



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

Marinela Tadić

**ISTRAŽIVANJE ANIMALNIH REZERVOARA
LEPTOSPIROZE UNUTAR ATIPIČNOG
PRIRODNOG ŽARIŠTA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



University of Zagreb
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Marinela Tadić

**Tracking animal reservoirs of leptospirosis
within atypical natural foci**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2025



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

Marinela Tadić

**ISTRAŽIVANJE ANIMALNIH REZERVOARA
LEPTOSPIROZE UNUTAR ATIPIČNOG
PRIRODNOG ŽARIŠTA**

DOKTORSKI RAD

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš

Zagreb, 2025.



University of Zagreb
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Marinela Tadić

**TRACKING ANIMAL RESERVOIRS OF
LEPTOSPIROSIS WITHIN ATYPICAL
NATURAL FOCI**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Assoc. Prof. Josipa Habuš, DVM, PhD

Zagreb, 2025

IZJAVA

,

Ja, Marinela Tadić, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat
mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima do
onih koji su navedeni u radu.

(potpis studenta)

Zagreb, 2025. godine

Ovaj doktorski rad izrađen je na Sveučilištu u Zagrebu, Veterinarskom fakultetu, Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Josipe Habuš, a u okviru doktorskog studija Veterinarske znanosti.

Predstojnik: prof. dr. sc. Vilim Starešina

Doktorski rad predan je na ocjenu Vijeću doktorskoga studija i prihvatanje od strane Fakultetskog vijeća Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, s ciljem stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz znanstvenog područja Biomedicina i zdravstvo, polja Veterinarska medicina, grane Veterinarsko javno zdravstvo i sigurnost hrane.

ZAHVALE

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

Hvala dr. sc. Vesni Mojčec Perko na izuzetnoj ljubaznosti, strpljenju, poučavanju i stručnoj pomoći.

Posebno zahvaljujem prof. dr. sc. Deanu Konjeviću, dipl. ECZM što mi je omogućio provođenje istraživanja u sklopu njegovog projekta "Zdravlje divljači i zoonotski potencijal na području Parka prirode Medvednica" te pomogao sa statističkom obradom podataka.

Veliko hvala dr. sc. Miljenku Bujaniću na savjetima, potpori i stručnoj pomoći.

Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom na podršci. Veliko hvala prof. dr. sc. Ljubi Barbiću i izv. prof. dr. sc. Vladimiru Stevanoviću na razumijevanju, savjetima i potpori u trenucima kad je bilo najteže. Hvala izv. prof. dr. sc. Selmi Pintarić na trudu i izuzetnoj ljubaznosti.

Zahvaljujem svom ravnatelju Milanu Orliću, prof. i tajnici Heleni Telar, dipl. iur. na razumijevanju.

Neizmjereno zahvaljujem svojoj obitelji jer je uvijek bila tu za mene. Bez nje ja ne bih bila ja i mojih postignuća ne bi ni bilo. Stoga ovu disertaciju posvećujem njima.

INFORMACIJE O MENTORICI

Mentorica izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš zaposlena je na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Akademski stupanj doktorice znanosti iz znanstvene grane Veterinarsko javno zdravstvo i sigurnost hrane stekla je 2013. godine obranivši doktorski rad pod naslovom: „Genska sljedivost patogenih bakterija roda *Leptospira* u prirodnom žarištu leptospiroze“. Njezina znanstvena i stručna djelatnost usmjerena je na istraživanje zaraznih bolesti domaćih životinja, posebice zoonoza i bolesti prirodnih žarišta. Voditeljica je predmeta Zarazne bolesti domaćih životinja, a sudjeluje u provođenju još pet predmeta integriranog preddiplomskog i diplomskog sveučilišnog studija na hrvatskom i engleskom jeziku. Pod njenim mentorstvom obranjene su dvije doktorske disertacije i 20 diplomskih radova. Izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš vodila je ili sudjelovala u realizaciji 12 nacionalnih i međunarodnih znanstveno-istraživačkih projekata. Aktivna je članica više domaćih i međunarodnih znanstvenih društava. Sudjelovala je u osnivanju Europskog društva za leptospirozu u kojem je od osnutka, 2012. godine, do danas obavljala dužnosti glavne tajnice, rizničarke i članice upravnog odbora. Dosad je kao autorica ili koautorica objavila 159 bibliotečnih jedinica znanstvenih i stručnih radova i jedan Sveučilišni udžbenik. Prema citatnom indeksu baze Scopus izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš citirana je ukupno 323 puta, s h indeksom 11.

SAŽETAK

ISTRAŽIVANJE ANIMALNIH REZERVOARA LEPTOSPIROZE UNUTAR ATIPIČNOG PRIRODNOG ŽARIŠTA

Dosadašnja istraživanja epizootologije leptospiroze djelomično su razjasnila epizootiološke cikluse i uloge glodavaca i domaćih životinja unutar, za leptospirozu, tipičnih prirodnih žarišta. S druge strane, stvarna uloga divljih životinja kao i način širenja bolesti unutar tzv. „atipičnih“ prirodnih žarišta još uvijek je nejasna i nedovoljno istražena, dijelom zbog izražene bioraznolikosti različitih ekosustava. Pretpostavka ovog istraživanja bila je da divlje svinje imaju određenu ulogu u održavanju i širenju infekcije u atipičnoj niši, a glavni cilj istraživanja bio je istražiti ulogu različite divljači, ali i glodavaca u održavanju leptospira unutar odabranog ekosustava. Prikupljeni uzorci divljih svinja, srna, lisica i mišolikih glodavaca analizirani su serološki, bakteriološki, molekularno i epidemiološki. Najviša seroprevalencija utvrđena je u divljih svinja (25,3%), a potom u lisica (15,8%). Seroprevalencija u srna bila je vrlo niska (2,4%), kao i, vrlo neočekivano, učestalost kliconoštva u mišolikih glodavaca koji se inače smatraju glavnim rezervoarima leptospiroze. Vjerojatnost nalaza serološki pozitivne divlje svinje bila je 13,56 puta veća u odnosu na srnu običnu ($OR = 13,559$; $p = 0,011$) te 20 puta veća u odnosu na mišolike glodavce zajedno ($OR = 20,00$; $p = 0,0001$). Vjerojatnost nalaza serološki pozitivne lisice bila je 11 puta veća u odnosu na mišolike glodavce ($OR = 11,06$; $p = 0,0001$). Vjerojatnost uzrokovanja infekcije u divljih svinja bila je najviša za serološku skupinu Pomona, odnosno Australis i Icterohaemorrhagiae u lisica. Točnost predviđanja pronalaska serološki pozitivne lisice iznosila je od 50 do 75 %. Kao rizični čimbenici istaknuti su veća količina oborina te niže okolišne temperature od prosjeka. Pretpostavljeni razlog ovakvog nalaza je viši udio glodavaca u prehrani lisica tijekom zime, što povećava i rizik od izloženosti leptospirama. Razvoj modela za predviđanje nalaza serološki pozitivnih divljih svinja nije polučio očekivani rezultat. Točnost predviđanja pozitivnih jediniki bila je izrazito slaba, vjerojatno zbog širokog areala kretanja i vertikalnih migracija ovih životinja koje uključuju ulazak u periurbana i urbana područja, što zasigurno mijenja dinamiku prijenosa, a samim time i pretkazivače korištene u ovom istraživanju. Ipak, u divljih svinja utvrđena je veća vjerojatnost

infekcije u ženki s porastom dobi, što upućuje na horizontalni, a možda i vertikalni put prijenosa unutar čopora. Dobiveni rezultati potvrđuju postavljenu pretpostavku, ali i ukazuju na to da se uloga određene životinjske vrste kao rezervoara može procijeniti samo uz poznavanje biologije vrste i niše u kojoj obitava, ne zanemarujući pritom izravni ili neizravni antropogeni utjecaj.

Ključne riječi: leptospiroza, rezervoari, atipična prirodna žarišta, divlja svinja, epidemiološka analiza

EXTENDED ABSTRACT

TRACKING ANIMAL RESERVOIRS OF LEPTOSPIROSIS WITHIN ATYPICAL NATURAL FOCI

Introduction

Leptospirosis is a re-emerging zoonosis with a complex aetiology and epizootiology. The genus *Leptospira* comprises an extremely heterogeneous group of bacteria. This heterogeneity is the result of continuing bacterial adaptation to the environment and the host. Leptospirosis is a typical natural foci disease. Different serovars are closely linked to particular animal species and ecological niches. The disease cycles in a given area mainly involve wild and domestic animals (reservoirs) that excrete the bacteria into the environment with urine. Nevertheless, the distribution and infection patterns will differ depending on the type of the natural foci and on the specific animal reservoirs. Patterns may also depend on climate change, extreme weather conditions, human behaviour, land use, agriculture, etc. The role of rodents and domestic animals in the maintenance of the different pathogenic *Leptospira* serovars within typical natural foci has been relatively well investigated, but data concerning the role of wildlife in the maintenance of the disease in the atypical natural foci are still scarce.

Wild boars can easily adapt to different life conditions. They are found in all parts of Europe and Asia, but also in North America and Africa. Due to the expansion of wild boar populations and their intrusion into suburban and urban areas, they should be considered a potentially important source of various zoonotic pathogens. Previous studies showed a high leptospirosis seroprevalence in wild boars as well as the occurrence of renal and genital colonisation.

The hypothesis of this study was that wild boars could have a role in maintaining certain *Leptospira* serovars in the ecological niche atypical of leptospirosis and in that way present direct or indirect public health threat. The research objectives were set accordingly – to investigate the prevalence of *Leptospira* infections in wild boars, roe

deer, foxes and mouse-like rodents in a hilly mountain habitat, to determine associated risk factors and the spatial and temporal patterns of leptospirosis in wild boars within the chosen study area.

Materials and methods

The hilly area of Medvednica Nature Park was chosen as a representative of atypical natural focus. This area is characterised by a high biodiversity of flora and fauna, and since it extends above the capital, it is also an area with pronounced human activity.

The samples were collected during seven hunting seasons (2012-2019) and the sample size, i.e. the minimum number of blood samples required, was calculated according to the cross-sectional study using the appropriate Cochran formula.

Blood samples from wild boars, red foxes and roe deer were collected immediately after killing by puncturing jugular vein. When that was not possible, the blood was taken from the heart, stored in test tubes in the refrigerator at +4°C and sent the next morning to the Leptospirosis laboratory of the Department of Microbiology and Infectious Diseases with Clinic at the Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb. The sampled wild boar kidneys were packed in transparent plastic bags, labelled and, if possible, delivered to the laboratory on the same day. If this was not possible, they were stored at -20°C until analysed.

For each animal sampled, the sex, age and exact location where the samples were taken were recorded. The previously collected data on the isolation of leptospires from the mouse-like rodents captured in the Medvednica Nature Park and the isolates stored at the Leptospirosis laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine were also analysed.

All blood samples were analysed using the microscopic agglutination test. If the kidneys of the wild boar were available, they were tested by real-time PCR. If the wild boar kidney samples were delivered within 24 hours, the kidney culture was also obtained by

inoculating the kidney tissue into Korthof nutrient media. Core genome multilocus sequence typing and subsequent phylogenetic analysis was used to type the isolate.

The epidemiological analysis included the calculation of the odds ratio (OR) with a 95 % confidence interval. The statistical significance was set at $p < 0.05$. Differences were analysed using Fisher's exact test, the chi-square test (χ^2) and the McNemar test. The climate data were analysed using percentiles. The Akaike Information Criterion programme was used to analyse and select the model. The model was chosen if $\Delta AIC < 2$. Forward stepwise logistic regression was used to calculate the prediction of leptospiral infection, and the log-likelihood ratio test was used to determine the significance of each model. The significance of the coefficients of the dependent variables was based on the χ^2 Wald statistic. The relative significance of the independent variables within each model was determined by multiplying the coefficients of the multiple logistic regression (β) by the standard deviation of each variable. Statistical analysis was performed using Statistica 13.5.0.17 (TIBCO Software Inc. 2018) and Decision Tools Suite 7.

Results

In this study, serological analysis of blood ($n=540$), bacteriological ($n=393$) and molecular examination of kidney tissue ($n=91$) of wild boars, red foxes, roe deer, mouse-like rodents and small mammals captured in the Medvednica Nature Park was carried out. The obtained data were analysed. The probability of finding serological positive results in this study was 13.56 times higher in wild boar than in deer (OR = 13.559; CI 95% from 1.8050 to 101.8565; $p = 0.011$) and 20 times higher than in small rodents (OR = 20.00; CI 95% from 7.7047 to 51.9166; $p = 0.0001$). The probability of finding serological positive results was 11 times higher in foxes than in small rodents (OR = 11.06; CI 95% from 3.1961 to 38.2903; $p = 0.0001$).

The prevalence in wild boars was 25.3 %. The positive samples could be found throughout the year, but with the highest prevalence at the end of autumn and the beginning of winter (November-December) and the lowest in summer (June-August). In

male wild boars the prevalence was 20.4 % and in female wild boars 32.3%. The prevalence also depended on the age of the wild boar, but only when sex was taken into account. The linear regression showed that the prevalence in females increased with age, while it decreased in males. In wild boars aged 0 to 1 and 1 to 2 years, the prevalence was not dependent on sex. In wild boars, the incidence of leptospirosis could be estimated according to the criterion $\Delta AIC < 2$ units using 11 models. However, the significance of the estimates was low and ranged between 9 and 13 %. The temperature percentiles were used in almost all models used to estimate the occurrence of leptospirosis. Only one model also used the precipitation percentile for the season in which the animal was killed. The probability of the Pomona serogroup causing infection in wild boars was significantly higher than the probability of infection with other confirmed serogroups, with the exception of the serogroup Australis. All wild boar kidney samples collected during the study were negative by PCR.

In red foxes, the prevalence was 15.8 %. For male foxes, the prevalence was 17.6 % and for females 20 %. The prevalence was 19.2 % in animals younger than 2 years and 16.6 % in animals older than 2 years. The highest prevalence was recorded in March. Three models were chosen to estimate the occurrence of leptospirosis in this animal species. Depending on the model, the estimate of the serological positive result was correct in 50-75 % of cases. Both temperature and precipitation percentiles were used in all three models. The most frequent presumptive infective serogroups were Australis and Icterohaemorrhagiae.

The prevalence in roe deer was 2.4 %. The only positive finding was a male roe deer in which the presumptive infective serogroup was Pomona.

In mouse-like rodents and small mammals, the total seroprevalence was 1.32 %, and of all tested species, a serologically positive reaction was detected in three yellow-necked mice and one common vole. A total of 373 kidney samples from mouse-like rodents and small mammals were examined by bacteriological examination, and bacteria from the genus *Leptospira* were successfully isolated from only one male yellow-necked mouse. Core genome multilocus sequence typing was used for molecular analysis and determined that the isolate belongs to genomospecies *L. kirschneri*, clonal group 73, serogroup Pomona and serovar Mozdok.

