leptospires by cattle naturally or experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *Vet Rec.* 131, 435–439.
- LETUNIC, I., P. BORK (2021): Interactive tree of life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 49, W293–W296. doi: 10.1093/nar/gkab301.
- LEVETT, P. N. (2001): Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 296–326. doi: 10.1128/CMR.14.2.296-326.2001.
- LEVETT, P. N., R. E. MOREY, R. L. GALLOWAY, D. E. TURNER, A. G. STEIGERWALT, L. W. MAYER (2005): Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J. Med. Microbiol.* 54, 45–49. doi: 10.1099/jmm.0.45860-0.
- LILENBAUM, W., R. VARGES, L. MEDEIROS, A. G. CORDEIRO, A. CAVALCANTI, G. N. SOUZA, L. RICHTZENHAIN, S. A. VASCONCELLOS (2008): Risk factors associated with leptospirosis in dairy goats under tropical conditions in Brazil. *Res. Vet. Sci.* 84, 14–17. doi: 10.1016/j.rvsc.2007.03.011.
- LIN, X., Y. CHEN, J. YAN (2008): Recombinant multiepitope protein for diagnosis of leptospirosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 1711–1714. doi: 10.1128/CVI.00189-08.
- LIU, W., H. L. RØDER, J. S. MADSEN, T. BJARNSHOLT, S. J. SØRENSEN, M. BURMØLLE (2016): Interspecific bacterial interactions are reflected in multispecies biofilm spatial organization. *Front. Microbiol.* 7, doi: 10.3389/fmicb.2016.01366. Frontiers Media S.A.
- LÓPEZ, M. C., A. VILA, J. RODÓN, X. ROURA (2019): *Leptospira* seroprevalence in owned dogs from Spain. *Heliyon* 5, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02373.
- MAIDEN, M. C. J., M. J. J. VAN RENSBURG, J. E. BRAY, S. G. EARLE, S. A. FORD, K. A. JOLLEY, N. D. MCCARTHY (2013): MLST revisited: The gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 728–736. doi: 10.1038/nrmicro3093.

- MAJED, Z., E. BELLENGER, D. POSTIC, C. POURCEL, G. BARANTON, M. PICARDEAU (2005): Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans* sensu stricto. J. Clin. Microbiol. 43, 539-545.
- MAJOR, A., A. SCHWEIGHAUSER, T. FRANCEY (2014): Increasing incidence of canine leptospirosis in Switzerland. Int. J. Environ. Res. Public Health 11, 7242–7260. doi: 10.3390/ijerph110707242.
- MARKOVICH, J. E., L. ROSS, E. MCCOBB (2012): The Prevalence of Leptospiral Antibodies in Free Roaming Cats in Worcester County, Massachusetts. J. Vet. Intern. Med. 26, 688–689. doi: 10.1111/j.1939-1676.2012.00900.x.
- MATSUNAGA, J., M. A. BAROCCHI, J. CRODA, T. A. YOUNG, Y. SANCHEZ, I. SIQUEIRA, C. A. BOLIN, M. G. REIS, L. W. RILEY, D. A. HAAKE, A. I. KO (2003): Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. Mol. Microbiol. 49, 929–946. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03619.x.
- MAURO, T., K. HARKIN (2019): Persistent Leptospirosis in Five Dogs Despite Antimicrobial Treatment (2000–2017). J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 55, 42–47. doi: 10.5326/JAAHA-MS-6882.
- MAYER-SCHOLL, A., E. LUGE, A. DRAEGER, K. NÖCKLER, B. KOHN (2013): Distribution of *Leptospira* serogroups in dogs from Berlin, Germany. Vector-Borne Zoonotic Dis. 13, 200–202. doi: 10.1089/vbz.2012.1121.
- MAYER-SCHOLL, A., J. A. HAMMERL, S. SCHMIDT, R. G. ULRICH, M. PFEFFER, D. WOLL, H. C. SCHOLZ, A. THOMAS, K. NÖCKLER (2014): *Leptospira* spp. in rodents and shrews in Germany. Int. J. Environ. Res. Public Health 11, 7562–7574. doi: 10.3390/ijerph110807562.
- MEDEIROS, E. J. de S., L. C. A. FERREIRA, J. M. ORTEGA, M. R. V. COSATE, T. SAKAMOTO (2022): Genetic basis underlying the serological affinity of leptospiral serovars from serogroups Sejroe, Mini and Hebdomadis. Infect. Genet. Evol. 103, doi: 10.1016/j.meegid.2022.105345.

- MEDEIROS, F. da R., A. SPICHLER, D. A. ATHANAZIO (2010): Leptospirosis-associated disturbances of blood vessels, lungs and hemostasis. *Acta Trop.* 115, 155–162. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.02.016.
- MERIEN, F., G. BARANTON, P. PÉROLAT (1995): Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *J. Infect. Dis.* 172, 281-285.
- MIOTTO, B. A., A. G. A. GUILLOUX, B. F. TOZZI, L. Z. MORENO, A. S. DA HORA, R. A. DIAS, M. B. HEINEMANN, A. M. MORENO, A. F. DE SOUZA FILHO, W. LILENBAUM, M. K. HAGIWARA (2018): Prospective study of canine leptospirosis in shelter and stray dog populations: Identification of chronic carriers and different *Leptospira* species infecting dogs. *PLoS One* 13, doi: 10.1371/journal.pone.0200384.
- MOHAMMAD, A. (2015): Assessing Changes in Soil Microbial Population with Some Soil Physical and Chemical Properties. *Int. J. Plant Anim. Environ. Sci.* 5, 117–123.
- MOREY, R. E., R. L. GALLOWAY, S. L. BRAGG, A. G. STEIGERWALT, L. W. MAYER, P. N. LEVETT (2006): Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3510–3516. doi: 10.1128/JCM.00670-06.
- MURRAY, G. L. (2015). The molecular basis of leptospiral pathogenesis. *Current topics in microbiology and immunology*, 387, 139–185.
- MWACHUI, M. A., L. CRUMP, R. HARTSKEERL, J. ZINSSTAG, J. HATTENDORF (2015): Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A Systematic Review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, doi: 10.1371/journal.pntd.0003843.
- NASCIMENTO, A. L., A. I. K. O, E. A. MARTENS, C. B. MONTEIRO-VITORELLO, P. L. HO, D. A. HAAKE, S. VERJOVSKI-ALMEIDA i dr. (2004a): Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insight into physiology and pathogenesis. *J. Bacteriol.* 186, 2164-2172.
- NASCIMENTO, A. L., S. VERJOVSKI-ALMEIDA, M. A. VAN SLUYS, C. B. MONTEIRO-VITORELLO, L. E. CAMARGO, L. A. DIGIAMPIETRI i dr. (2004b): Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 459-478.