Discussion and Conclusions

The results of this study show that wild boars and red foxes are potentially interesting species for understanding the circulation of leptospires within the atypical natural foci. The highest seroprevalence was found in wild boars, then in foxes, while the seroprevalence in roe deer and the frequency of the carriers among mouse-like rodents were extremely low. The prevalence and frequency of infection in all species analysed during this research were lower than the those determined in Croatian lowland areas, which is probably due to the geomorphology of the soil, which, due to its structure, slope and drainage, does not support the survival of the leptospires in the environment.

During this research, it was again confirmed that when considering the obtained results, the biology of the studied animal species should always be taken into account. The probability analysis in wild boars demonstrated a higher seroprevalence in female animals, but only if the age of the animals is taken into account. These results indicate a higher seroprevalence in animals living in sounders (females and cubs) when leptospira infection spreads much more easily within the group, especially during some high risk activities such as wallowing. Nevertheless, it would be important to analyse the possibility, i.e. the frequency of vertical transmission of leptospirosis in wild boars in future studies. The development of the prediction model did not give the expected result. The accuracy of predicting which animals will be positive was extremely low, probably because of the wide area which wild boars use and migrations that also include entry into suburban and urban areas, as these facts certainly alter the transmission dynamics, increase the anthropogenic influence and as the result, change the precursors used in this study.

In the predictive models assessing the probability of finding the serologically positive foxes, the risk factors were the increased precipitation and temperatures lower than the average. These findings could be explained by higher portion of rodents in the foxes' diet in winter, which increases the risk of exposure to leptospires. The fact that the most common serogroups in foxes were Australis and Icterohaemorrhagiae, whose reservoirs are mouse-like rodents, i.e. rats, supports this hypothesis.

This study has shown that the potential of a particular species as a reservoir can only be assessed if the biology of the species and the ecological niche in which it lives are taken into consideration. Also, the direct or indirect anthropogenic influence must not be underestimated.

Keywords: leptospirosis, reservoirs, atypical natural foci, wild boar, epidemiological analysis

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA	3
2.1. Leptospiroza	3
2.1.1. Etiologija leptospiroze	4
2.1.2. Taksonomija, klasifikacija i tipizacija bakterija iz roda <i>Leptospira</i>	5
2.1.3. Epizootiologija leptospiroze	6
2.2. Biologija divlje svinje	9
2.2.1. Leptospiroza u divljih svinja	13
2.3. Lisica (<i>Vulpes vulpes</i>)	14
2.3.1. Leptospiroza u divljih mesojeda	17
2.4. Srna obična (<i>Capreolus capreolus</i>)	17
2.4.1. Leptospiroza u divljih preživača	20
2.5. Najzastupljenije vrste mišolikih glodavaca na području Republike Hrvatske	21
2.5.1. Leptospiroza u mišolikih glodavaca	26
2.6. Medvednica kao prirodno žarište zoonoza	29
3. OBRAZLOŽENJE TEME	31
4. MATERIJAL I METODE	33
4.1. Područje istraživanja	33
4.2. Prikupljanje uzoraka i analiza klimatskih čimbenika	35
4.3. Pretraživanje prikupljenih uzoraka	39
4.3.1. Test mikroskopske aglutinacije (MAT)	39
4.3.2. Izdvajanje uzročnika	40
4.3.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu	41
4.3.4. Metoda sekvenciranja ključnih regija genoma (engl. <i>Core genome multilocus sequence typing</i> , cgMLST)	43
4.4. Epidemiološka analiza	44
5. REZULTATI	48
5.1. Opći podatci	48

5.2. Analiza rezultata serološke pretrage na uzorcima podrijetlom od divljih svinja	49
5.3. Analiza rezultata serološke pretrage na uzorcima podrijetlom od lisica	55
5.4. Analiza rezultata serološke pretrage na uzorcima podrijetlom od srne obične i mišolikih glodavaca	58
5.5. Razvoj modela za predviđanje pojave leptospiroze	59
5.5.1. Divlja svinja	59
5.5.2. Lisica	62
5.6. Sekvenciranje ključnih regija genoma	63
6. RASPRAVA	66
7. ZAKLJUČCI	72
8. POPIS LITERATURE	73
9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA	91

POPIS KRATICA

-2LL – dvostruka vrijednost logaritamske vjerodostojnosti (engl. *two times log likelihood*)

bp – bazni par

CAAT – test unakrižne aglutinacije-adsorpcije (engl. *agglutination-adsorption test*)

cg – klonalna grupa (engl. *clonal group*)

cgMLST – metoda sekvenciranja ključnih regija genoma (engl. *core genome multilocus sequence typing*)

cgST – sekvencijski tip ključne regije genoma (engl. *core genome sequence type*)

DNAza – deoksiribonukleaza

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

DOBV – Dobrava virus

HGBS – hemoragijska groznica s bubrežnim sindromom

LPS – lipopolisaharid

MAT – test mikroskopske aglutinacije

MEGA 11 – računalni program za molekularnu gensku analizu (engl. *Molecular Evolutionary Genetic Analysis*)

MLST – metoda tipiziranja na osnovi multilokusnih sekvenci (engl. *multilocus sequence typing*)

MLVA – analiza lokusa koji sadrže različiti broj uzastopnih ponavljanja (engl. *multiple locus variable number of tandem repeat analysis*)

OR – omjer vjerojatnosti (engl. *odds ratio*)

PFGE – gel-elektroforeza u pulsirajućem polju (engl. *pulsed field gel electrophoresis*)

PUUV – Puumala virus

qPCR – lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real Time PCR*)

RNAza – ribonukleaza

WGS – sekvenciranje cijelog genoma (engl. *whole genome sequencing*)

χ^2 test – hi-kvadrat test

POPIS PRILOGA

Slika 1. Divlje svinje na hranilištu, krmače i prasad. (foto: D. Konjević).

Slika 2. Stanište divlje svinje, mlada branjevina. Vidljivi su tragovi rovanja. (Foto: D. Konjević).

Slika 3. Vepar, krmače i prasad u kontroliranom uzgoju. (foto: D. Konjević).

Slika 4. Jazbina u brijegu, na suhom i ocjeditom terenu (foto: D. Konjević).

Slika 5. Lisica. (foto: K. Krapinec i D. Konjević).

Slika 6. Srnjak, pomladak. (foto: D. Konjević).

Slika 7. Srna, ženka. (foto: D. Konjević).

Slika 8. Poljski miš. Izvor:

[https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/poljski_mis_\(apodemus_agrarius\)](https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/poljski_mis_(apodemus_agrarius))

Slika 9. Šumski miš. Izvor: <https://eunis.eea.europa.eu/species/11233>

Slika 10. Šumska voluharica. Izvor:

[https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/sumska_voluharica_\(myodes_glareolus\)](https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/sumska_voluharica_(myodes_glareolus))

Slika 11. Park prirode Medvednica. Izvor: <https://www.hps.hr/karta/>

Slika 12. Logistička regresija (izvor: BISTROVIĆ, 2018.).

Slika 13. Prikaz prevalencije (%; plavi stupci) i utvrđenih seroloških skupina (n; narančasti stupci) koje su uzrok infekcije, ukupno prema vrstama.

Slika 14. Lokacije odstrjela divljih svinja.

Slika 15. Godišnja dinamika analiziranih divljih svinja s rezultatima testa na leptospirozu.

Slika 16. Nalaz serološki pozitivnih (plavi stupci) i negativnih divljih svinja (narančasti stupci) prema dobnim kategorijama.

Slika 17. Odnos prevalencije serološki pozitivnih grla prema dobnoj kategoriji divljih svinja.

Slika 18. Prevalencija u mužjaka ovisno o dobi, linearna regresija.

Slika 19. Prevalencija u ženki ovisno o dobi, linearna regresija.

Slika 20. Učestalost vjerojatno infektivnih seroloških skupina u divljih svinja.

Slika 21. Lokacije odstrjela/uzorkovanja lisica.

Slika 22. Godišnja dinamika analiziranih lisica i rezultati testa na leptospirozu (pozitivno/negativno).

Slika 23. Vjerojatno infektivne serološke skupine utvrđene u lisica.

Slika 24. Lokacije odstrjela/uzorkovanja srne obične.

Slika 25. Filogenetsko stablo temeljeno na analizi 545 gena izdvojenog soja, drugih dosad prikupljenih i analiziranih sojeva s područje Republike Hrvatske, pripadajućih referentnih sojeva i *L. biflexa*, koja je korištena kao vanjska skupina. Stablo je dobiveno pomoću Neighbour joining algoritma, evolucijske udaljenosti izračunate su pomoću Tamura 3 parametra, a varijacija modelirana gama distribucijom. Ljestvica na dnu označava evolucijsku udaljenost.

Slika 26. Minimalno razgranato stablo koje prikazuje genetske veze svih izolata klonalne grupe 73 dostupnih u BIGSDB bazi podataka. Bojama su označene vrste domaćina iz kojih su sojevi izdvojeni, a veličina kruga određena je brojem izolata koje obuhvaća. Žutim krugom označen je izolat M-1391.

Tablica 1. Morfološke razlike podporodica Arvicolinae (voluharice) i Murinae (pravi miševi). Izvor: BJEDOV i sur. (2016.a).

Tablica 2. Veličina uzorka od divljih svinja, srne obične i lisice.

Tablica 3. Panel antigena korišten za izvođenje MAT-a.

Tablica 4. Početnice i proba korištene u lančanoj reakciji polimerazom u stvarnom vremenu (STODDARD, 2013.).

Tablica 5. Izbor modela procjene pojave leptospiroze u divlje svinje.

Tablica 6. Točnost procjene serološki pozitivnih jedinki i parametri modela procjene pojave leptospiroze u divlje svinje (koeficijenti označeni crvenom bojom ukazuju na statistički značajan utjecaj uz prag statističke znakovitosti $p < 0,05$).

Tablica 7. Izbor modela procjene pojave leptospiroze u lisice.

Tablica 8. Parametri modela procjene pojave leptospiroze u lisice (koeficijenti označeni crvenom bojom ukazuju na statistički značajan utjecaj uz prag signifikantnosti $p < 0,05$).

1. UVOD

Posljednje studije navode da godišnje od leptospiroze oboli više od milijun ljudi uz gotovo 60 000 smrtnih ishoda (COSTA i sur., 2015.), a negativni učinci na zdravlje domaćih životinja, osim prouzročene patnje, mogu imati značajne socio-ekonomske posljedice. Unatoč očitom medicinskom i veterinarskom značaju, pretpostavlja se da je leptospiroza i dalje poddijagnosticirana, najčešće zbog nepoznavanja svih kliničkih oblika bolesti i rizičnih čimbenika, ograničenog pristupa laboratorijskoj dijagnostici i/ili nedostatka učinkovitih sustava nadzora (BHARTI i sur., 2003.; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010.; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011.). Leptospiroza je tipična bolest prirodno žarišnog tipa, a različiti serovari leptospira neraskidivo su povezani s određenim životinjskim vrstama i biosustavima (MALKHAZOVA i sur., 2014.). Ciklus kruženja patogenih *Leptospira* unutar određenog žarišta uglavnom uključuje divlje ili domaće životinje koje djeluju kao rezervoari, izlučujući bakterije mokraćom u okoliš (HARTSKEERL i sur., 2011.). Ipak, epizootiološki i epidemiološki obrasci razlikovat će se ovisno o tipu prirodnog žarišta i prisutnosti određenih životinjskih rezervoara, ali i drugih rizičnih čimbenika kao što su klimatske promjene, ekstremni vremenski uvjeti, ljudsko ponašanje, korištenje zemljišta, poljoprivredne prakse i slično (DERNE i sur., 2011.; MIŠIĆ-MAJERUS i sur., 2017.; DOUCHET i sur., 2024.). Nedostatak epidemioloških modela, kao i alata za rano prepoznavanje i predviđanje epidemija, ograničava sposobnost planiranja, provedbe i održavanja učinkovitih mjera kontrole i prevencije (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003.; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010.; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011.).

Dosadašnja istraživanja epizootiologije leptospiroze većinom objašnjavaju načine prijenosa i povezane rizike koji uključuju glodavce i domaće životinje unutar tipičnih prirodnih žarišta (ELLIS, 2015.). Uloga divljači, kao i načini širenja bolesti unutar tzv. „atipičnih“ prirodnih žarišta još su uvijek nejasni i nedovoljno istraženi (HAAKE i LEVETT, 2015.).

Divlje svinje izrazito su prilagodljive na različite životne uvjete (JANICKI i sur., 2007.). Proširene su diljem Europe i Azije, a nešto manje populacije mogu se naći u Sjevernoj Americi i Africi. Zadnjih godina primijećena je ekspanzija populacije koja je rezultirala pojačanim prisustvom divljih svinja u suburbanim i urbanim područjima diljem Europe. Naravno, posljedica toga je intenzivniji kontakt divljih svinja s domaćim životinjama i ljudima, što predstavlja mogući rizik od prijenosa različitih zoonoza. Dosad provedena

istraživanja ukazuju na visoku seroprevalenciju leptospiroze u divljih svinja (CVETNIĆ i sur., 2003.; JANSEN i sur., 2007.; MILAS i sur., 2007.; SLAVICA i sur., 2007.; SLAVICA i sur., 2010.; MILAS i sur., 2013.; ŽMUDZKI i sur., 2016.; MACHADO i sur., 2021.; ROQUELO i sur., 2021.; ZAMIR i sur., 2022.) te mogućnost kolonizacije bubrežnih kanalića (CVETNIĆ i sur., 2003.; CILIA i sur., 2020.a; ROQUELO i sur., 2021.), ali i spolnog sustava (CILIA i sur., 2020.a,b).

Pretpostavka ovoga istraživanja je da divlje svinje imaju određenu ulogu u održavanju pojedinih serovara bakterije *Leptospira* spp. u atipičnim ekološkim nišama te da time posredno ili neposredno predstavljaju opasnost za zdravlje domaćih životinja i ljudi. Kako bi potvrdili pretpostavku postavljeni su sljedeći ciljevi istraživanja: utvrditi učestalost infekcije u divljači, točnije divlje svinje, srne obične i lisice te u mišolikih glodavaca unutar, za leptospirozu, atipičnog ekosustava; utvrditi ulogu spomenutih vrsta u održavanju određenih patogenih serovara unutar odabranog ekosustava te utvrditi rizične čimbenike povezane s učestalošću infekcije u divljih svinja. Park prirode Medvednica, dio koji pripada Gradu Zagrebu odabran je kao područje koje predstavlja, za leptospirozu, atipičnu ekološku nišu. Riječ je o malom, gorskom, ograničenom području u blizini glavnog grada koje ima dosta vodenih površina, prostor je veće aglomeracije divljih životinja, ali i prostor s pojačanom ljudskom aktivnošću.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Leptospiroza

Leptospiroza je jedna od geografski najproširenijih zoonoza od koje obolijevaju brojne životinjske vrste i čovjek. Zbog povećane pojavnosti i brojnih epidemija zabilježenih tijekom proteklih nekoliko godina ova bolest klasificirana je kao re-emergentna zoonoza što je čini značajnim izazovom u veterinarskoj medicini i javnom zdravstvu (HARTSKEERL i sur., 2011.). Iako postoje znatne razlike u prevalenciji ove bolesti u različitim geografskim područjima, ona se javlja i u urbanim i u ruralnim sredinama s različitim stupnjem ekonomskoga, političkoga i socijalnoga razvoja (FAINE i sur., 1999.), a globalne klimatske promjene, koje uzrokuju sve češće poplave, mogu uzrokovati sve češće pojave ove bolesti (LAU i sur., 2010.).

Uzročnici leptospiroze su patogene bakterije iz roda *Leptospira*, porodice *Leptospiraceae* unutar kojeg nalazimo izrazito heterogenu skupinu bakterija. Utvrđena heterogenost posljedica je prilagodbe leptospira okolišu i domaćinu kojeg nastanjuju (KMETY i DIKKEN, 1993.).

Leptospiroza u ljudi očituje se različitim kliničkim oblicima koji variraju od blagih do teških, praćenih oštećenjem bubrega i jetre, poremetnjama u zgrušavanju krvi i/ili plućnim hemoragijskim sindromom. Smrtnost je nažalost i dalje značajna te je uglavnom povezana s kašnjenjem u postavljanju dijagnoze do koje dolazi zbog nedostatka odgovarajuće kliničke sumnje, nedostupnosti odgovarajućih dijagnostičkih metoda i infrastrukture, ali i s drugim nedovoljno razjašnjenim čimbenicima kao što su veća patogenost određenih sojeva ili pak genetski određene imunopatološke reakcije domaćina (HAAKE i LEVETT, 2015.).

Leptospiroza je bolest koja se javlja i u većine domaćih životinja. Klinički znakovi razlikuju se ovisno o vrsti životinje, infektivnoj dozi, patogenosti soja i imunosnom statusu životinje. U većine farmskih životinja akutna faza infekcije većinom je supklinička, a najveći ekonomski gubici nastaju zbog kroničnih infekcija koje uzrokuju reproduktivne poremećaje. U konja se kronični oblici leptospiroze često povezuju i s razvojem rekurentnog uveitisa i posljedičnom sljepoćom. U pasa, s druge strane, tijekom akutne faze bolesti pojedine životinje očituju izrazito teške kliničke oblike bolesti, a klinički znakovi vrlo su slični onima koji se opisuju u ljudi (ELLIS, 2015.).

Za dijagnostiku leptospiroze rabe se različite serološke i molekularne metode od kojih sve imaju određene prednosti i nedostatke (LEVETT, 2001., 2004.; SCHREIER i sur.,

2013.). S obzirom da je liječenje leptospiroze daleko najuspješnije u onim slučajevima kad je dijagnoza postavljena u ranim stadijima bolesti preporuča se njihova komplementarna primjena. Pritom je izrazito važno da su liječnici i veterinari upoznati s epizootiologijom/epidemiologijom leptospiroze na njihovom geografskom području kako bi na vrijeme mogli prepoznati rizične čimbenike, posumnjati na leptospirozu i uzorkovati odgovarajući klinički materijal (SYKES i sur., 2022.). Razumijevanje vrlo kompleksne epizootiologije ove bolesti ključni je korak i u osmišljavanju mjera prevencije i kontrole ove bolesti. Upravo stoga će se u daljnjem tekstu detaljno prikazati dosadašnje spoznaje o etiologiji, taksonomiji te vrlo detaljno i o epizootiologiji odnosno epidemiologiji leptospiroze, kao i biologiji i ekologiji životinjskih vrsta na koje se odnosi ovo istraživanje.

2.1.1. Etiologija leptospiroze

Rod *Leptospira* osim patogenih obuhvaća i saprofitske i intermedijarne vrste, koje se međusobno razlikuju po svojoj otpornosti i uzgojnim svojstvima, ali i značajkama genoma. Sve leptospire su aerobne, gram-negativne spiralne bakterije koje slabo primaju anilinske boje pa se morfološka vizualizacija provodi pomoću mikroskopa s tamnim vidnim poljem.

Leptospire su dugačke, tanke i izuzetno pokretne. Prosječan promjer je 0,1 μm , a duljina može biti od 6 do 20 μm (CAMERON, 2015.). Za saprofitske vrste optimalna *in vitro* temperatura rasta je od 28 do 30°C, ali mogu rasti i na niskim temperaturama (11 do 13°C). Za patogene leptospire optimalna *in vitro* temperatura rasta također je od 28 do 30°C, razmnožavati se mogu i na 37°C, ali ne i na niskim temperaturama. Optimalni pH je od 7,2 do 7,6 (CAMERON, 2015.).

Vrijeme koje je potrebno da bi se broj patogenih leptospira udvostručio i *in vivo* i *in vitro*, uz uvjet da su prethodno prilagođene *in vitro* kulturi, je šest do osam sati, dok za patogene leptospire koje su tek izdvojene iz domaćina to vrijeme iznosi 14 do 18 sati. *In vitro* rast saprofitskih vrsta je brži – potrebno je nešto više od četiri sata da se njihov broj udvostruči (CAMERON, 2015.).

Preživljavanju leptospira pogoduju vlaga i umjerene temperature. Dokazano je da se pojedine vrste patogenih leptospira mogu umnažati u natopljenom tlu (YANAGIHARA i sur., 2022.), dok u suhom tlu ili na temperaturama nižim od 10°C ili višim od 34°C preživljavaju vrlo kratko. Leptospire ubija zamrzavanje, isušivanje ili izravna sunčeva svjetlost (LUNN, 2022.a), ne mogu preživjeti u morskoj vodi, a ne pogoduje im ni ako je pH tla niži od 6,2 ili viši od 8,0 (SUMANTA i sur., 2015.). Upravo stoga, područja uz rijeke te općenito na nižim

nadmorskim visinama smatraju se endemskim područjima u kojima se bolest najčešće pojavljuje. Međutim, leptospire su pronađene i u uzorcima uzetim iz šumskog tla na nadmorskoj visini višoj od 1200 m te iz tla temperature -2°C , ispod 40 cm snijega (YANAGIHARA i sur., 2022.).

Leptospire su vrlo osjetljive na većinu uobičajenih dezinficijensa (LUNN, 2022.b).

2.1.2. Taksonomija, klasifikacija i tipizacija bakterija iz roda *Leptospira*

Za razvrstavanje bakterija iz roda *Leptospira* koriste se dva klasifikacijska sustava: serološki i genomski. Na osnovi antigenih i genskih obilježja unutar roda razlikujemo 320 serovara (oko 260 patogenih) svrstanih u oko 29 seroloških skupina (DIKKEN i KMETY, 1978.; KMETY i DIKKEN, 1993.), odnosno 68 različitih genomskih vrsta (GUGLIELMINI i sur., 2019.).

Serološki klasifikacijski sustav temelji se na određivanju strukturalne heterogenosti površinskih lipopolisaharida (LPS), a za serološku distinkciju, s različitom razlučivosti koriste se test mikroskopske aglutinacije, hiperimuni serumi, specifična monoklonska protutijela i test unakrižne aglutinacije-adsorpcije (engl. *agglutination-adsorption test*, CAAT). Serovar se smatra osnovnim taksonom. Zbog dokazane povezanosti određenih serovara s pojedinim rezervoarima (SLAVICA i sur., 2007.; ROQUELO i sur., 2021.), uporaba ovog klasifikacijskog sustava pogodnija je za epidemiološke analize jer dokazivanje serovara donekle omogućuje i utvrđivanje izvora infekcije, a važno je i u imunoprofilaksi jer je unakrižna imunost zabilježena samo između srodnih serovara. Na temelju antigene sličnosti više serovara svrstava se u serološku skupinu. Serološke skupine u taksonomiji nemaju službeni status, ali se mogu odrediti uporabom jednostavnije metode – mikroskopske aglutinacije (LEVETT, 2015.), a njihovo utvrđivanje ipak u određenoj mjeri pomaže u epidemiološkim istraživanjima i dijelom u serološkoj dijagnostici bolesti.

Genomski klasifikacijski sustav koristi različite molekularne metode kako bi utvrdio sličnosti odnosno razlike u samom genomu, a osnovni taksonom koji dobijemo ovim klasifikacijskim sustavom je genomska vrsta. Zbog mogućnosti horizontalnog transfera LPS biosintetičkog lokusa među različitim sojevima *Leptospira* ova se dva klasifikacijska sustava međusobno ne poklapaju u potpunosti (GUGLIELMINI i sur., 2019.). Molekularne metode koje se najčešće koriste za tipizaciju *Leptospira* uključuju gel-elektroforezu u pulsirajućem polju (engl. *pulsed field gel electrophoresis*, PFGE) (GALLOWAY i LEVETT, 2008.), analizu lokusa koji sadrže različiti broj uzastopnih ponavljanja (engl. *multiple locus variable*

number of tandem repeat analysis, MLVA) (VAN BELKUM, 2007.) i metodu tipiziranja na osnovi multilokusnih sekvenci (engl. *multilocus sequence typing*, MLST) (AHMED i sur., 2006.). Ipak, sve ove metode imaju važna praktična ograničenja. PFGE ima najbolje rezultate u povezivanju oba klasifikacijska sustava, ali nije u širokoj uporabi zbog kompleksnosti metode, potrebe za skupom opremom i velikom količinom čiste DNK koja onemogućuje analize izravno u kliničkom materijelu. MLST metoda također je razvijena s ciljem povezivanja serološkog i molekularnog klasifikacijskog sustava, ali i kako bi se postigla veća genomska razlučivost. Opisane su tri različite MLST sheme i primijenjene na različite kolekcije izolata. Rezultati su bili obećavajući, ali sve tri metode imale su limitirajuću razlučivost kad se radilo o tipiziranju blisko srodnih izolata. Najnovije metode genotipizacije, čija se učinkovitost još uvijek istražuje, su ciljno sekvenciranje ključnih regija genoma (engl. *core genome multilocus sequence typing*, cgMLST) i sekvenciranje cijelog genoma (engl. *whole genome sequencing*, WGS) (GUGLIELMINI i sur., 2019.).

2.1.3. Epizootiologija leptospiroze

Infekcija u ljudi i životinja nastupa nakon izravnog ili neizravnog kontakta s mokraćom bolesnih životinja ili životinja kliconoša. Ovisno o vrsti domaćina, leptospire se mokraćom mogu izlučivati kraće ili duže vrijeme. Tijekom akutne faze leptospiroze moguć je transplacentarni prijenos (ZAVITSANOU i BABATSIKOU, 2008.), a kod životinja u laktaciji leptospire se mogu izlučivati i mlijekom (GALTON, 1959.). Zbog prisustva leptospira u reproduktivnom traktu, moguć je spolni prijenos (MAGAJEVSKI i sur., 2005.; SMYTHE, 2008.; HAMOND i sur., 2013.). Nedavna istraživanja upućuju na mogućnost da transplacentalni i spolni načini prijenosa možda i prevladavaju u područjima u kojima vlada suha i vruća klima, dakle u okolišima koji ne podržavaju preživljavanje i umnažanje leptospira van domaćina (BARNABÉ i sur., 2023., 2024.).

Leptospire ulaze u organizam primljive jedinice kroz sluznice ili preko ozlijeđene kože (GALTON, 1959.). Tijekom bakterijemije koja potom nastupa, a uglavnom traje sedam do deset dana, leptospire možemo dokazati u krvi i mnogim parenhimskim, ali i drugim organima (SYKES i sur., 2022.). Otprilike 7-14 dana nakon početka leptospiremijske, u serumu se može dokazati prisustvo specifičnih protutijela. Nastankom protutijela, leptospire postupno bivaju uklonjene iz krvi i većine organa, no u pojedinim organima kao što su primjerice bubrezi, reproduktivni trakt, oči ili središnji živčani sustav mogu zaostati. Upravo je

kolonizacija proksimalnih bubrežnih kanalića i posljedično intermitentno izlučivanje leptospira mokraćom glavni način održavanja i širenja leptospiroze.

Leptospiroza je usko vezana uz pojedine životinjske vrste određenog područja. Životinje koje su primljive za infekciju mogu se podijeliti u tri skupine: slučajni domaćini, evolucijski domaćini i rezervoari. Slučajni domaćini nakon infekcije najčešće pokazuju kliničke znakove bolesti, a nakon preboljenja kraće vrijeme izlučuju leptospire mokraćom. Kod evolucijskih domaćina došlo je do međusobne prilagodbe domaćina i određenog serovara pa je bolest često blagog oblika ili je infekcija latentna, a leptospire se u bubrežima tih životinja zadržavaju dulje vrijeme (FAINE i sur., 1999.). Pravi rezervoari su one vrste životinja koje nakon infekcije ne obole, ali često doživotno ostaju kliconoše. Glavni rezervoari leptospiroze su mišoliki glodavci i štakor. Ipak ne smije se zanemariti da važnu ulogu u održavanju ove bolesti imaju i druge divlje i domaće životinje kod kojih nakon infekcije dolazi do naseljavanja leptospira unutar proksimalnih bubrežnih kanalića i njihovog posljedičnog izlučivanja mokraćom (FAINE i sur., 1999.).

U ljudi, rizik infekcije ovisi o izloženosti. Neke osobe izložene su visokom riziku zbog svog zanimanja, okoliša u kojem žive ili svog životnog stila. Zbog svog zanimanja najizloženiji riziku su stočari i ratari (osobito oni koji uzgajaju rižu ili šećernu trsku), veterinari, mesari i vojnici. Ostale rizične skupine čine osobe koje su preživjele prirodne katastrofe (npr. poplave) (POULAKIDA i sur., 2024.) te osobe koje se bave sportskim aktivnostima koje uključuju kontakt s kopnenim vodama, primjerice triatlonom (WALKER, 2018.). Infekcija je češća u područjima s toplom i vlažnom klimom i endemska je u mnogim tropskim područjima. Epidemije u ljudi u tim područjima najčešće se bilježe nakon obilnih kiša i poplava. Pritom je veći rizik od infekcije utvrđen u ljudi s nižim socio-ekonomskim statusom koji žive u gusto naseljenim siromašnim područjima s lošim sanitarno higijenskim uvjetima. Očekuje se da će leptospiroza postati još veći globalni problem zbog demografskih promjena koje uključuju dodatno povećanje broja stanovnika urbanih, siromašnih, tropskih područja izloženih sve jačim olujama i poplavama koje su rezultat klimatskih promjena. U područjima s umjerenom klimom bolest je sezonska, javlja se uglavnom sporadično, ali opet s najvišom incidencijom nakon kišnih razdoblja (LUNN, 2022.a). Iako su velike epidemije u područjima umjerene klime relativno rijetke, opisane su nakon prirodnih katastrofa, ali i nakon većih triatlonskih natjecanja (MORGAN i sur., 2002.; WALKER, 2018.).