- NAU, L. H., A. OBIEGALA, N. KRÓL, A. MAYER-SCHOLL, M. PFEFFER (2020): Survival time of *Leptospira kirschneri* serovar Grippotyphosa under different environmental conditions. PLoS One 15, doi: 10.1371/journal.pone.0236007.
- NICODEMO, A. C., A. N. DUARTE-NETO (2021): Pathogenesis of Pulmonary Hemorrhagic Syndrome in Human Leptospirosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 104, 1970–1972.
- NIEVES, C., A. T. VINCENT, L. ZARANTONELLI, M. PICARDEAU, F. J. VEYRIER, A. BUSCHIAZZO (2023): Horizontal transfer of the rfb cluster in *Leptospira* is a genetic determinant of serovar identity. Life Sci. alliance 6, doi: 10.26508/lsa.202201480.
- PAPPAS, G., P. PAPADIMITRIOU, V. SIOZOPOULOU, L. CHRISTOU, N. AKRITIDIS (2008): The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. Int. J. Infect. Dis. 12, 351–357. doi: 10.1016/j.ijid.2007.09.011.
- PASTER, B. J., F. E. DEWHIRST, W. G. WEISBURG, L. A. TORDOFF, G. J. FRASER, R. B. HESPELL, T. B. STANTON, L. ZABLEN, L. MANDELCO, C. R. WOESE (1991): Phylogenetic analysis of the spirochetes. J. Bacteriol. 173:6101–6109.
- PEREZ, J., C. GOARANT (2010): Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. BMC Microbiol. 10, 325. doi: 10.1186/1471-2180-10-325.
- PEROLAT, P., R. J. CHAPPEL, B. ADLER, G. BARANTON, D. M. BULACH, M. L. BILLINGHURST, M. LETOCART, F. MERIENL, M. SERRANO (1998): *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 851-858.
- PICARDEAU, M., D. M. BULACH, C. BOUCHIER, R. L. ZUERNER, N. ZIDANE, P. J. WILSON, S. CRENO, E. S. KUCZEK, S. BOMMEZZADRI, J. C. DAVIS, A. MCGRATH, M. J. JOHNSON, C. BOURSAUX-EUDE, T. SEEMANN, Z. ROUY, R. L. COPPEL, J. I. ROOD, A. LAJUS, J. K. DAVIES, C. MÉDIGUE, B. ADLER (2008): Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. PLoS One 3, doi: 10.1371/journal.pone.0001607.
- PUTZ, E. J., J. E. NALLY (2020): Investigating the Immunological and Biological Equilibrium of Reservoir Hosts and Pathogenic *Leptospira*: Balancing the Solution to an Acute Problem? Front. Microbiol. 11, doi: 10.3389/fmicb.2020.02005. Frontiers Media S.A.

- RAHMAN, S. A., K. H. KHOR, S. KHAIRANI-BEJO, S. F. LAU, M. MAZLAN, A. ROSLAN, S. H. GOH (2021): Detection and characterization of *Leptospira* spp. in dogs diagnosed with kidney and/or liver disease in Selangor, Malaysia. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 33, 834–843. doi: 10.1177/10406387211024575.
- RAJ, J., R. CAMPBELL, S. TAPPIN (2021): Clinical findings in dogs diagnosed with leptospirosis in England. *Vet. Rec.* 189, no. doi: 10.1002/vetr.452.
- RAJAPAKSE, S. (2022): Leptospirosis: Clinical aspects. *Clin. Med. J. R. Coll. Physicians London* 22, 14–17. doi: 10.7861/clinmed.2021-0784. Royal College of Physicians.
- RAMADASS, P., JARVIS, B. D. W., CORNER, J., PENNY, D., MARSHALL, R. B. (1992): Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. *Int. J. Syst. Bact.* 42, 215–219.
- RAMLI, S. R., B. BUNK, C. SPRÖER, R. GEFFERS, M. JAREK, S. BHUJU, M. GORIS, S. MUSTAKIM, F. PESSLER (2021): Complete genome sequencing of *Leptospira interrogans* isolates from Malaysia reveals massive genome rearrangement but high conservation of virulence-associated genes. *Pathogens* 10, doi:10.3390/pathogens10091198.
- RENAUD C., S. ANDREWS, Z. DJELOUADJI, S. LECHEVAL, N. CORRAO-REVOL, S. BUFF, P. DEMONT, A. KODJO (2013): Prevalence of the *Leptospira* serovars bratislava, grippityphosa, mozdok and pomona in French dogs. *Vet. J.* 196, 126–127.
- REZENDE MIREZ DE CARVALHO, R., C. SILVA DIAS, L. NOGUEIRA PAZ, T. MELO DE LIMA FIRES, C. PEREIRA FIGUEIRA, K. ARAÚJO DAMASCENO, M. HANZEN PINNA (2023): Biofilm formation in vitro by *Leptospira interrogans* strains isolated from naturally infected dogs and their role in antimicrobial resistance. *Heliyon* 9, doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e13802.
- RICALDI, J. N., D. E. FOUTS, J. D. SELENGUT, D. M. HARKINS, K. P. PATRA, A. MORENO, J. S. LEHMANN, J. PURUSHE, R. SANKA, M. TORRES, N. J. WEBSTER, J. M. VINETZ, M. A. MATTHIAS (2012): Whole Genome Analysis of *Leptospira licerasiae* Provides Insight into Leptospiral Evolution and Pathogenicity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, doi: 10.1371/journal.pntd.0001853.