Istraživanje provedeno u Republici Hrvatskoj pokazalo je da je incidencija leptospiroze u ljudi jedna od najviših u Europi (1,53/100 000 stanovnika). U našoj se državi leptospiroza javlja endemski, uglavnom u kontinentalnim dijelovima i dolinama velikih

rijeka, a pojavi bolesti pogoduju temperature od 10 do 19,9 °C te količina oborina veća od 100 mm/m² (HABUŠ i sur., 2017.).

Leptospiroza predstavlja tipičnu zoonozu prirodno-žarišnog tipa čiji se uzročnik ovisno o određenim domaćinima i uvjetima okoliša genski mijenja i prilagođava (FAINE i sur., 1999.; HABUŠ, 2013.). Kao što je već prethodno spomenuto, pojedine životinjske vrste nose i izlučuju pojedine serovare leptospira u okoliš. Serovar Icterohaemorrhagiae tipično se povezuje sa smeđim štakorom (*Rattus norvegicus*) (ELLIS, 2015.). Serovari Ballum i Saxkoebing često se izdvajaju iz kućnog miša te povremeno iz štakora i laboratorijskih miševa (GALTON, 1959.). Sa svinjama se najčešće povezuju serovari Pomona, Bratislava i Tarassovi. Goveda su nositelji serovara Hardjo, a ovce njegovi alternativni rezervoari (ELLIS, 2015.). Psi se smatraju rezervoarima serovara Canicola (ELLIS, 2015.), dok se konji smatraju jednim od nositelja serovara Bratislava (HAMOND i sur., 2013.).

Uloga glodavaca i domaćih životinja u epidemiologiji i epizootologiji leptospiroze zasad je djelomično objašnjena (ELLIS, 2015.), ali uloga divljih životinja još uvijek nije, prvenstveno zbog bioraznolikosti faune u različitim ekološkim uvjetima. Kod istraživanja epizootologije ove bolesti treba se uvijek uzeti u obzir i činjenica da će različiti okolišni uvjeti utjecati na preživljavanje ove bakterije u okolišu te na taj način povećati ili smanjiti rizik od infekcije (HAAKE i LEVETT, 2015.). Kako bi pak procijenili utjecaj biotičkih čimbenika rizika vrlo je važno poznavati biologiju, intraspecijske i interspecijske odnose životinjskih vrsta prisutnih na određenom području. Pretpostavljeni načini širenja leptospiroze s divljači na ljude su izravni kontakt, pogotovo kad se radi o lovcima, veterinarima ili mesarima, ili neizravno putem kontaminiranog okoliša, osobito u slučajevima kad se radi o područjima s izraženom ljudskom aktivnošću. Izravni ili neizravni kontakt najčešći je način prijenosa bolesti s divljih na domaće životinje.

2.2. Biologija divlje svinje

Divlja svinja (*Sus scrofa*) pripada carstvu životinja (Animalia), koljenu svitkovaca (Chordata), potkoljenu kralježnjaka (Vertebrata), razredu sisavaca (Mammalia), redu parnoprstaša (Artiodactyla), porodici svinja (*Suidae*) i rodu *Sus*.

Podpopulacije divljih svinja razlikuju se ne samo morfološki, već i genetski. Kada je riječ o genetskim razlikama, u Europi se spominjalo prisustvo sedam podvrsta divlje svinje, ali prema nekim autorima čak i 16



Slika 1. Divlje svinje na hranilištu, krmače i prasad. (foto: D. Konjević)

podvrsta (ČEOVIĆ, 1953.; GROVES i GRUBB, 1993.) pa od tuda mogu varirati i podatci o njihovim tjelesnim dimenzijama (JANICKI i sur., 2007.). Novija istraživanja na našem području ukazuju da Dinarski masiv ipak ne predstavlja prepreku koja bi uzrokovala stvaranje mediteranske i kontinentalne subpopulacije divljih svinja (ŠPREM i sur., 2016.). Opisano je križanje s domaćim svinjama, ali prema prikupljenim genetskim podacima divlje i domaće svinje su međusobno genetski vrlo udaljene (ŠPREM, 2009.). LORENZINI i sur. (2020.) na temelju istraživanja pomoću STR i SNP analiza govore kako protok gena između domaće i divlje svinje nije nikada bio prekinut, što je dijelom i razlog genske raznolikosti.

Divlje svinje proširene su diljem Europe i Azije, dok nešto manje populacije nalazimo i u Sjevernoj Americi i Africi. U Republici Hrvatskoj ova vrsta naseljava njen gotovo cjelokupni teritorij, izuzev nekih otoka. To ju čini najzastupljenijom divljači, trenutno koja u ekonomskom pogledu nadmašuje sve ostale vrste divljači (ŠKALFA, 2000.; VRATARIĆ, 2001.). Prirodno stanište divlje svinje su vlažne šume s gustim grmljem, no ove su životinje izrazito prilagodljive na različite životne uvjete (Slika 2).



Slika 2. Stanište divlje svinje, mlada branjevina. Vidljivi su tragovi rovanja. (Foto: D. Konjević).

Njihova prilagodljivost zasigurno je jedan od uzroka ekspanzije populacije koja je rezultirala njihovim prisustvom ne samo u suburbanim (SLAVICA i sur., 2010.) već i u urbanim područjima diljem Europe (JANSEN i sur., 2007.).

Na brojnost populacije divlje svinje najviše utječe dostupnost hrane, osobito jako varijabilan urod žira (JĘDRZEJEWSKA i sur., 1997.). Ipak, uz obilnu prihranu tijekom zime utjecaj prirodne hrane je manji negoli se to očekuje.

Povećana brojnost populacije divljih svinja u europskim zemljama rezultirala je njihovom širenjem i na obrađena polja, osobito u regijama gdje kukuruz predstavlja glavni izvor hrane tijekom najvećeg dijela godine. Brzi porast brojnosti populacije tako je izravno povezan s povećanjem površina zemljišta na kojima se sadi kukuruz. S druge strane, veće prosječne temperature zraka tijekom kasne zime (veljača i ožujak) nisu rezultirale povećanjem brojnosti populacije. Dapače, brojnost je veća kad su temperature tijekom tog dijela godine niže (KOPIJ i PANEK, 2016.).

Divlje svinje (Slika 1, 3) imaju dobro razvijen prednji dio tijela, koji čini gotovo 70 % cijelog tijela. U visinu u području grebena divlje svinje mjere do 110 cm, duljina tijela doseže do 155 cm, a repa je oko 15 do 20 cm. Tjelesna masa ženki je do 150 kg, a mužjaci mogu biti teži od 200 kg (JANICKI i sur., 2007.). Tijelo im je prekriveno gustim

tamnosmeđim do crnim čekinjama, a poddlaka je kraća i mekša. Prasad (Slika 1, 3) je smeđe boje, a sa svake strane tijela ima po dvije tamne pruge. Ovu karakterističnu obojenost koja je prisutna u prasadi do prvoga linjanja nazivamo livreja. Nakon linjanja prasad dobiva boju karakterističnu za divlje svinje (BUJANIĆ i sur., 2024.).

Zubalo divlje svinje sadrži 44 zuba uz zubnu formulu I 3/3, C 1/1, P 4/4, M 3/3 te ovakvo zubalo nazivamo punim zubalom sisavaca (MILES i GRIGSON, 1990.). Prva tri



Slika 3. Vepar, krmače i prasad u kontroliranom uzgoju. (foto: D. Konjević)

pretkutnjaka građom su slična zubima mesojeda odnosno sekonodontni, dok četvrti pretkutnjak i svi kutnjaci građom odgovaraju zubima biljojeda. Zubalo svinja ima očnjake u obje čeljusti, a odlikuje ih spolni dimorfizam i trajni rast (elodontni zubi) (KONJEVIĆ i sur., 2007.). U veprova očnjake nazivamo

kljovama, pri čemu one u donjoj čeljusti nazivamo sjekačima, a one u gornjoj brusačima (JANICKI i sur., 2007.). Očnjake krmača nazivamo klicama i njihov rast je znatno slabiji od onog u mužjaka. Za razliku od klica koje su lovački ukras, kljove su lovački trofej i podložne su ocjenjivanju (FRKOVIĆ, 2006.). Gotovo dvije trećine duljine kljova smještene su unutar čeljusti. Pomoću kljova se može procijeniti dob životinje (duljina brusne plohe u centimetrima + 1 = dob vepa). Kljove im pomažu pri rovanju, u samoobrani te u borbi s drugim svinjama, ali i za obilježavanje teritorija (KONJEVIĆ i sur., 2007.). Za obranu prilikom borbi mužjacima služi slin – zaštitno vezivno tkivno zadebljanje potkožja plećke s elementima hrskavice (JANICKI i sur., 2007.). Prema klicama se ne može odrediti dob u godinama, već se jedino može krmače svrstati u dobne razrede (mlade, srednjobne i stare).

Životni vijek divljih svinja je čak do 25 godina, iako se u današnjem sustavu lovnoga gospodarenja ova dob iznimno rijetko dostiže, a lovnogospodarska dob iznosi oko sedam godina. Prema dobi se u lovnom gospodarenju dijele u pet kategorija: mladunčad – do

navršene prve godine života, pomladak – do navršene druge godine, mlado – do navršene treće godine, srednjedobno – u dobi od četiri i pet godina te zrelo – šest i više godina života. Odrasle ženke i mlade jedinke (mladunčad i pomladak) žive u krdima (KONJEVIĆ, 2005.) koja variraju u veličini, a predvode ih najstarije ženke. U dobi od dvije godine života mladi mužjaci budu istjerani iz krda od strane krmača te tvore male skupine koje u pravilu broje od tri do šest jedinki. Ove male skupine mužjaka će se postupno, s porastom dobi izgubiti te će odrasli mužjaci nastaviti živjeti samotnjačkim načinom života (TACK, 2018.). Odrasli veprovi se približavaju ženkama samo u vrijeme parenja. Parenje ili takozvano bucanje divljih svinja počinje krajem listopada i traje do kraja prosinca, a najintenzivnije je u studenom. U pravilu se prvo pare starije, a potom mlađe krmače (JANICKI i sur., 2007.). Mužjaci se bore za pravo na parenje, a pobjednik ostaje s čoporom ženki dulje vrijeme. Pored toga, najjači mužjaci mogu sudjelovati u parenju u više skupina ženki, što se pokazalo kao potencijalni rizični čimbenik u prijenosu uzročnika bolesti među pojedinim skupinama divljih svinja (FERNÁNDEZ-LLARIO i MØLLER, 2019.; KONJEVIĆ i sur., 2022.). Bređost u krmača traje oko 117 dana, nakon čega ženka na svijet donosi prema nekim autorima od 4 do 12 mladih (JANICKI i sur., 2007.), iako je taj broj u našim uvjetima u pravilu oko sedam, kao i u primjerice Njemačkoj (FRAUENDORF i sur., 2016.).

Istraživanje u Portugalu pokazalo je da je 96,3 % ženki koje su bile u gestaciji ili laktaciji težilo više od 40 kg. Niti jedna ženka u laktaciji nije bila u kategoriji mladunčadi (starosti godinu dana ili mlađe), a samo 7 % ženki te dobi bilo je gravidno. Prosječan broj fetusa i žutih tijela po ženki rastao je s povećanjem težine i starosti ženki (FONSECA i sur., 2010.).

Prije prasnja krmača se odvaja od krda te traži pogodno mjesto gdje će napraviti brlog. Prvih 14 dana nakon prasnja ženka napušta brlog samo radi hranjenja. Brlog služi za zaštitu od grabežljivaca, ali isto tako i za očuvanje tjelesne temperature prasadi koja je poikilotermna te teško održava tjelesnu temperaturu u početnim danima života. Ovisno o vremenskim prilikama prasad će kraće ili dulje vrijeme boraviti u brlogu, ali će u pravilu najkasnije nakon 14 dana početi pratiti majku i pridružiti se krdu. Prasad sisa do dva mjeseca starosti. U slučaju stradavanja majke druga krmača preuzima brigu oko preostalih prašćića.

Divlje svinje većinu dana provode skrivene u udubinama na zemlji ili gustišu (logama). Kad su aktivne kreću se livadama, oranicama, šumama i šumarcima (JANICKI i sur., 2007.). U mirnijim staništima s manje ljudske aktivnosti divlje svinje se viđaju i danju.

Za divlje svinje osobito su važna kaljužišta. Osim što jako vole kaljužanje, divlje svinje na taj način hlade tijelo i prekrivaju kožu slojem blata. Blato odbija kukce i

onemogućava disanje parazitima koji su se naselili na koži prije kaljužanja. Divlje svinje čiste kožu od blata i parazita češanjem o stabla.

Divlje svinje su oportunistički svejedi. Hrane se uglavnom biljem (zeljaste biljke, gomolji, veće sjemenke), a jedu i gujavice, ličinke kukaca i male glodavce. Često u plitkim barama brste vođeno bilje i jedu puževe i školjke. Tijekom jeseni se u hrastovim poplavnim šumama hrane žirom. Jedu i strvine, a posebno vole rovanje koje čini visoko motivirani oblik ponašanja.

2.2.1. Leptospiroza u divljih svinja

Jasno je definirana uloga domaćih svinja u održavanju pojedinih serovara leptospira. Međutim, i divlje svinje često su serološki pozitivne. Tako istraživanja u Republici Hrvatskoj (CVETNIĆ i sur., 2003.; MILAS i sur., 2007.; SLAVICA i sur., 2007.; SLAVICA i sur., 2010.; MILAS i sur., 2013.), ali i u drugim zemljama (JANSEN i sur., 2007.; ŽMUDZKI i sur., 2016.; MACHADO i sur., 2021.; ROQUELO i sur., 2021.; ZAMIR i sur., 2022.), ukazuju na vrlo visoku seroprevalenciju u divljih svinja, koja je vjerojatno posljedica povećane izloženosti uslijed njihovog načina života (npr. kaljužanje) i prehrane.

Istraživanja provedena u različitim zemljama svijeta prijavljuju seroprevalenciju u rasponu od 10,4 % zabilježenu u Poljskoj (ŽMUDZKI i sur., 2016.) do 53,85 % u Izraelu (ZAMIR i sur., 2022.). U Republici Hrvatskoj najniža seroprevalencija od 5 % zabilježena je na području Delnica i Bjelolasice, odnosno u Gorskom kotaru, a najviša od 46,8 % u nizinskim staništima dolina velikih rijeka (Posavina, Podunavlje i Podravina). Najčešće utvrđene vjerojatno infektivne serološke skupine bile su Australis, a potom Pomona i Tarassovi (SLAVICA i sur., 2010.), te u nešto manjeg broja divljih svinja serološke skupine Grippytyphosa i Icterohaemorrhagiae (CVETNIĆ i sur., 2003.; SLAVICA i sur., 2007.; MILAS i sur., 2013.).

Razlika u seroprevalenciji u divljih svinja utvrđena je i u Poljskoj. Najviša je bila u jugoistočnom dijelu države (21,5 %), ali i u visoko-urbaniziranim područjima kao što su Silesia (15,5 %) i Łódź (14,4 %). Najčešće utvrđene vjerojatno infektivne serološke skupine bile su Sejroe, Pomona, Grippytyphosa i Australis (ŽMUDZKI i sur., 2016.). Poljska nije jedina država u kojoj je visoka seropozitivnost dokazana i u visoko-urbaniziranim područjima. U Berlinu, Njemačka, dokazana je seropozitivnost od 18 %, a najčešće utvrđene vjerojatno infektivne serološke skupine bile su Pomona i Australis (JANSEN i sur., 2007.).

Zanimljivo je napomenuti da je u svim istraživanjima u kojima su uspoređivane seroprevalencije u divljih svinja i nekih drugih životinjskih vrsta na određenom geografskom području seroprevalencija bila viša u divljih svinja. U jugoistočnoj Francuskoj u divljih svinja iznosila je 18 %, a u lisica 6 % (ROQUELO i sur., 2021.). U Brazilu razlika u seroprevalenciji u divljih svinja i lovačkih pasa nije bila velika (što je i razumljivo budući da su lovački psi često bili u bliskom kontaktu s divljim svinjama), ali je ipak bila viša kod divljih svinja (12,2 %), a kod lovačkih pasa nešto niža (10,6 %) (MACHADO i sur., 2021.). U Izraelu je seroprevalencija u divljih svinja (53,85 %) bila skoro dvostruko viša od seroprevalencije u pašnih goveda (27,57 %) s istog područja (ZAMIR i sur., 2022.).

U prilog pretpostavci da je visok stupanj seroprevalencije posljedica ne samo izloženosti, već i kroničnog kliconoštva u divljih svinja idu i rezultati istraživanja koja pokazuju da se leptospire mogu u relativno visokom postotku dokazati u bubrezima divljih svinja. Prisustvo leptospira u bubrezima različitim dijagnostičkim metodama dokazano je u 8,4 % divljih svinja u Republici Hrvatskoj (CVETNIĆ i sur., 2003.), 9,6 % u Francuskoj (ROQUELO i sur., 2021.) i 11,15 % životinja u Italiji (CILIA i sur., 2020.a). Tipiziranjem izdvojenih sojeva u Italiji utvrđeno je da većina sojeva pripada serovaru Bratislava, odnosno serološkoj skupini Australis (CILIA i sur., 2020.a). Prisustvo leptospira nije dokazano samo u bubrezima, već i u reproduktivnim organima divljih svinja, što upućuje na veneralni, ali i mogući vertikalni prijenos leptospira u ovih životinja (CILIA i sur., 2020.a,b).

Divlje svinje izrazito su prilagodljive na različite životne uvjete, a posljednjih godina primijećena je ekspanzija populacije koja je rezultirala njihovim prisustvom u suburbanim i urbanim područjima diljem Europe. Naravno, posljedica je intenzivniji kontakt divljih svinja s domaćim životinjama i ljudima, što predstavlja mogući rizik od prijenosa leptospira, ali i drugih patogena.

2.3. Lisica (*Vulpes vulpes*)

Lisica (*Vulpes vulpes*) pripada carstvu životinja (Animalia), koljenu svitkovaca (Chordata), potkoljenu kralježnjaka (Vertebrata), razredu sisavaca (Mammalia), redu zvijeri (Carnivora), porodici pasa (*Canidae*) i rodu lisica (*Vulpes*).

Najrašireniji je mesožder na svijetu i može se naći u različitim staništima (LINDSØ i sur., 2022.). Izrazito je prilagodljiva i proširena po svim kontinentima sjeverne polutke



Slika 4. Jazbina u brijegu, na suhom i ocjeditom terenu (foto: D. Konjević)

(MACDONALD i REYNOLDS, 2008.).

U Republici Hrvatskoj lisica je prisutna u cijelom

kontinentalnom

području, kao i na dijelu otoka. Gledano prema nadmorskoj visini, rjeđa je na visinama preko 700 m,

prvenstveno zbog slabije prisutnosti sitnih glodavaca (JANICKI i sur., 2007.).

Prilagodljivost lisice vidljiva je ne samo u odabiru staništa, već i u odabiru jazbine. Lisičja jazbina je podzemna jama smještena uglavnom na suhim obroncima, nasipima napuštenih puteva, a često i u blizini cesta (Slika 4). Lisica se uglavnom koristi prirodnim jamama ili onima koje iskopa jazavac. Zaposjeda jednu glavnu i nekoliko rezervnih jama (JANICKI i sur., 2003.). U ljetnom periodu samo obilazi jame, a nastanjuje ih zimi, kada podiže mlade. Prilikom stvaranja staništa uključuje područja s različitim izvorima hrane.

Nakon uginuća lisice, njeno stanište zauzima druga, susjedna lisica. Ovisno o mogućnostima životni prostor lisice koleba od 10 do 5 000 ha. U uvjetima visoke gustoće populacije staništa su mala te iznose od svega 10 do 250 ha, dok primjerice u prostranstvima Kanade ili Rusije može biti i do 5 000 ha (JANICKI i sur., 2007.).



Slika 5. Lisica. (foto: K. Krapinec i D. Konjević)

Lisicu (Slika 5) karakterizira kitnjasti rep koji je dugačak kao polovica duljine njenog tijela. Tjelesna masa manja je od 10 kg. Krzno lisice je crvenosmeđe, a s donje strane

bijele boje. Donji dio obraza, vrata i prsa su bijele boje, dok su šape i uške crne boje (JANICKI i sur., 2007.). Pored ove temeljne boje krzna, lisice se mogu pojaviti i u drugim varijantama obojenosti, pa tako razlikujemo srebrnu lisicu, crnu lisicu i lisicu koja na području između plečki ima tamne dlake u obliku križa (KESTERČANEK, 1896.). Lisica ima 42 zuba, a zubalo je tipično za mesojede, odnosno predstavnike porodice pasa (HILLSON, 2005.). Njuh i sluh su vrlo dobro razvijeni, a vid nešto slabije. Vid je astigmatičan te dobro vidi samo predmete u pokretu, ostali predmeti joj nisu jasno vidljivi. Na mekušima ima mirisne žlijezde, a u analnoj regiji analne žlijezde.

Pretežno je aktivna noću, ali kada podiže mlade hranu traži i u jutarnjim satima. Za vrijeme parenja, graviditeta (koji traje od 50 do 52 dana) i kada podiže mlade (u leglu ih bude od četiri do sedam) živi u obiteljskoj zajednici, a izvan tog perioda samostalno ili, rjeđe, u paru. U situacijama veće aglomeracije lisica, kao što je to primjer u urbanim sredinama, moguće je naći više lisica istodobno u jazbini, što se u engleskoj terminologiji naziva "communal denning" (CAVALLINI, 1996.). Mužjak ponekad potpomaže othranu mladih na način da donosi hranu i ostavlja ju pred jazbinom. Mladi se osamostaljuju s četiri mjeseca starosti.

Lisica prosječno živi 10 do 12 godina. Odrasloj su lisici prirodni neprijatelji vuk i ris, ali za manje lisice opasnost predstavljaju i veće ptice grabljivice.

Lisica se u pravilu smatra oportunističkim grabežljivcem koji se koristi onom hranom koja mu je u određenom trenutku dostupna (WEBBON i sur., 2006.; AHMAD BHAT i sur., 2023.). Najčešće se ipak hrani miševima, voluharicama i drugim sitnim glodavcima. Plijen zakapa (odgovara joj prethodno fermentirano meso) ili ga odvlači u svoju jamu. Upravo taj neugodan miris plijena koji trune i općenito neurednost lisice smatra se razlogom koji prisili jazavca da napusti jazbinu (JANICKI i sur., 2007.). Lisica jede i voće (grožđe, šljive, šumsko voće), a hrani se i otpacima. Ovo se posebice uočava u slučajevima kada se lisice nastane u gradovima te se primarno orijentiraju na hranu antropogenog podrijetla (HANDLER i sur., 2020.). Ovakav izvor hrane ima za posljedicu podržavanje veće populacije lisica. Tako su primjerice CONTESSE i sur. (2004.) utvrdili kontinuirani porast populacije lisica u urbanim sredinama zbog hranjenja otpacima iz kućanstva. Učestalost hranjenja otpacima varira sezonski.

Za razliku od prijašnjih vremena, lovni pritisak na lisicu je danas znatno manji, a uz provedbu oralne vakcinacije lisica protiv bjesnoće i barem trenutnog iskorjenjivanja ove bolesti, brojnost lisica u Hrvatskoj je prilično stabilna i raste. Naime, bjesnoća se smatra jednim od glavnih čimbenika kontrole populacije lisica (DELCOURT i sur., 2022.). S druge

strane, pored lova, na današnju populaciju lisica utjecaj imaju šugavost i sve veća prisutnost čaglja (*Canis aureus*).

2.3.1. Leptospiroza u divljih mesojeda

Budući da se nalaze na vrhu hranidbenog lanca, divlji mesojedi dolaze u kontakt s leptospirama upravo preko svog plijena (MILLÁN i sur., 2009.) pa visoka seroprevalencija leptospiroze koja se u tih životinja često bilježi i nije iznenađujuća.

Raspon seroprevalencije leptospiroze u divljih mesojeda iznimno je širok. U euroazijskog risa (*Lynx lynx*) u Hrvatskoj primjerice nisu pronađena specifična protutijela (SLAVICA i sur., 2007.), dok je u Sloveniji istraživanje provedeno na uzorcima velikih mesojeda odnosno euroazijskog risa, sivog vuka (*Canis lupus*) i čaglja (*Canis aureus*) utvrdilo seroprevalenciju od čak 86 % (ŽELE-VENGUŠT i sur., 2021.). Skupni uzorci analizirani su i u sjevernom Pantanalu u Brazilu pri čemu je 42,7 % uzoraka divljih mesojeda bilo serološki pozitivno (SILVA PINTO JORGE i sur., 2011.). Istraživanje provedeno u Kaliforniji, SAD, pokazalo je da je ukupna prevalencija kod pume (*Puma concolor*) 46 %, a kod crvenog risa (*Lynx rufus*) 28 %. Infekcija divljih pripadnika porodice mačaka na tom području je uobičajena i široko rasprostranjena (STRAUB i sur., 2021.). U SAD-u je visoka seroprevalencija utvrđena i kod divljih kanida. U istraživanju provedenom na uzorcima prikupljenim u 46 država SAD-a te na Američkim Djevičanskim Otocima 27 % uzoraka porijeklom od divljih kanida bilo je pozitivno na leptospirozu (PEDERSEN i sur., 2018.).

U lisica seroprevalencija je u svim istraživanjima bila viša od 30 %, pri čemu se u Hrvatskoj kretala u rasponu od 31,25 % do 57,60 % (SLAVICA i sur., 2007.; MILAS i sur., 2013.), u Sloveniji 34 % (ŽELE-VENGUŠT i sur., 2021.), a u sjeveroistočnoj Njemačkoj oko 34 % (KUHNERT i sur., 2024.). Najčešće utvrđena vjerojatno infektivna serološka skupina u lisica u Republici Hrvatskoj i Sloveniji bila je serološka skupina Australis (SLAVICA i sur., 2007.; MILAS i sur., 2013.; ŽELE-VENGUŠT i sur., 2021.).

2.4. Srna obična (*Capreolus capreolus*)

Srna obična (*Capreolus capreolus*) pripada carstvu životinja (Animalia), koljenu svitkovaca (Chordata), potkoljenu kralježnjaka (Vertebrata), razredu sisavaca (Mammalia), redu parnoprstaša (Artiodactyla), porodici jelena (*Cervidae*) i rodu srna (*Capreolus*).

Srne naseljavaju šire područje Europe i Azije. Rasprostranjene su po cijeloj Hrvatskoj, a najviše ih živi u gorskoj i kontinentalnoj Hrvatskoj. Staništa srna su bjelogorični i miješani šumarci, proplanci i polja. Možemo ih naći i sasvim blizu naselja. Duljina tijela može doseći gotovo 1,5 m. Masa tijela mužjaka je u pravilu oko 25 kg, a ženke je nešto manja. Stražnji dio tijela je viši nego prednji pa su stoga srne izvrsni skakači, ali nisu dobri trkači na dulje staze (JANICKI i sur., 2007.). Na skočnim zglobovima, čelu, oko anusa i u međuprstnom prostoru imaju



Slika 6. Srnjak, pomladak. (foto: D. Konjević)

mirisne žlijezde (JANICKI i sur., 2003.). Krzno im je ljeti crvenosmeđe, a zimi kestenjastosive boje. Srne na stražnjici imaju bijelu dlaku srcolikog oblika, a srnjaci ovalnog. Te oznake nazivamo ogledalom (JANICKI i sur., 2007.). Lane je kestenjastosmeđe boje s bijelim pjegama koje nestaju nakon jesenskog linjanja. Mužjaci imaju rogovlje (Slika 6), a kržljavi roščići ponekad se mogu vidjeti kod stare i jalove ženke. Rogovlje je građeno od koštane tvari, a na jednoj grani u pravilu izrastu tri paroška, ali ih ponekad može biti i više. Mužjak odbacuje rogovlje u jesen i tada mu počinju rasti novi. U proljeće je novo rogovlje prekriveno specifičnom kožom koju se naziva bast, liko, runja, velvet ili čupa (JANICKI i sur., 2007.). Ova specifična koža je jako vaskularizirana i inervirana, a rastom prati rast rogovlja. Primarna joj je funkcija mehanička zaštita rogovlja, ali i pružanje osjećaja srnjaku koliki rogovi u stvarnosti jesu. Sluh i njuh su vrlo dobro razvijeni, a vid je astigmatičan. Imaju 32 zuba. Ženke postaju spolno aktivne s 14 mjeseci života, a mužjaci su spolno zreli prije nego napune godinu dana (SEMPÉRÉ i sur., 1996.). Srnjaci od proljeća zauzimaju teritorije

koje označavaju i brane od drugih mužjaka. Drugim riječima, srnjaci formiraju teritorije, a ne



Slika 7. Srna, ženka. (foto: D. Konjević).

hareme za razliku od primjerice jelena. Borbe su većinom pokazne, a ukoliko i dođe do prave borbe, u uvjetima slobodne prirode smrtni ishodi su iznimno rijetki. Pare se tijekom srpnja i kolovoza. Kod srna je uobičajena pojava embriotenije (usporeni razvoj zametka kao prilagodba stanišnim i klimatskim uvjetima) pa

je srna bređa i do devet mjeseci (JANICKI i sur., 2007.). Srna (Slika 7) lani u svibnju ili lipnju u pravilu dva, a ponekad jedno ili čak do tri mlada. Srna ostavlja lanad prikrivenu u travi (ali ona je uvijek u blizini) tijekom prvog tjedna života lanadi. To je najbolji način zaštite lanadi, jer im mirisne žlijezde tada nisu aktivne pa ih grabežljivci ne mogu pronaći dok god su mirni (KONJEVIĆ, 2008.). Za lanad opasnost predstavljaju lisice, divlje mačke, psi lutalice, čagljevi, orlovi, kune, divlje svinje, risevi i vukovi (NIKOLANDIĆ i DEGMEČIĆ, 2007.). Tijekom tog prvog tjedna srna posjećuje lanad samo zbog hranjenja. Srna je s lanetom cijele godine, a srnjaci žive odvojeno. Tijekom zime ili na otvorenim područjima srne se ponekad nalaze u manjim skupinama. Skupine su veće što je udaljenost od šume veća, ali su manje u područjima s pojačanom ljudskom aktivnošću (HEWISON i sur., 2001.). Razlog zbog kojeg su skupine veće što su srne udaljenije od šume je obrana od predatora (JEPSEN i TOPPING, 2004.). Sukladno tome, u društvenom životu srna razlikujemo porodično krdo koje čine srne i lanad, prošireno porodično krdo koje čine srne, lanad i lanad iz prošle godine te nagomilano krdo s većim brojem jedinki (JANICKI i sur., 2007.). Za razliku od jelena srne su teritorijalne životinje i nisu sklone većim migracijama. Srne su aktivne tijekom cijelog dana, ali najaktivnije su u sumrak i zoru. Prosječni životni vijek srna je od 13 do 15 godina, dok je lovnogospodarska starost oko sedam godina.