- RICARDO, T., M. A. PREVITALI, M. SIGNORINI (2020): Meta-analysis of risk factors for canine leptospirosis. *Prev. Vet. Med.* 181, doi: 10.1016/j.prevetmed.2020.105037.
- RISTOW, P., P. BOURHY, F. W. D. C. MCBRIDE, C. P. FIGUEIRA, M. HUERRE, P. AVE, I. SAINT GIRONS, A. I. KO, M. PICARDEAU (2007): The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog.* 3, 0894–0903. doi: 10.1371/journal.ppat.0030097.
- RODRIGUEZ, J., M. C. BLAIS, C. LAPOINTE, J. ARSENAULT, L. CARIOTO, L., J. HAREL (2014): Serologic and urinary PCR survey of leptospirosis in healthy cats and in cats with kidney disease. *J. Vet. Int. Med.* 28, 284–293. doi: 10.1111/jvim.12287.
- ROJAS, P., A. M. MONAHAN, S. SCHULLER, I. S. MILLER, B. K. MARKEY, J. E. NALLY (2010): Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: A maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 1305–1309. doi: 10.1007/s10096-010-0991-2.
- SABRI ABDUL RAHMAN, M., S. KHAIRANI BEJO, Z. ZAKARIA, L. HASSAN, M. AZRI ROSLAN (2021): Seroprevalence and distribution of leptospiral serovars in livestock (cattle, goats, and sheep) in flood-prone Kelantan, Malaysia. *J. Vet. Res.* 65, 53–58. doi: 10.2478/jvetres-2021-0003.
- SAINT GIRONS, I., S. J. NORRIS, U. GOBEL, J. MEYER, E. M. WALKER, R. ZUERNER (1992): Genome structure of spirochetes. *Res. Microbiol.* 143 615–621.
- SAMROT, A. V., T. C. SEAN, K. S. BHAVYA, C. S. SAHITHYA, S. CHANDRASEKARAN, R. PALANISAMY, E. R. ROBINSON, S. K. SUBBIAH, P. L. MOK (2021): Leptospiral infection, pathogenesis and its diagnosis—a review. *Pathogens* 10, 1–30. doi: 10.3390/pathogens10020145. MDPI AG.
- SANT’ANNA, R., A. S. VIEIRA, J. GRAPIGLIA, W. LILENBAUM (2017): High number of asymptomatic dogs as leptospiral carriers in an endemic area indicates a serious public health concern. *Epidemiol. Infect.* 145, 1852–1854. doi: 10.1017/S0950268817000632.
- SANTOS, L. A., H. ADHIKARLA, X. YAN, Z. WANG, D. E. FOUTS, J. M. VINETZ, L. C. J. ALCANTARA, R. A. HARTSKEERL, M. G. A. GORIS, M. PICARDEAU, M. G.

- REIS, J. P. TOWNSEND, H. ZHAO, A. I. KO, E. A. WUNDER (2018): Genomic comparison among global isolates of *L. interrogans* serovars Copenhageni and Icterohaemorrhagiae identified natural genetic variation caused by an indel. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 1–11. doi: 10.3389/fcimb.2018.00193.
- SCAHILL, K., U. WINDAHL, S. BOQVIST, L. PELANDER (2022): *Leptospira* seroprevalence and associated risk factors in healthy Swedish dogs. *BMC Vet. Res.* 18, doi: 10.1186/s12917-022-03472-5.
- SCHULLER, S., K. SERGEANT, J. RENAUT, J. J. CALLANAN, C. SCAIFE, J. E. NALLY (2015): Comparative proteomic analysis of lung tissue from guinea pigs with leptospiral pulmonary haemorrhage syndrome (LPHS) reveals a decrease in abundance of host proteins involved in cytoskeletal and cellular organization. *J. Proteomics* 122, 55–72. doi: 10.1016/j.jprot.2015.03.021.
- SCHULLER, S., T. FRANCEY, K. HARTMANN, M. HUGONNARD, B. KOHN, J. E. NALLY, J. SYKES (2015): European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *J. Small Anim. Pract.* 56, 159–179. doi: 10.1111/jsap.12328.
- SHIMIZU, T., E. MATSUSAKA, K. TAKAYANAGI, T. MASUZAWA, Y. IWAMOTO, T. MORITA, I. MIFUCHI, Y. YANAGIHARA (1987): Biological activities of lipopolysaccharide-like substance (LLS) extracted from *Leptospira interrogans* serovar canicola strain Moulton. *Microbiol. Immunol.* 31, 724-735.
- SLACK, A. T., M. L. SYMONDS, M. F. DOHNT, L. D. SMYTHE (2006): Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol.* 6, doi: 10.1186/1471-2180-6-95.
- SPRIßLER, F., P. JONGWATTANAPISAN, S. LUENGYOSLUECHAKUL, R. PUSOONTHORNTHUM, N. PRAPASARAKUL, A. KURILUNG, M. GORIS, A. AHMED, S. REESE, M. BERGMANN, R. DORSCH, H. KLAASEN, K. HARTMANN (2019): *Leptospira* infection and shedding in cats in Thailand. *Transbound Emerg. Dis.* 66, 948-956.
- STALLMAN N. D. (1987): International committee on systematic bacteriology subcommittee on the taxonomy of *Leptospira*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 472–473.

- STEVENSON, B., H. A. CHOY, M. PINNE, M. L. ROTONDI, M. C. MILLER, E. DEMOLL, P. KRAICZY, A. E. COOLEY, T. P. CREAMER, M. A. SUCHARD, C. A. BRISSETTE, A. VERMA, D. A. HAAKE (2007): *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PLoS One* 2, doi: 10.1371/journal.pone.0001188.
- STIMSON, A. M. (1907): Note on an organism found in yellow-fever tissue. *Public Health Rep.* 22:541, (Citirano iz: LEVETT, P. N. (2001): *Leptospirosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 296–326.).
- STOKES, J. E., J.B. KANEENE, W. D. SCHALL, J. M. KRUGER, R. MILLER, L. KAISER, C. A. BOLIN (2007): Prevalence of serum antibodies against six *Leptospira* serovars in healthy dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 230, 1657–1664. doi:10.2460/javma.230.11.1657
- STRITOF MAJETIC, Z., R. GALLOWAY, E. RUZIC SABLJIC, Z. MILAS, V. MOJCEC PERKO, J. HABUS, J. MARGALETIC, R. PERNAR, N. TURK (2014): Epizootiological survey of small mammals as *Leptospira* spp. reservoirs in Eastern Croatia. *Acta Trop.* 131, 111–116. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.12.009.
- STRUTZBERG-MINDER, K., A. TSCHENTSCHER, M. BEYERBACH, M. HOMUTH, L. KREIENBROCK (2018): Passive surveillance of *Leptospira* infection in swine in Germany. *Porc. Heal. Manag.* 4, doi: 10.1186/s40813-018-0086-5.
- STRUTZBERG-MINDER, K., A. ULLERICH, K. DOHMANN, J. BOEHMER, M. GORIS (2022): Comparison of Two *Leptospira* Type Strains of Serovar Grippotyphosa in Microscopic Agglutination Test (MAT) Diagnostics for the Detection of Infections with *Leptospire*s in Horses, Dogs and Pigs. *Vet. Sci.* 9, doi: 10.3390/vetsci9090464.
- STUART, R. D. (1946): Preparation and use of a simple culture medium for *leptospira*. *J. Pathol. Bacteriol.* 58:343-349.
- STULL, J. W., M. EVASON, J. SCOTT WEESE, J. YU, D. SZLOSEK, A. M. SMITH (2022): Canine leptospirosis in Canada, test-positive proportion and risk factors (2009 to 2018): A cross-sectional study. *PLoS One* 17, DOI: 10.1371/journal.pone.0270313.
- SYKES, J. E., K. L. REAGAN, J. E. NALLY, R. L. GALLOWAY, D. A. HAAKE (2022): Role of Diagnostics in Epidemiology, Management, Surveillance, and Control of *Leptospirosis*. *Pathogens* 11, doi: 10.3390/pathogens11040395.