Srna je preživač. Hrani se isključivo biljem i to prvenstveno brstom mladica, grmljem, travom te šumskim plodovima.

2.4.1. Leptospiroza u divljih preživača

Serološka istraživanja divljih preživača upućuju na značajnije razlike u seroprevalenciji različitih vrsta. Tako u muflona (*Ovis musimon*) ni u Republici Hrvatskoj (SLAVICA i sur., 2007.) niti u Sloveniji (ŽELE-VENGUŠT i sur., 2021.) uopće nije utvrđeno prisustvo specifičnih protutijela. Mufloni preferiraju brežuljkasta i kršovita staništa, u kojima je vegetacija slabije razvijena, a količina vode manja; takvi uvjeti nisu pogodni za preživljavanje leptospira (SLAVICA i sur., 2007.).

Kod srne obične seroprevalencija je u Republici Hrvatskoj iznosila 6,07 % (SLAVICA i sur., 2007.), a u Sloveniji čak 25 % (ŽELE-VENGUŠT i sur., 2021.). Najviša seroprevalencija dokazana je kod jelena običnog (*Cervus elaphus*), a u Republici Hrvatskoj iznosila je 19,02 % (SLAVICA i sur., 2007.), odnosno Sloveniji čak 32 % (ŽELE-VENGUŠT i sur., 2021.). Na području talijanskih Alpa provedeno je istraživanje na jelenu običnom, srni običnoj i divokozi (*Rupicapra rupicapra*) te je dokazana infekcija samo u jelenu običnog. Zaključak tog istraživanja bio je da se divlji preživači na tom području ne mogu smatrati rezervoarima niti važnim izvorima infekcije ni za ljude niti za domaće životinje. Ipak, histopatološkom pretragom bubrega devet serološki pozitivnih jelena utvrđeno je da su dva jelena (22,2 %) imala promjene kompatibilne s blagim do umjerenim multifokalnim kroničnim limfoplazmatskim odnosno fibroznim tubulo-intersticijalnim nefritisom, koji je uglavnom zahvaćao kortikalni parenhim (ANDREOLI i sur., 2014.). S druge strane, u istraživanju provedenom na uzorcima prikupljenim u 46 država SAD-a te na Američkim Djevičanskim Otocima, 44,8 % uzoraka bjelorepog jelena (*Odocoileus virginianus*) bilo je serološki pozitivno na leptospirozu (PEDERSEN i sur., 2018.). Autori navedenog rada raspravljaju o mogućnosti da bi tako visoka prevalencija, uz činjenicu da je bjelorepi jelen geografski široko rasprostranjen, mogla upućivati na značajniji doprinos ove vrste u epidemiološkom ciklusu leptospiroze te o mogućem riziku kojem bi bili izloženi lovci u SAD-u ili pak domaće životinje s kojima bjelorepi jelen često dijeli pašnjake (PEDERSEN i sur., 2018.). Više seroprevalencije utvrđene u jelenu mogle bi se povezati s ponašanjem ove vrste, odnosno valjanjem u blatu ili lokvama tijekom vrućeg vremena kako bi se riješili vanjskih parazita i, u slučaju odraslih mužjaka, kako bi obilježili svoj teritorij tijekom sezone parenja.

Najčešće utvrđene vjerojatno infektivne serološke skupine u srna u Republici Hrvatskoj bile su Australis i Sejroe (SLAVICA i sur., 2007.), a u Sloveniji Icterohaemorrhagiae (ŽELE-VENGUŠT i sur., 2021.).

2.5. Najzastupljenije vrste mišolikih glodavaca na području Republike Hrvatske

Najzastupljenije vrste mišolikih glodavaca na području Republike Hrvatske su poljski miš (*Apodemus agrarius*), šumski miš (*Apodemus sylvaticus*), žutogrli šumski miš (*Apodemus flavicollis*), šumska voluharica (*Myodes glareolus*), livadna voluharica (*Microtus agrestis*) i poljska voluharica (*Microtus arvalis*).

Mišoliki glodavci prepoznatljivi su po dva para sjekutića trajnoga rasta, čija je caklina smještena samo s prednje (labijalne) strane zuba te obojena u žućkasto do crveno-smeđe zbog taloženja spojeva željeza (HILLSON, 2005.). Tijelo je cilindričnog oblika. Imaju po pet prstiju i razvijene pandže. Pretežno su biljojedi i većinom žive u skupinama. Imaju velik broj prirodnih neprijatelja, ali se i brzo razmnožavaju (BJEDOV i sur., 2016.a). Porastu brojnosti pogoduju blage i suhe zime te suša i visoke temperature. Također im odgovaraju parcele koje se ne obrađuju (nasipi, travnjaci i sl.) (BERIĆ, 2021.).

Podred mišolikih glodavaca (Myomorpha) pripada carstvu životinja (Animalia), koljenu svitkovaca (Chordata), potkoljenu kralježnjaka (Vertebrata), razredu sisavaca (Mammalia) i redu glodavaca (Rodentia).

Morfološke razlike podporodica *Arvicolinae* (voluharice) i *Murinae* (pravi miševi) prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Morfološke razlike podporodica *Arvicolinae* (voluharice) i *Murinae* (pravi miševi)
Izvor: BJEDOV i sur. (2016.a).

Podporodica: <i>Arvicolinae</i> (voluharice)	Podporodica: <i>Murinae</i> (pravi miševi)
sitne oči	velike i ispupčene oči
kratak rep (oko pola dužine tijela)	dugi rep (oko dužine tijela) tanko tijelo
zdepasto tijelo	duga zadnja stopala
male uši (djelom ili potpuno prekrivene krznom)	velike jasno vidljive uši



Poljski miš (*Apodemus agrarius*)

Poljski miš (Slika 8) pripada porodici miševa (*Muridae*) i vrsti poljski miš (*Apodemus agrarius*). Najraširenija je i najbrojnija vrsta roda *Apodemus* (YALKOVSKAYA i sur., 2022.). Međutim, sezonske i godišnje varijacije u broju jedinki mogu biti značajne (SPITZENBERGER i ENGELBERGER, 2014.).

Staništa poljskog miša su nizinske šume (osobito kad je bogat urod šumskog sjemena), vlažne livade i polja, parkovi, ali i kuće (osobito podrumi) te napušteni objekti (BJEDOV i sur., 2016.a).

Tijelo poljskog miša dugačko je od 8 do 12 cm, a rep od 7 do 8 cm. Mužjaci i ženke razlikuju se po veličini tijela dok su još jako mladi, ali kasnije te razlike postupno nestaju (BALČIAUSKIENĖ i BALČIAUSKAS, 2016.). Leđna strana krzna poljskog miša je smeđe

boje s jasno izraženom crnom linijom koja se proteže preko cijelih leđa. Navedena linija omogućava nepogrešivo raspoznavanje poljskog miša. Trbušna strana krzna je bijele boje (BJEDOV i sur., 2016.a). Poljski miš aktivan je danju i nije dobar penjač. Razmnožava se od veljače do prosinca, a tijekom tog razdoblja ima do tri legla s prosječno oko pet mladunaca u svakom (BJEDOV i sur., 2016.a). Gravidnost traje 20 dana. Mladunci su spolno zreli s dva mjeseca starosti. Prosječni životni vijek poljskog miša je godinu dana pa i više (UZUN, 2008.). Poljski miš hrani se travom, zeljastim biljem, žitaricama, bobicama, sjemenjem, ali i beskralježnjacima (BJEDOV i sur., 2016.a).



Slika 8. Poljski miš. Izvor: [https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/poljski_mis_\(apodemus_agrarius\)](https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/poljski_mis_(apodemus_agrarius))

Šumski miš (*Apodemus sylvaticus*)

Šumski miš (Slika 9) pripada porodici miševa (*Muridae*) i vrsti šumski miš (*Apodemus sylvaticus*). Naseljava područja do 2 500 m nadmorske visine (UZUN, 2008.). Staništa šumskog miša su šume, ali i livade, žitna polja te pješčane dine (BJEDOV i sur., 2016.a). Tijekom sezone razmnožavanja oba spola zauzimaju veću površinu teritorija nego tijekom ostatka godine, a površina koju mužjaci tada zauzimaju je puno veća od one koju zauzimaju ženke (TEW i MACDONALD, 1994.).



Slika 9. Šumski miš
Izvor: <https://eunis.eea.europa.eu/species/11233>

Tijelo šumskog miša dugačko je od 8 do 11 cm, a rep od 7 do 9 cm. Krzno je na leđima sivosmeđe boje, dok je trbuh svjetlije boje. Ispod vrata imaju pjegu žute boje (BJEDOV i sur., 2016.a).

Šumski miš aktivan je noću. Vrijeme boravka van gnijezda ovisi o temperaturi i mjesečini. Zimi je vrijeme provedeno izvan gnijezda duže što su temperature više i što je mjesečina slabija. U periodu između zime i ljeta, ukupno vrijeme provedeno izvan gnijezda duže je svake noći kako se ljeto približava. Ljeti izlaze u suton i rijetko se vraćaju u gnijezdo prije zore. Kad su temperature ispod 2-4°C na dužinu boravka van gnijezda više utječe temperatura, dok mjesečina ima jači utjecaj kad su vanjske temperature iznad 2-4°C (WOLTON, 1983.). Šumski miš je dobar penjač. Razmnožava se od ožujka do listopada i tijekom tog razdoblja ima dva do četiri legla s dvoje do devetero mladunaca (BJEDOV i sur., 2016.a). Prosječni životni vijek šumskog miša je jedna godina.

Šumski miš hrani se sjemenjem, žitaricama, pupovima, ali i insektima te puževima (BJEDOV i sur., 2016.a).

Žutogrli šumski miš (*Apodemus flavicollis*)

Žutogrli šumski miš pripada porodici miševa (*Muridae*) i vrsti *Apodemus flavicollis*. U Republici Hrvatskoj žutogrli šumski miš živi u svim tipovima šuma, ali ga možemo naći i u parkovima. Nastanjuje napuštene podzemne brloge, ali i šupljine u deblima i panjevima (BJEDOV i sur., 2016.a). Što je stanište bogatije drvećem, to će više pogodovati nastanjivanju žutogrlog šumskog miša (MUJEZINOVIĆ i sur., 2013.). Može ih se naći u šumama različite starosti, ali češće obitavaju u starijim sastojinama (MARSH i sur., 2001.).

Tijelo žutogrlog šumskog miša dugačko je od 9 do 12 cm, a rep od 9 do 13 cm. Krzno je na leđima žutosmeđe, a na trbuhu bijele boje. Odrasli žutogrli šumski miš ispod vrata ima žutu ogrlicu po kojoj je i dobio ime (BJEDOV i sur., 2016.a).

Žutogrli šumski miš aktivan je i danju i noću. Budući da je jako dobar penjač, često se hrani u krošnjama. Razmnožava se od veljače do rujna i tijekom tog razdoblja ima od tri do četiri legla s troje do osmero mladunaca. Brojnost populacije žutogrlog šumskog miša ovisi o urodu šumskog sjemena (BJEDOV i sur., 2016.a). Ženka je spolno zrela u dobi od dva mjeseca. Prosječni životni vijek žutogrlog šumskog miša iznosi dvije do četiri godine (UZUN, 2008.).

Žutogrli šumski miš hrani se sjemenjem, bobicama, gljivama, ali i beskralježnjacima (BJEDOV i sur., 2016.a).

Šumska voluharica (*Myodes glareolus*)

Šumska voluharica (Slika 10) pripada porodici hrčaka (*Cricetidae*), potporodici voluharice (*Arvicolinae*) i vrsti šumska voluharica (*Myodes glareolus*).

Najrasprostranjenija je od svih ostalih vrsta potporodice voluharica. Staništa su joj šume, područja s gustom vegetacijom, područja uz potoke i rijeke te parkovi. Brlog radi pod zemljom, ispod panjeva i korijenja srušenog drveća (BJEDOV i sur., 2016.a). Šumska voluharica preferira otvorenija staništa, s manje krošnji drveća. Pogoduju joj područja s razvijenim slojem prizemne vegetacije i grmlja (MUJEZINović i sur., 2013.). Stare, zaštićene šume su najpogodnije



Slika 10. Šumska voluharica. Izvor: [https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/sumska_voluharica_\(myodes_glareolus\)](https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/sumska_voluharica_(myodes_glareolus))

stanište za šumsku voluharicu koja brzo reagira na promjene u strukturi staništa uzrokovane gospodarenjem (HORVÁTH i TÓTH, 2018.). Tijelo šumske voluharice dugačko je od 8 do 11 cm, a rep od 3,5 do 7 cm. Krzno je na leđima crvenkastosmeđe, a na trbuhu bijele do sive boje. Gornji dio repa je taman, a donji dio je svjetliji (BJEDOV i sur., 2016.a). Aktivna je u sumrak, noću i u zoru. Razmnožava se od travnja do listopada i tijekom tog razdoblja ima četiri do pet legala s troje do pet mladunaca. Brojnost populacije šumske voluharice, kao i žutogrlog miša ovisi o urodu šumskog sjemena (BJEDOV i sur., 2016.a). Spolno su zrele s dva mjeseca starosti (UZUN, 2008.). Može živjeti osamnaest mjeseci do dvije godine.

Šumska voluharica hrani se lišćem, korom, pupovima, bobicama, zeljastim biljem, travom, sjemenjem, gljivama, ali i beskralježnjacima (BJEDOV i sur., 2016.a).

Livadna voluharica (*Microtus agrestis*)

Livadna voluharica pripada porodici hrčaka (*Cricetidae*), potporodici voluharice (*Arvicolinae*) i vrsti livadna voluharica (*Microtus agrestis*).