- SYKES, J. E., T. FRANCEY, S. SCHULLER, R. A. STODDARD, L. D. COWGILL, G. E. MOORE (2023): Updated ACVIM consensus statement on leptospirosis in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 37, 1966–1982. doi: 10.1111/jvim.16903.
- TAGLIABUE, S., B. M. FIGAROLLI, M. D'INCAU, G. FOSCHI, M. S. GENNERO, R. GIORDANI, A. NATALE, P. PAPA, N. PONTI, D. SCALTRITO, L. SPADARI, G. VESCO, L. RUOCCO (2016): Indagine sierologica sulla presenza di *Leptospira* spp. in Italia: Dati nazionali 2010-2011. *Vet. Ital.* 52, 129–138. doi: 10.12834/VetIt.58.169.2.
- TAMURA, K., G. STECHER, S. KUMAR (2021): MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38, 3022–3027. doi: 10.1093/molbev/msab120.
- TANGEMAN, L. E., M. P. LITTMAN (2013). Clinicopathologic and atypical features of naturally occurring leptospirosis in dogs: 51 cases (2000-2010). *J. Am. Vet. Med. Ass.* 243, 1316–1322.
- TAYLOR, A. J., D. H. PARIS, P. N. NEWTON (2015): A systematic review of the mortality from untreated leptospirosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, doi: 10.1371/journal.pntd.0003866.
- THAIPADUNGPANIT, J., V. WUTHIEKANUN, W. CHIERAKUL, L. D. SMYTHE, W. PETKANACHANAPONG, R. LIMPAIBOON, A. APIWATANAPORN, A. T. SLACK, Y. SUPUTTAMONGKOL, N. J. WHITE, E. J. FEIL, N. P. J. DAY, S. J. PEACOCK (2007): A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 1, doi: 10.1371/journal.pntd.0000056.
- THAIPADUNPANIT, J., W. CHIERAKUL, V. WUTHIEKANUN, D. LIMMATHUROTSAKUL, P. AMORNCHAI, S. BOONSLIP, L. D. SMYTHE, R. LIMPAIBOON, A. R. HOFFMASTER, N. P. J. DAY, S. J. PEACOCK (2011): Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and *lipL32* genes for human leptospirosis in Thailand: A case-control study. *PLoS One* 6, doi: 10.1371/journal.pone.0016236.
- THIBEAUX, R., G. IRAOLA, I. FERRÉS, E. BIERQUE, D. GIRAULT, M. E. SOUPÉ-GILBERT, M. PICARDEAU, C. GOARANT (2018): Deciphering the unexplored

- Leptospira diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. *Microb. genomics* 4, doi: 10.1099/mgen.0.000144.
- THIBEAUX, R., M. E. SOUPÉ-GILBERT, M. KAINIU, D. GIRAULT, E. BIERQUE, J. FERNANDES, H. BÄHRE, A. DOUYÈRE, N. ESKENAZI, J. VINH, M. PICARDEAU, C. GOARANT (2020): The zoonotic pathogen *Leptospira interrogans* mitigates environmental stress through cyclic-di-GMP-controlled biofilm production. *npj Biofilms Microbiomes* 6, doi: 10.1038/s41522-020-0134-1.
- TIBAYRENC, M. (2005): Bridging the gap between molecular epidemiologists and evolutionists. *Trends Microbiol.* 13, 575–580. doi: 10.1016/j.tim.2005.09.004.
- TIMONEY, J. F., N. KALIMUTHUSAMY, S. VELINENI, J. M. DONAHUE, S. C. ARTIUSHIN, M. FETTINGER (2011): A unique genotype of *Leptospira interrogans* serovar Pomona type kennewicki is associated with equine abortion. *Vet. Microbiol.* 150, 349–353. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.02.049.
- TOYOFUKU, M., T. INABA, T. KIYOKAWA, N. OBANA, Y. YAWATA, N. NOMURA (2016): Environmental factors that shape biofilm formation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80, 7–12. doi: 10.1080/09168451.2015.1058701.
- TRUONG, K. N., J. COBURN (2011): The emergence of severe pulmonary hemorrhagic leptospirosis: questions to consider. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 1, 24. doi: 10.3389/fcimb.2011.00024.
- TUBIANA, S., M. MIKULSKI, J. BECAM, F. LACASSIN, P. LEFÈVRE, A. C. GOURINAT, C. GOARANT, E. D'ORTENZIO (2013): Risk Factors and Predictors of Severe Leptospirosis in New Caledonia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, doi: 10.1371/journal.pntd.0001991.
- TURK, N., Z. MILAS, J. HABUŠ, Z. ŠTRITOF MAJETIĆ, V. MOJČEC PERKO, L. BARBIĆ, V. STEVANOVIĆ, M. PERHARIĆ, V. STAREŠINA (2013): Equine leptospirosis in Croatia-occurrence of subclinical infections Equine leptospirosis in Croatia-occurrence of subclinical infections and abortions and abortions. *Vet. arhiv* 83, 253-262.

- TURNER, L. H. (1970). Leptospirosis. Maintenance, isolation and demonstration of leptospire. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 64, 623–646.
- UHLENHUTH, P., W. FROMME (1915): Weitere experimentelle Untersuchung uber die sog. Weilsche Krankheit. Med. Klin. 11, 1264 (Citirano iz FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C. AND PEROLAT, P. (1999) *Leptospira and Leptospirosis*. 2nd Edition, Medisci Press, Melbourne.)
- VAN THIEL, P. H. (1948): Diagnosis and treatment of leptospirosis. U: Department of State Publication: International organization and conference series. General. I, 321.
- VARNI, V., P. RUYBAL, J. J. LAUTHIER, N. TOMASINI, B. BRIHUEGA, A. KOVAL, K. CAIMI (2014): Reassessment of MLST schemes for *Leptospira* spp. typing worldwide. Infect. Genet. Evol. 22, 216–222. doi: 10.1016/j.meegid.2013.08.002.
- VARNI, V., Y. CHIANI, A. NAGEL, P. RUYBAL, N. B. VANASCO, K. CAIMI (2018): Simplified MLST scheme for direct typing of *Leptospira* human clinical samples. Pathog. Glob. Health 112, 203–209. doi: 10.1080/20477724.2018.1480137.
- VERMA, A., B. STEVENSON (2012): Leptospiral Uveitis - There Is More to It Than Meets the Eye! Zoonoses Public Health 59, 132–141. doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01445.x.
- VERMA, A., B. STEVENSON, B. ADLER (2013): Leptospirosis in horses. Vet. Microbiol. 167, 61–66. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.04.012.
- VERMA, A., P. KUMAR, K. BABB, J. F. TIMONEY, B. STEVENSON (2010): Cross-reactivity of antibodies against leptospiral recurrent uveitis-associated proteins A and B (LruA and LruB) with eye proteins. PLoS Negl. Trop. Dis. 4, doi: 10.1371/journal.pntd.0000778.
- VINCENT, A. T., O. SCHIETTEKATTE, C. G. ID, V. K. NEELA, E. BERNET, R. THIBEAUX, N. ISMAIL, M. KHAIRUL, N. MOHD, K. ID, F. AMRAN, T. MASUZAWA, R. N. ID, A. A. KORBA, P. BOURHY, F. J. VEYRIER, M. PICARDEAU (2019): Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. PLoS Negl. Trop. Dis. 13, doi: 10.1371/journal.pntd.0007270.

- VINETZ, J. M., G. WATT (2020): Leptospirosis. *Hunter's Trop. Med. Emerg. Infect. Dis.* 636–640. doi: 10.1016/B978-0-323-55512-8.00079-X.
- VIOLETTE, N. P., E. C. LEDBETTER (2018): Punctate retinal hemorrhage and its relation to ocular and systemic disease in dogs: 83 cases. *Vet. Ophthalmol.* 21, 233–239. doi: 10.1111/vop.12496.
- WARD, M. P., L. T. GLICKMAN, L. E. GUPTILL (2002): Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada: 677 cases (1970-1998). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 220, 53–58. doi:10.2460/javma.2002.220.53
- WASINSKI, B., J. DUTKIEWICZ (2013): Leptospirosis—Current Risk Factors Connected with Human Activity and the Environment. *Ann. Agric. Environ. Med.* 20, 6.
- WEIS, S., A. RETTINGER, M. BERGMANN, J. R. LLEWELLYN, N. PANTCHEV, R. K. STRAUBINGER, K. HARTMANN (2017): Detection of *Leptospira* DNA in urine and presence of specific antibodies in outdoor cats in Germany. *J. Feline Med. Surg.* 19, 470-476.
- WEISS, S., A. MENEZES, K. WOODS, A. CHANTHONGTHIP, S. DITTRICH, A. OPOKU-BOATENG, M. KIMULI, V. CHALKER (2016): An Extended Multilocus Sequence Typing (MLST) Scheme for Rapid Direct Typing of *Leptospira* from Clinical Samples. 1–11. doi: 10.1371/journal.pntd.0004996.
- WOLF, J. W. (1954): The laboratory diagnosis of leptospirosis. Charles C Thomas, Publisher, Springfield, SAD.
- WOLLANKE, B., H. GERHARDS, K. ACKERMANN (2022): Infectious Uveitis in Horses and New Insights in Its Leptospiral Biofilm-Related Pathogenesis. *Microorganisms* 10, doi: 10.3390/microorganisms10020387.
- WYNWOOD, S. J., G. C. GRAHAM, S. L. WEIER, T. A. COLLET, D. B. MCKAY, S. B. CRAIG (2014): Leptospirosis from water sources. *Pathog. Glob. Health* 108, 334–338. doi: 10.1179/2047773214Y.00000000156.
- YANG, C. W., M. S. WU, M. J. PAN, W. J. HSIEH, A. VANDEWALLE, C. C. HUANG (2002): The leptospira outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial

- nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 2037–2045. doi: 10.1097/01.ASN.0000022007.91733.62.
- YASUDA, P. H., A. G. STEIGERWALT, K. R. SULZER, A. F. KAUFMANN, F. ROGERS, D. J. BRENNER (1987): Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 407-415.
- YURI, K., Y. TAKAMOTO, M. OKADA, T. HIRAMUNE, N. KIKUCHI, R. YANAGAWA (1993): Chemotaxis of *Leptospira* to Hemoglobin in Relation to Virulence. *Infect. Immun.* 61, 2270-2272.
- ZHOU, Z., N. F. ALIKHAN, M. J. SERGEANT, N. LUHMANN, C. VAZ, A. P. FRANCISCO, J. A. CARRIÇO, M. ACHTMAN (2018): Grapetree: Visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. *Genome Res.* 28, 1395–1404. doi: 10.1101/gr.232397.117.
- ZILBER, A. L., M. PICARDEAU, F. AYRAL, M. ARTOIS, P. DEMONT, A. KODJO, Z. DJELOUADJI (2014): High-resolution typing of *Leptospira interrogans* strains by multispacer sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* 52, 564–571. doi: 10.1128/JCM.02482-13.
- ZUERNER, R. L., D. ALT, C. A. BOLIN (1995): IS1533-Based PCR Assay for Identification of *Leptospira interrogans* Sensu Lato Serovars. *J. Clin. Microbiol.* 33, 3284-3289.
- ZUERNER, R. L., W. M. HUANG (2002): Analysis of a *Leptospira interrogans* locus containing DNA replication genes and a new IS, IS1502. *FEMS microbiology letters.* 215, 175–182.