Staništa livadne voluharice su vlažna područja s visokom travom te livade u blizini šuma. Kuglasta gnijezda gradi od trave. Tijekom suhih ljeta gnijezda su smještena na površini trave, a tijekom vlažnih i hladnih perioda godine ispod zemlje (BJEDOV i sur., 2016.a).

U slučaju dolaska novih ženki na neki teritorij, ženke koje su tu prije živjele smanjuju svoj teritorij i interakciju sa susjedima. S druge strane, zabilježen je visok mortalitet

novopridošlih mužjaka, vjerojatno zbog borbe za ženke s mužjacima koji su tu prije živjeli (RIOTTE-LAMBERT i sur., 2012.).

Tijelo livadne voluharice dugačko je od 8 do 13 cm, a rep od 2 do 5 cm. Krzno je na leđima sivosmeđe do crne boje, a trbuh je svjetliji. Uši su joj do pola ili potpuno obrasle krznom (BJEDOV i sur., 2016.a). Mladi su tamnije boje od odraslih (DA LUZ MATHIAS i sur., 2017.). Livadna voluharica je najaktivnija u zoru i u sumrak. Razmnožava se od ožujka do listopada i tijekom tog razdoblja ima od tri do sedam legala s dvoje do šestero mladunaca (BJEDOV i sur., 2016.a). Ženka je spolno zrela u dobi od mjesec dana (UZUN, 2008.). Prosječni životni vijek ove vrste iznosi 18 mjeseci.

Livadna voluharica hrani se zeljastim biljem, bobicama, korijenjem, korom, gljivama, ali i insektima (BJEDOV i sur., 2016.a).

Poljska voluharica (*Microtus arvalis*)

Poljska voluharica pripada porodici hrčaka (*Cricetidae*), potporodici voluharice (*Arvicolinae*) i vrsti poljska voluharica (*Microtus arvalis*).

Staništa poljske voluharice su poljoprivredne površine, vrtovi, livade, pašnjaci, voćnjaci, ali ju se (u malom broju) može naći i u šumama koje graniče s poljoprivrednim površinama. Brlog je ispod zemlje (do 50 cm dubine), ima nekoliko prostorija i do 6 izlaznih rupa (BJEDOV i sur., 2016.a).

Tijelo poljske voluharice dugačko je od 9 do 12 cm, a rep od 3 do 4 cm. Krzno je na leđima žućkaste do sivosmeđe boje, a trbuh je svjetliji (BJEDOV i sur., 2016.a).

Razmnožava se od ožujka do listopada i tijekom tog razdoblja ima od dva do četiri legla s dvoje do 12 mladunaca (BJEDOV i sur., 2016.a). Gravidnost traje 19-21 dan. Ženka je spolno zrela u dobi od mjesec dana. Prosječni životni vijek poljske voluharice je godinu dana (UZUN, 2008.). Na prirodnu promjenu brojnosti utječu klimatski uvjeti (suha i topla jesen i zima) i brojnost predatora (PANČIĆ i sur., 2004.).

Poljska voluharica hrani se travom, zeljastim biljem, žitaricama, sjemenjem i korijenjem (BJEDOV i sur., 2016.a). Najčešće se hrane travom, jer je ima dovoljno i dostupna je, ali preferiraju i drugo, proteinima bogato bilje (LANTOVÁ i LANTA, 2009.).

2.5.1. Leptospiroza u mišolikih glodavaca

Glodavci su glavni rezervoari leptospiroze. Različite vrste glodavaca rezervoari su različitih serovara u različitim geografskim područjima. Općenito, vrsta glodavaca koja se

smatra glavnim rezervoarom razlikovat će se ovisno o vrsti prirodnog žarišta. Tako su štakori glavni rezervoari tzv. urbane leptospiroze, iako su oni i najčešći izvor zaraze na farmama, ilegalnim odlagalištima otpada i sl. S druge strane, glavne rezervoare peri-urbane leptospiroze i leptospiroze takozvanih arhaičnih prirodnih žarišta predstavljaju mišoliki glodavci.

Porastom populacije mišolikih glodavaca povećava se broj inficiranih životinja i onečišćenje okoliša, a kao posljedica raste broj infekcija u domaćih životinja i ljudi. Dobro je opisana povezanost povećane incidencije leptospiroze sa smanjenjem sanitarno-higijenskih uvjeta koji doprinose povećanju populacije štakora ili pak s pojavom tzv. mišjih godina, odnosno godina kada je izražen porast populacije glodavaca (FAINE i sur., 1999.; BALEN TOPIĆ i sur., 2010.; ŠTRITOF, 2010.). Pojava mišjih godina je ciklička, a njima najčešće prethode blage zime i mjeseci u kojima je glodavcima dostupno obilje hrane. Mišje godine često se povezuje s urodom bukvice. Obična bukva (*Fagus sylvatica*) u Hrvatskoj je najzastupljenija vrsta drveća na obraslom šumskom zemljištu i pojavljuje se u velikom broju šumskih zajednica (BJEDOV i sur., 2016.b). U slučaju obilnog uroda sjemena bukvice gustoća populacije glodavaca doseže svoj vrhunac godinu nakon uroda. Obilan urod sjemena omogućava sitnim glodavcima da se razmnožavaju i tijekom zime, što pak rezultira velikom brojnošću glodavaca već u rano proljeće iduće godine. Smatra se da plod bukvice sadrži i određene fito-estrogene koji dodatno povećavaju plodnost ženki. Dakle, periodičnost uroda obične bukve prati periodičnost povećane pojavnosti mišolikih glodavaca. Bjedov i suradnici (2016.b) tako opisuju da je primjerice 2011. godine zabilježen značajno veći urod bukvice u usporedbi s 2012. godinom kad je urod bio izrazito slab, ali ipak signifikantno manji u usporedbi s 2013. godinom kad je zabilježen najveći urod. U 2014. godini urod bukvice je u potpunosti izostao. Posljedično tome, povećana brojnost mišolikih glodavaca zabilježena je 2012. godine, a vrlo visoka brojnost („mišja godina“) 2014. godine, dok je 2011. i 2013. godine brojnost glodavaca bila niska.

Većina istraživanja koja su usmjerena na utvrđivanje proširenosti leptospiroze unutar populacije glodavaca oslanja se na uporabu molekularnih metoda detekcije. Kod glodavaca koji su rezervoari leptospiroze serološka su istraživanja nepouzdana jer su inficirane životinje vrlo često serološki negativne. Zbog iznimno kompleksnih postupaka i dugotrajnosti postupka, samo u manjem broju istraživanja znanstvenici pokušavaju izdvojiti leptospire. Posljedica ovakvog odabira metoda je nažalost manji broj znanstvenih radova u kojima se može odrediti infektivni serovar, a veći broj radova u kojima se utvrđuje genomska vrsta čija determinacija zasad još uvijek ne daje dovoljno epidemioloških podataka.

U poljskog miša (*Apodemus agrarius*) najniži postotak pozitivnih uzoraka utvrđen je u središnjoj Kini i iznosio je 3,13 %, a dokazane genomske vrste bile su *Leptospira interrogans* i *Leptospira borgpetersenii* (XU i sur., 2023.). Većina drugih istraživanja u ove vrste nalazi veću učestalost kliconoštva. U Njemačkoj je molekularnom metodom utvrđeno prisutvo leptospira u 12,11 % uzoraka bubrega, a najzastupljenija genomska vrsta bila je *Leptospira kirschneri* (MAYER-SCHOLL i sur., 2014.). U Republici Hrvatskoj leptospire su uspješno izdvojene iz čak 30,21 % uzoraka bubrega poljskog miša. Većina determiniranih sojeva pripadala je genomskoj vrsti *Leptospira kirschneri*, serološkoj skupini Pomona, serovaru Mozdok (MILAS i sur., 2013.).

U šumskog miša (*Apodemus sylvaticus*) postotak kliconoštva utvrđen molekularnim metodama na području Palermo u Italiji iznosio je 15,38 % (VITALE i sur., 2018.). Sličan udio pozitivnih uzoraka (17,53 %) utvrđen je i u Njemačkoj, gdje je najzastupljenija genomska vrsta bila *Leptospira interrogans*, te s nešto nižom prevalencijom *Leptospira kirschneri* (MAYER-SCHOLL i sur., 2014.). U Republici Hrvatskoj iz 18,03 % bubrega šumskih miševa uspješno su izdvojene leptospire, koje su kasnije najčešće tipizirane kao *Leptospira interrogans*, serološka skupina Australis, serovar Bratislava (MILAS i sur., 2013.).

U žutogrlog šumskog miša (*Apodemus flavicollis*) u Njemačkoj kliconoštvo je utvrđeno u 8,96 % životinja. Najveći udio infekcija uzrokovali su sojevi koji su pripadali genomskoj vrsti *Leptospira interrogans*, potom *Leptospira kirschneri*, a najmanje zastupljena bila je genomska vrsta *Leptospira borgpetersenii* (MAYER-SCHOLL i sur., 2014.). U Republici Hrvatskoj leptospire su uspješno izdvojene iz bubrega 12,21 % pretraženih životinja. Naknadnom tipizacijom najveći udio izolata determiniran je kao *Leptospira interrogans*, serološka skupina Australis, serovar Bratislava, a potom *Leptospira borgpetersenii*, serološka skupina Sejroe, serovar Saxkoebing te *Leptospira interrogans*, serološka skupina Australis, serovar Muenchen (MILAS i sur., 2013.).

U livadne voluharice (*Microtus agrestis*) u Njemačkoj kliconoštvo je molekularnim metodama dokazano u 12,38 % pretraženih životinja. Najzastupljenija dokazana genomska vrsta bila je *Leptospira kirschneri*, a potom *Leptospira borgpetersenii* i *Leptospira interrogans* (MAYER-SCHOLL i sur., 2014.). Kliconoštvo u poljske voluharice (*Microtus arvalis*) na istom području iznosilo je 13,79 %, a najzastupljenija genomska vrsta također je bila *Leptospira kirschneri* (MAYER-SCHOLL i sur., 2014.). U istraživanju u Nizozemskoj u poljskih voluharica utvrđena je seroprevalencija od 40,74 %, a najčešće utvrđena vjerojatno infektivna serološka skupina bila je Grippotyphosa. Iz bubrega osam životinja (od ukupno 11 serološki pozitivnih) izdvojeni su sojevi koji su determinirani kao *Leptospira*

interrogans serovar *Grippytyphosa* (KUIKEN i sur., 1991.). U bubrežima inficiranih životinja utvrđene su patohistološke promjene kompatibilne s intersticijskim limfoplazmocitnim nefritisom.

2.6. Medvednica kao prirodno žarište zoonoza

Koncept prirodnih žarišta, među ostalim, podrazumijeva da će pojavnost različitih zoonoza ovisiti o promjenama u samom ekosustavu, ali i o brojnim drugim čimbenicima čijom će se aktivacijom omogućiti širenje patogena.

Glodavcima prenosive zoonoze (engl. *Rodent-borne zoonoses*) kao što su leptospiroza ili hemoragijska groznica s bubrežnim sindromom (HGBS) tipični su primjeri netransmisivnih bolesti prirodnih žarišta. HGBS ili takozvana mišja groznica javlja se diljem Europe i Azije, a svake godine od ove bolesti obole deseci tisuća ljudi. Uzročnici su virusi iz roda *Hantavirus*, porodice *Bunyaviridae*, a u Republici Hrvatskoj HGBS uglavnom uzrokuju dva hantavirusa – Puumala virus (PUUV) čiji je rezervoar šumska voluharica (*Myodes glareolus*) i Dobrava virus (DOBV) čiji je rezervoar žutogrli šumski miš. Medvednica se već dugi niz godina smatra prirodnim žarištem ove bolesti, ali tek je 2017. godine, nakon što je u Zagrebu zabilježen porast broja slučajeva, provedena prva analitička studija koja je dokazala jaku povezanost između posjećivanja Medvednice i pojave mišje groznice te utvrdila moguća rizična ponašanja. Gotovo 3/4 zaraženih osoba posjetilo je Medvednicu prije nego se razboljelo. Veći rizik od infekcije imali su oni ljudi koji su trčali, vozili bicikl ili brali cvijeće. Navedene aktivnosti povezane su s bolešću jer se pretpostavlja da se tijekom tih aktivnosti podiže prašina koja potencijalno sadrži čestice mokraće, izmeta ili sline glodavaca zaraženih virusom. Drugi pretpostavljeni način zaraze bio je pijenje onečišćene izvorske vode (LOVRIĆ i sur., 2018.), a veći rizik od infekcije imali su i oni ljudi koji su u anamnezi naveli da su tijekom posjeta Medvednici vidjeli glodavce. Iako je mišja groznica uobičajena bolest u većini europskih zemalja pa tako i u Republici Hrvatskoj, bolest je rijetka u zimskim mjesecima. Međutim, na Medvednici je opisana i veća epidemija ove bolesti u siječnju 2012. godine, neposredno nakon međunarodnog skijaškog natjecanja koje je na vrh Medvednice privuklo tisuće ljudi. Razlog neobične pojave te bolesti tijekom zime bila je ekspanzija populacije šumske voluharice u kojih je utvrđena iznimno visoka stopa infekcije Puumala virusom. Ta činjenica pokazuje da velika gustoća populacije rezervoara određenog uzročnika bolesti, u kombinaciji s visokom stopom infekcije, može dovesti do pojave bolesti u ljudi na malom geografskom području, čak i u doba godine kad se ta bolest inače rijetko pojavljuje.

Dakle, Medvednica, koja privlači veliki broj domaćih i inozemnih turista, treba se smatrati područjem u kojem je mogućnost pojave bolesti velika te su na tom području potrebne konstantne javno-zdravstvene mjere i mjere praćenja pojave uzročnika bolesti (TADIN i sur., 2014.).

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Leptospiroza je (re)emergentna prirodno-žarišna zoonoza s izrazito kompleksnom etiologijom i epizootologijom. Smatra se da je utvrđena heterogenost patogenih leptospira posljedica njihove stalne prilagodbe okolišu i domaćinu kojeg nastanjuju. Prevencija i kontrola ovakvih prirodno-žarišnih bolesti jedni su od najvećih problema javnog zdravstva i veterinarske medicine. Uzročnici i prijenosnici bolesti dio su prirodnih krajolika, a širenje ovih bolesti, koje može predstavljati ozbiljnu opasnost za stanovništvo i primljive domaće životinje, određeno je različitim biotičkim i abiotičkim čimbenicima. U skladu s hipotezom o postojanju bolesti prirodnih žarišta (ili nidalnosti bolesti) koju je prvi postavio ruski znanstvenik Eugene Pavlovsky 1939., neki su uzročnici neraskidivo povezani s određenim biosustavima (MALKHAZOVA i sur., 2014.). Dosadašnja istraživanja epizootologije leptospiroze djelomično su razjasnila ulogu glodavaca i domaćih životinja unutar određenih, tipičnih prirodnih žarišta (ELLIS, 2015.). S druge strane, stvarna uloga drugih vrsta divljih životinja, uključujući i divljač, kao i načini širenja bolesti unutar tzv. „atipičnih“ prirodnih žarišta još su uvijek nejasni i nedovoljno istraženi. Ovakva istraživanja otežana su prvenstveno bioraznolikošću različitih ekosustava (HAAKE i LEVETT, 2015.).