9. PRILOZI

9.1. Popis slika

Slika 1. Filogenetsko stablo temeljeno na sekvencama 1371 gena.	7
Slika 2. <i>Leptospira interrogans</i> . Slikano elektronskim mikroskopom.	8
Slika 3. Shematski prikaz građe dvostruke ovojnice leptospira.	9
Slika 4. Kretanje leptospira: netranslacijski oblik kretanja, rotiranje svake pojedine flagele u istom smjeru (a,b); translacijski oblik kretanja, rotiranje svake flagele u različitom smjeru, strelica označava smjer kretanja (c)	10
Slika 5. <i>L. interrogans</i> (soj C51). Stvaranje i oblikovanje biofilma 21 dan nakon inkubacije. Slikano elektronskim mikroskopom.	15
Slika 6. Žuto obojenje sluznica (ikterus) kod psa s potvrđenom leptospirozom.	21
Slika 7. Difuzna krvarenja po plućima psa sa potvrđenom leptospirozom i LPHS-om.	21
Slika 8. Rendgenološka lateralna projekcija pluća psa sa potvrđenim LPHS-om –izražen bronhointersticijski i alveolarni crtež.	22
Slika 9. Pozadina oka psa s retinalnim krvarenjima posljedično leptospirozi. Snimljeno fundus kamerom.	23
Slika 10. Filogenetsko stablo 42 genomske vrste <i>Leptospira</i> korištenih u cgMLST metodi prema analizi 545 gena, dobiveno koristeći IQ-TREE računalni program i algoritam maksimalne udaljenosti. Vrste su podijeljene u 3 podgrupe.	47
Slika 11. Filogenetsko stablo. Analiza odsječaka <i>secY</i> gena izolata pasa i referentnih sojeva.	53
Slika 12. Filogenetsko stablo. Analiza mega nukleotidnih sljedova pretraživanih izolata.	58
Slika 13. Filogenetsko stablo. Analiza mega nukleotidnih sljedova pretraživanih izolata s referentnim sojevima.	60
Slika 14. Filogenetsko stablo. Analiza mega nukleotidnih sljedova pretraživanih izolata s referentnim sojevima koji pripadaju genomskoj vrsti <i>L. interrogans</i>	61
Slika 15. Filogenetsko stablo. Analiza mega nukleotidnih sljedova pretraživanih izolata s referentnim sojevima koji pripadaju genomskoj vrsti <i>L. kirschneri</i>	62
Slika 16. Filogenetska analiza. Analiza mega nukleotidnih sljedova pretraživanih izolata pasa s nukleotidnim sljedovima izolata različitih vrsta životinja i čovjeka iz ranijih istraživanja te referentnih sojeva koji pripadaju različitim genomskim vrstama.	63

Slika 17. Kružni grafikon. Prikaz zastupljenosti izvora izolata u BIGSdb bazi podataka.....	64
Slika 18. Kružni grafikon. Prikaz geografskog porijekla izolata u BIGSdb bazi podataka. ...	65
Slika 19. Kružni grafikon. Prikaz najčešćih genomskih vrsta u BIGSdb bazi podataka. Skala boja po genomskim vrstama prikazana je u kazalu.	65
Slika 20. Prikaz iz BIGSdb baze podataka. Primjer dobivanja podataka za svaki lokus zasebno.	68
Slika 21. Izvadak iz Excel tablice izvezene iz BIGSdb baze podataka.	69
Slika 22. Filogenetsko stablo. Analiza 545 gena pretraživanih izolata.	70
Slika 23. Filogenetsko stablo. Analiza 545 gena svih pretraživanih izolata i odgovarajućih referentnih sojeva.	71
Slika 24. Filogenetska analiza. Analiza 545 gena izolata izdvojena s područja RH (n=37) i pripadajućih referentnih sojeva.	72
Slika 25. Filogenetsko stablo. Analiza 545 gena pretraživanih izolata koji pripadaju genomskoj vrsti <i>L. interrogans</i> i izdvojeni su s područja RH i odgovarajućih referentnih sojeva. <i>L. biflexa</i> korištena je kao vanjska skupina.	73
Slika 26. Filogenetsko stablo. Analiza 545 gena pretraživanih izolata koji pripadaju genomskoj vrsti <i>L. kirschneri</i> i izdvojeni su s područja RH i odgovarajućih referentnih sojeva. <i>L. biflexa</i> korištena je kao vanjska skupina.	74
Slika 27. Minimalo razgranuto stablo svih izolata dostupnih u BIGSdb bazi podataka koji pripadaju genomskoj vrsti <i>L. interrogans</i>	76
Slika 28. Minimalo razgranuto stablo svih izolata dostupnih u BIGSdb bazi podataka koji pripadaju genomskoj vrsti <i>L. kirschneri</i>	77
Slika 29. Minimalo razgranuto stablo koje pokazuje geografsku rasprostranjenost klonalnih grupa.	78
Slika 30. Minimalo razgranuto stablo koje pokazuje međuodnose izolata koji pripadaju različitim klonalnim grupama, a koji su izdvojeni s područja Europe.	79
Slika 31. Minimalo razgranuto stablo svih izolata s područja Republike Hrvatske dostupnih u BIGSdb bazi podataka.	80
Slika 32. Filogenetsko stablo. Analiza 545 gena pretraživanih izolata seroloških skupina Pomona i usporedba dobivenih klonalnih grupa.	82
Slika 33. Slika sekvenci gena <i>lic12008</i> u računalnom programu MEGA 11, za svakipretraživani izolat genomске vrste <i>L. interrogans</i>	83
Slika 34. Grafički prikaz vjerojatnosti preživljavanja pretraživane populacije u odnosu na genomsku vrstu.	87

Slika 35. Grafički prikaz vjerojatnosti preživljavanja pretraživane populacije u odnosu na klonalnu grupu.....	88
Slika 36. Grafički prikaz vjerojatnosti preživljavanja pretraživane populacije u odnosu na serovar.	89

9.2. Popis tablica

Tablica 1. Usporedba veličine genoma za četiri odabrane genomske vrste unutar roda <i>Leptospira</i>	12
Tablica 2. Organski sustavi, kliničko očitovanje i dijagnostički parametri	23
Tablica 3. Hiperimuni serum i referentnih sojeva <i>leptospira</i> korišteni za određivanje serološke skupine izolata <i>leptospira</i> iz pasa	35
Tablica 4. MLST ciljni geni	41
Tablica 5. Rezultati mikroskopske aglutinacije za određivanje seroloških skupina izolata hiperimunim serumom s najvišim titrom protutijela.....	51
Tablica 6. Popis ciljnih gena s veličinom umnoženog proizvoda i polimorfni sljedova gena unutar 6L MLST sheme	54
Tablica 7. Matrica identičnosti pretraživanih izolata.	56
Tablica 8. Matrica identičnosti. Prikaz međusobnih odnosa izolata određenog serovara s referentnim sojem istog serovara.	57
Tablica 9. Prikaz izolata, pripadajućeg tipa sekvence (cgST) i klonalne grupe (CG) dobivenih cgMLST-om.....	66
Tablica 10. Sekvenciranje ključnih regija genoma. Prikaz duljine sekvenci, udjela G+C baza te broja označenih alela i lokusa	67
Tablica 11. Prikaz kliničkih očitovanja pretraživane populacije pasa u odnosu na genomsku vrstu, klonalnu grupu i serovar.....	86

10. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Iva Zečević, državljanka Republike Hrvatske, rođena je 17. srpnja 1989. godine u Zagrebu. Osnovnu i srednju školu pohađala je u Zagrebu, a na Veterinarskom fakultetu diplomirala je 2018. godine. Tijekom većeg dijela studija volontira na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Klinički se usavršava i na Veterinarskom fakultetu u Beču i na Klinici za male životinje Anicura u Hollabrunn-u, Austrija. Po završetku studija zapošljava se na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i od tad aktivno sudjeluje u stručno-kliničkom radu te nastavi, znanstvenom i laboratorijskom radu Zavoda. Nastavu izvodi na pet predmeta; „Zarazne bolesti domaćih životinja“, „Zoonoze“, „Prijetelje zarazne bolesti“, „Ambulantna klinika“ i „Bolesti i liječenje pasa i mačaka“ na hrvatskom i engleskom studiju. Njezini glavni znanstveni i stručni interes su zarazne bolesti pasa i mačaka, s naglaskom na leptospirozu pasa te infekcije respiratornim i hemotropnim mikoplazmama u pasa i mačaka. 2020. godine upisuje poslijediplomski doktorski studij iz Veterinarskih znanosti na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu, a znanstveno se usavršava 2022. godine na Institutu Pasteur u Parizu, Francuska.

Članica je Hrvatske veterinarske komore, Hrvatskog mikrobiološkog društva te Federation of European Microbiological Societies. Dosad je kao autorica ili koautorica objavila preko 25 znanstvenih i stručnih radova te je sudjelovala na više međunarodnih i domaćih kongresa.

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

HABUŠ, J., V. STEVANOVIĆ, D. HUBER, Z. ŠTRITOF, J. BORAS, K. MARTINKOVIĆ, M. PERHARIĆ, **I. ZEČEVIĆ**, S. HAĐINA (2024): Herpes simplex virus type 1 infection in pet marmoset – case report. Vet. arhiv 94, 87-94.

ZEČEVIĆ, I., M. PICARDEAU, S. VINCE, S. HAĐINA, M. PERHARIĆ, Z. ŠTRITOF, V. STEVANOVIĆ, I. BENVIN, N. TURK, I. LOHMAN JANKOVIĆ, J. HABUŠ (2024): Association between Exposure to Leptospira spp. and Abortion in Mares in Croatia. Microorganisms 2024, 12(6), 1039; <https://doi.org/10.3390>

BENVIN, I., V. MOJČEC PERKO, M. MAURIĆ MALJKOVIĆ, J. HABUŠ, Z. ŠTRITOF, S. HAĐINA, M. PERHARIĆ, **I. ZEČEVIĆ**, M. CVETNIĆ, N. TURK (2023): Serological Surveillance of Equine Leptospirosis in Croatia in the Period From 2012 to 2022: A Key Insight Into the Changing Epizootiology. J. Equine. Vet. Sci.; Aug:127:104844. doi:10.1016.

KAMBER, M., V. MOJČEC PERKO, Z. ŠTRITOF, J. HABUŠ, V. STEVANOVIĆ, M. PERHARIĆ, K. MARTINKOVIĆ, LJ. BARBIĆ, **I. ZEČEVIĆ**, I. BENVIN, S. HAĐINA (2023): Detection of *TPI*, *TCDA* and *TCDB* genes of *Clostridioides difficile* in feces of healthy dogs and dogs with clinical signs of gastrointestinal disease. Book of Abstracts: 10th International Congress „Veterinary Science and Profession”. Brkljača Bottegaro, Nika; Lukač, Maja; Vrbanac, Zoran (ur.). Zagreb: Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 147-147.

BENVIN, I., **I. ZEČEVIĆ**, K. MARTINKOVIĆ, S. HAĐINA, J. HABUŠ, Z. ŠTRITOF, I. ČORIĆ, V. STEVANOVIĆ, N. TURK, M. PERHARIĆ (2023): FeLV associated non-regenerative anaemia with co-infection with haemotropic mycoplasma – case report. Book of Abstracts: 10th International Congress „Veterinary Science and Profession”. Brkljača Bottegaro, Nika; Lukač, Maja; Vrbanac, Zoran (ur.). Zagreb: Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 92-92.

DOJČINOVIĆ, E., D. CAUŠEVIĆ, S. PINTARIĆ, S. HAĐINA, J. HABUŠ, M. PERHARIĆ, M. CVETNIĆ, **I. ZEČEVIĆ**, I. BENVIN, Z. ŠTRITOF (2023): Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from urine of dogs with urinary tract infections. Book of Abstracts: 10th International Congress „Veterinary Science and Profession”. Brkljača Bottegaro, Nika; Lukač, Maja; Vrbanac, Zoran (ur.). Zagreb: Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 87-87.

ZEČEVIĆ, I., S. HAĐINA, J. HABUŠ, K. MARTINKOVIĆ, Z.ŠTRITOF, V. STEVANOVIĆ, I. BENVIN, H. CAPAK, M. PERHARIĆ (2023): Therapeutic effect of the nucleoside analog GS-441524 in a cat with feline infectious peritonitis. Book of Abstracts: 10th International Congress „Veterinary Science and Profession”. Brkljača Bottegaro, Nika; Lukač, Maja; Vrbanac, Zoran (ur.). Zagreb: Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 82-82.

- PERHARIĆ, M., B. JAGEC, J. HABUŠ, S. HAĐINA, Z. ŠTRITOF, V. STEVANOVIĆ, I. BENVIN, **I. ZEČEVIĆ** (2023): Epizootiology of retroviral infections in stray cats. Book of Abstracts: 10th International Congress „Veterinary Science and Profession”. Brkljača Bottegaro, Nika; Lukač, Maja; Vrbanac, Zoran (ur.). Zagreb: Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 82-82.
- FUŠ, K., S. PINTARIĆ, S. HAĐINA, J. HABUŠ, M. PERHARIĆ, M. CVETNIĆ, **I. ZEČEVIĆ**, I. BENVIN, Z. ŠTRITOF (2023): Beta-hemolytic streptococci isolated from horses in Croatia. Book of Abstracts: 10th International Congress „Veterinary Science and Profession”. Brkljača Bottegaro, Nika; Lukač, Maja; Vrbanac, Zoran (ur.). Zagreb: Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 61-61.
- STAREŠINA, V., M. PERHARIĆ, **I. ZEČEVIĆ**, I. BENVIN, K. MARTINKOVIĆ, Z. MILAS (2022): Vezikularni stomatitis. Veterinarska stanica 53 (5), 637-643.
- ZEČEVIĆ, I.**, M. PERHARIĆ, Z. ŠTRITOF, S. HAĐINA, I. BENVIN, O. SMOLEC, J. HABUŠ (2022): Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus pseudointermedius* isolated from dogs with pyoderma and otitis externa. Book of Prossiding: „Conference – Antimicrobial Resistance in Veterinary Medicine – Current State and Perspectives 2022“. Ružić, Zoran; Galić, Ivan (ur.). Novi Sad: Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, 72-77.
- BENVIN, I., V. MOJČEC PERKO, J. HABUŠ, Z. ŠTRITOF, V. STAREŠINA, S. HAĐINA, M. PERHARIĆ, **I. ZEČEVIĆ**, LJ. BARBIĆ, V. STEVANOVIĆ, N. TURK (2022): Monitoring of equine leptospirosis in Croatia in the period frpm 2012 to 2022. 12th International Leptospirosis Society Conference 2022, Bangkok, Thailand, 97.
- STEVANOVIĆ, V., I. TABAIN, T. VILIBIĆ-ČAVLEK, M. MAURIĆ MALJKOVIĆ, I. BENVIN, Ž. HRUSKAR, S. KOVAČ, I. ŠMIT, G. MILETIĆ, S. HAĐINA, V. STAREŠINA, L. RADIN, V. PLICHTA, B. ŠKRLIN, Z. VRBANAC, M. BRKLJAČIĆ, M. CVETNIĆ, J. HABUŠ, K. MARTINKOVIĆ, **I. ZEČEVIĆ**, G. JURKIĆ, I. FERENČAK, Z. ŠTRITOF, M. PERHARIĆ, L. BUCIĆ, LJ. BARBIĆ (2021): The

emergence of SARS-CoV-2 within the dog population in Croatia: host factors and clinical outcome. *Viruses* 13(8): 1430. doi: 10.3390/v13081430

KAJMIĆ, A., A. JUTRIŠA, V. MOJČEC PERKO, J. HABUŠ, S. HAĐINA, S. PINTARIĆ, V. STEVANOVIĆ, M. PERHARIĆ, K. MARTINKOVIĆ, **I. ZEČEVIĆ**, M. CVETNIĆ, I. BENVIN, Z. ŠTRITOF (2021): High carriage rate of methicillin-resistant staphylococci in small animal veterinary clinicians – indirect evidence of zoonotic transmission. Book of Abstracts: 9th International Congress „Veterinary Science and Profession”. Brkljača Bottegaro, Nika; Lukač, Maja; Zdolec, Nevijo; Vrbanac, Zoran (ur.). Zagreb: Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 46-46.

HAĐINA, S., V. MOJČEC PERKO, A. CICMAK, Z. ŠTRITOF, J. HABUŠ, V. STAREŠINA, I. BENVIN, V. STEVANOVIĆ, M. PERHARIĆ, K. MARTINKOVIĆ. **I. ZEČEVIĆ**, LJ. PINTER (2021): Disk diffusion susceptibility testing of *Malassezia pachydermatis* and *Candida* spp. Isolated from animals against three most commonly used antifungal drugs. Journal of Fungi, Conference report – 10th Trends in Medical Mycology Held on 8 to 11 October 2021, Aberdeen, Scotland, ECMM; P370, 313-314.

BENVIN, I., V. STEVANOVIĆ, S. KOVAČ, A. ŠKRINJARIĆ, V. STAREŠINA, K. MARTINKOVIĆ, **I. ZEČEVIĆ**, S. HAĐINA, J. HABUŠ, Z. ŠTRITOF, M. PERHARIĆ, M. CVETNIĆ, N. TURK, Z. MILAS, LJ. BARBIĆ (2021): Aetiology of viral gastroenteritis in dogs – prevalence and risk factor. Book of Abstracts: 9th International Congress „Veterinary Science and Profession”. Brkljača Bottegaro, Nika; Lukač, Maja; Zdolec, Nevijo; Vrbanac, Zoran (ur.). Zagreb: Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 90-90.

CVETNIĆ, M., V. MOJČEC PERKO, D. BROZIĆ, S. PINTARIĆ, S. HAĐINA, J. HABUŠ, V. STEVANOVIĆ, M. PERHARIĆ, K. MARTINKOVIĆ, **I. ZEČEVIĆ**, I. BENVIN, Z. ŠTRITOF (2021): Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter upsaliensis* isolated from dog feces. Book of Abstracts: 9th International Congress „Veterinary Science and Profession”. Brkljača Bottegaro, Nika; Lukač, Maja; Zdolec, Nevijo; Vrbanac, Zoran (ur.). Zagreb: Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 45-45.

ZEČEVIĆ, I., Z. ŠTRITOF, S. HAĐINA, V. STEVANOVIĆ, M. PERHARIĆ, I. BENVIN, M. CVETNIĆ, K. MARTINKOVIĆ, J. HABUŠ (2021): Therapeutic potential of fecal microbiota translocation in dogs. Book of Abstracts: 9th International Congress „Veterinary Science and Profession”. Brkljača Bottegato, Nika; Lukač, Maja; Zdolec, Nevijo; Vrbanac, Zoran (ur.). Zagreb: Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 95-95.

ČORDAŠ, R., V. MOJČEC PERKO, Z. ŠTRITOF, S. HAĐINA, N. TURK, I. ZEČEVIĆ, M. PERHARIĆ, Z. MILAS, J. MARGALETIĆ, M. VUCELJA, M. BOLJFETIĆ, J. HABUŠ (2020): Mišoliki glodavci kao rezervoari leptospiroze. Hrvatski veterinarski vjesnik 28, 38-44.

ZEČEVIĆ, I., Z. ŠTRITOF, S. HAĐINA, V. STEVANOVIĆ, K. MARTINKOVIĆ, M. PERHARIĆ, L. RADMANIĆ, J. HABUŠ (2019): Trapped neutrophil syndrome – a case report. Book of Abstracts: 8th International Congress „Veterinary Science and Profession”. Brkljača Bottegato, Nika; Zdolec, Nevijo; Vrbanac, Zoran (ur.). Zagreb: Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 90-90.

KUNIĆ V., V. MOJČEC PERKO, Z. ŠTRITOF, S. HAĐINA, J. HABUŠ, V. STEVANOVIĆ, K. MARTINKOVIĆ, L. RADMANIĆ, I. ZEČEVIĆ, M. PERHARIĆ (2019): Molecular diagnostics and phylogenetic analysis of feline immunodeficiency virus env gene in naturally infected cats in Croatia. Book of Abstracts: 8th International Congress „Veterinary Science and Profession”. Brkljača Bottegato, Nika; Zdolec, Nevijo; Vrbanac, Zoran (ur.). Zagreb: Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, 88-88.