Glavna pretpostavka ovoga istraživanja je da divlje svinje imaju određenu ulogu u održavanju pojedinih seroloških skupina *Leptospira* spp. u atipičnim prirodnim žarištima te da time posredno ili neposredno predstavljaju opasnost za zdravlje ljudi. Naime, dosad provedena istraživanja ukazuju na visoku seroprevalenciju leptospiroze u divljih svinja te mogućnost kolonizacije bubrežnih kanalića i spolnog sustava. Divlje svinje izrazito su prilagodljive na različite životne uvjete, a posljednjih godina primijećena je ekspanzija populacije koja je rezultirala njihovim prisustvom u suburbanim i urbanim područjima diljem Europe. Naravno, posljedica je intenzivniji kontakt divljih svinja s domaćim životinjama i ljudima, što predstavlja mogući rizik od prijenosa *Leptospira*, ali i drugih uzročnika bolesti. Za područje istraživanja odabrana je, za leptospirozu, atipična ekološka niša - Park prirode Medvednica, dio koji pripada Gradu Zagrebu. Riječ je o relativno malom, ograničenom području u blizini glavnog grada koje ima dosta vodenih površina, prostor je veće aglomeracije divljih životinja, ali i prostor s pojačanom ljudskom aktivnošću, što znači da je i češći izravni i neizravni kontakt između ljudi i divljih životinja.

Kako bi potvrdili glavnu pretpostavku postavljeni su ciljevi ovog istraživanja:

1) utvrditi učestalost infekcije u divljači (divlja svinja, srna, lisica) i mišolikih glodavaca unutar, za leptospirozu, atipičnog ekosustava;

- 2) utvrditi ulogu pojedinih vrsta u održavanju određenih patogenih serovara unutar odabranog ekosustava;
- 3) utvrditi rizične čimbenike povezane s učestalosti infekcije u divljih svinja i provesti prostorno-vremensku analizu.

Ovo istraživanje moglo bi pružiti odgovor na pitanje koja je stvarna uloga divljači, s primarnim osvrtom na divlje svinje, u epizootiološko-epidemiološkom ciklusu leptospiroze unutar atipičnih prirodnih žarišta. Iznimno je značajno s praktične strane pitanje znanstvene utemeljenosti procjene rizika za zdravlje ljudi i domaćih životinja u prostorima okoliša s pojačanom aktivnošću ljudi, od isključivo turističke do rekreativne aktivnosti s jačim intenzitetom. Izračun omjera izgleda i statistička analiza dat će konkretne kvantitativne odgovore na ova pitanja. Također, ovo istraživanje nudi odgovor na pitanje povezanosti određene vrste divljači i pojedinih seroloških skupina bakterija *Leptospira* spp. u određenim ekološkim nišama.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Područje istraživanja

Uzorci za ovo istraživanje prikupljeni su na području Parka prirode Medvednica – dijelu koji pripada Gradu Zagrebu (Slika 11). Riječ je o ograničenom području u neposrednoj blizini glavnog grada koje je ujedno i popularno izletišta te samim time i područje s izraženom ljudskom aktivnošću.



Slika 11. Park prirode Medvednica. Izvor: <https://www.hps.hr/karta/>

Medvednicu čini izduženi gorski greben koji se pruža u smjeru sjeveroistok-jugozapad. Veći dio područja Medvednice obuhvaća nadmorske visine od 500 do preko 1000 m, s nižim prigorjima (BILUŠIĆ DUMBOVIĆ i sur., 2013.). Najviši vrh je Sljeme koji se nalazi na 1 032 m nadmorske visine (KRAPINEC, 2020.). Stanišno gledano Medvednicu svrstavamo u brdsko-gorska staništa.

Reljef je izrazito raščlanjen (izraženi grebenski masivi, duboke potočne doline i jaruge, jame i špilje). Zapadni dio Medvednice je viši (visina zapadnog vršnog grebena je preko 1000 m), strmiji i tu se nalaze brojne duboke potočne doline. Istočni dio je blaži i manje razveden (BILUŠIĆ DUMBOVIĆ i sur., 2013.). Zapadni dio Medvednice (zapadno od Kašinskog prijevoja) proglašen je Parkom prirode.

Geološka struktura Medvednice je raznolika. Jezgru čine najstarije stijene paleozoika – naslage zelenih škriljavaca, ali i glineni škriljavci s ulošcima vapnenaca breča i konglomerata. Od trijaskih naslaga (prvo razdoblje mezozoika) zastupljeni su tiničasto-pjeskoviti škriljavci, pješčenjaci i vapnenci. Kredne naslage (treće razdoblje mezozoika) čine lapori, glineni škriljavci, kvarcni škriljavci, pješčenjaci, vapnenci i konglomerati. Na sjeverozapadnim padinama Medvednice tercijarne (starije razdoblje kenozoika (posljednjeg razdoblja u geološkom razvoju Zemlje)) naslage predstavljene su manjim dijelom paleogenskim (starije razdoblje tercijara) naslagama (fino klastične naslage, glinoviti i pjeskoviti lapori u izmjeni s pješčenjacima). Više dijelove Medvednice većim dijelom izgrađuju neogenske (mlađe razdoblje tercijara) naslage (uglavnom klastične vezane i poluvezane, laporovite i karbonatne stijene). Kvartarne (mlađe razdoblje kenozoika) naslage predstavljene su klastičnim nevezanim sedimentima (BILUŠIĆ DUMBOVIĆ i sur., 2013.). Na geološkim podlogama Medvednice dominiraju tri tipa tala, kiselo distrično smeđe tlo, eutrični kambisol i vapnenačko-dolomitna crnica (KRAPINEC, 2020.). Navedeno je značajno jer ovakva geološka građa ima slabu vodopropusnost te se oborinska voda pretežito zadržava na površini, uz malu podzemnu cirkulaciju voda.

Strmi obronci prekriveni su pretežito bjelogoričnom te manjim dijelom crnogoričnom šumom. U vršnim predjelima su šume obične bukve, gorskog javora, kestena i jele. Na vršnom dijelu Medvednice mogu se naći i livade i travnjaci, a tu je smješten i manji broj građevina turističke i sportske namjene te skijaška staza (BILUŠIĆ DUMBOVIĆ i sur., 2013.). Vegetacijski gledano Medvednica se može podijeliti u tri pojasa – brežuljkasti vegetacijski pojas, brdski i gorski pojas (KRAPINEC, 2020.).

Južni dijelovi Medvednice imaju izuzetno guste i dobro raspoređene mreže vodotokova (preko 160 km vodotokova) i izvora te stoga predstavljaju izrazito pogodna staništa za obitavanje krupne divljači. Dominiraju površinski vodeni tokovi (KRAPINEC, 2020.).

Prema razvrstavanju W. Köppena, klima na Medvednici ubraja se u Cfbwx tip, odnosno umjereno toplu, kišnu klimu. Temperatura najhladnijeg mjeseca kreće se između -3 i +18°C, a temperatura najtoplijeg mjeseca je ispod 22°C. Najsuši dio godine je zima. Najviše

padalina zabilježeno je početkom toplog dijela godine i u kasnu jesen. Ekstremno hladno vrijeme moguće je u travnju, a u istom mjesecu moguće je i ekstremno kišno vrijeme (KRAPINEC, 2020.).

Na površinama Parka prirode Medvednica mogu se naći sljedeće vrste divljači: srna obična, divlja svinja, jazavac, kuna zlatica, kuna bjelica, veliki puh i puh lješnikar, lještarka gluha, fazan obični, lisica, lasica velika, lasica mala, tvor obični te divlja mačka, vrana gaćac, vrana crna, svraka, šojka, a povremeno kao selice dolaze šljuke (naročito šljuka bena), a gnijezde se i divlji golubovi (grivnjaš i dupljaš) te divlja grlica (KRAPINEC, 2020.).

4.2. Prikupljanje uzoraka i analiza klimatskih čimbenika

Uzorci krvi te, kad je to bilo moguće, i bubrega spomenutih vrsta prikupljeni su tijekom provedbe izlučenja divljači. Redovita provedba izlučenja divljači provodila se u sklopu Programa zaštite divljači i dopuštenja Ministarstva poljoprivrede i Ministarstva gospodarstva i održivog razvoja, a izlučenje se jednim dijelom provodilo na temelju odobrenog projekta „Zdravlje i zoonotski potencijal divljači na području Parka prirode Medvednica – dio koji pripada Gradu Zagrebu” te redukcijskog odstrjela zbog prijetnje od pojave afričke svinjske kuge. Višestruka uzorkovanja provedena su tijekom sedam lovnih sezona (2012-2019).

Veličina uzorka (potreban broj uzoraka krvi) izračunata je na primjeru presječnog istraživanja na temelju odgovarajuće Cochran-ove jednadžbe:

$$n = z^2 \times P_{\text{exp}}(1 - P_{\text{exp}}) / d^2$$

pri čemu je vrijednost z dobivena iz tablice na temelju vrijednosti 95 % intervala pouzdanosti, a željena preciznost (marginalna pogreška) je postavljena na 5 % (d^2). Očekivana prevalencija leptospiroze preuzeta je iz literaturnih navoda za svaku pojedinu divljač. Izračun veličine uzorka je tada prilagođen za takozvanu malu populaciju, na temelju jednadžbe:

$$n_{\text{adj}} = (N \times n) / (N + n)$$

pri čemu je N procijenjena veličina populacije, a n izračun veličine uzorka za veliku populaciju (nepoznata veličina populacije). Veličinu populacije na Medvednici određivalo je

stručno Povjerenstvo prilikom izrade Programa zaštite divljači. Tako određene veličine matičnih fondova divlje svinje, lisice i srne obične korištene su u ovome istraživanju.

Tablica 2. Veličina uzorka od divljih svinja, srne obične i lisice

	Procijenjeni matični fond	Prevalencije utvrđene u prethodnim studijama	Veličina uzorka na primjeru presječnog istraživanja
Divlja svinja	200	35%	128
Srna obična	234	6%	56
Lisica	30	30%	28

Uzorci krvi divljih svinja prikupljeni su odmah nakon odstrjela punkcijom jugularne vene (*v. jugularis*). U onim slučajevima kad to nije bilo moguće krv se uzorkovala iz srca, pohranjivala u epruветama u hladnjaku na +4°C i iduće jutro dostavljala u Laboratorij za leptospire Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorkovani bubrezi divljih svinja stavljeni su u prozirne vrećice, označeni te, ukoliko je bilo moguće, dostavljeni u laboratorij isti dan. Kada to nije bilo izvedivo, pohranjeni su na -20°C do analize.

Zabilježeni su podaci o spolu, dobi i lokaciji odstrjela za sve uzorkovane životinje. Dobna kategorija divljači je određena odmah na terenu od strane lovaca na temelju veličine i tjelesne mase divljih svinja. Naknadno je dob korigirana prema WAGENKNECHT (1984.). Divlje svinje raspodijeljene su u sljedeće kategorije: prasad (0-1), nazimad (1-2) i odrasla grla (>2).

Uzorci krvi srna većinom su uzeti iz srca, ponekad iz jugularne vene. U obzir su uzeti dob, spol i lokacija odstrjela srna. Dob srna određena je prema naslagama zubnog cementa, izmjeni i istrošenosti zuba donje čeljusti te prema razvijenosti tijela. Zbog smanjenja brojnosti srna u većini staništa odstrjel nije proveden u potpunosti te je prikupljen 41 od planiranih 56 uzoraka.

Uzorci krvi lisica većinom su uzeti iz srca, ponekad iz jugularne vene. Dob lisica procjenjivana je brojanjem naslaga zubnog cementa prema prethodno opisanoj metodi

(ROULICHOVÁ i ANDĚRA, 2007.). Postupak se sastojao od vađenja gornjeg očnjaka iz zubne alveole. Gornji se očnjak vadi jer je manje zakrivljen pa ga je i lakše rezati, ali ako su na pojedinim lubanjama gornji očnjaci ispali dob se može procijeniti i na donjem očnjaku. Nakon tog se očnjak reže u sagitalnom smjeru i odvaja se korijen od ostatka zuba. Nakon tog se korijen zuba brusi na brusnim kamenima različite finoće (od 220 do 12 000), a za brojanje naslaga zubnog cementa koristio se binokular Leica mod WILD M28, uz povećanje od 10 do 25x.

Analizirani su i prethodno prikupljeni podatci o izdvajanju leptospira iz mišolikih glodavaca izlovljenih na Medvednici te izolati pohranjeni u arhivi Laboratorija za leptospire Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Klimatski podatci korišteni su u vidu percentila koji zapravo predstavljaju procjenu vjerojatnosti (izraženu u %) da odgovarajuća vrijednost anomalije u promatranom razdoblju nije bila nadmašena. Tako primjerice percentil 50 zapravo govori da u 50 % slučajeva odgovarajuća vrijednost nije prekoračena, odnosno da se u razdoblju od sto godina mogu očekivati 50 godina tijekom kojih će opažena vrijednost biti viša od razmatrane. Pomoću percentila (P) može se procijeniti povratni period T (u godinama) iz relacije:

$$T = 100/P \text{ ako je } P < 50$$

$$T = 100/100 - P \text{ ako je } P > 50$$

Na primjer, ako je $P = 2 \%$, a $T = 50$ godina, znači za percentil 2% vjerojatnost je da će se ta temperatura javiti dva puta u 100 godina ili jednom u 50 godina.

Prema zaključku s XIII. sjednice Komisije za klimatologiju Svjetske meteorološke organizacije (studeni 2001.), normalni je niz 1961.—1990. u upotrebi za opće usporedbe, i to do završetka sljedećeg normalnog niza 1991.—2020., znači do 2021. godine.

Percentili se razvrstavaju na sljedeće kategorije:

Za temperature percentili:

- ✓ ekstremno hladno < 2
- ✓ vrlo hladno 2 - 9
- ✓ hladno 9 - 25
- ✓ normalno 25 - 75
- ✓ toplo 75 - 91
- ✓ vrlo toplo 91 - 98
- ✓ ekstremno toplo > 98

Za oborine percentili:

- ✓ ekstremno sušno < 2
- ✓ vrlo sušno 2 - 9
- ✓ sušno 9 - 25
- ✓ normalno 25 - 75
- ✓ kišno 75 - 91
- ✓ vrlo kišno 91 - 98
- ✓ ekstremno kišno > 98

Podaci o percentilnim odstupanjima uzeti su iz publikacije Državnog hidrometeorološkog zavoda „Prikazi“, koja predstavlja godišnje izvješće praćenja i ocjene klime (PANDŽIĆ i LIKSO 2013., 2014.a, 2014.b, 2015., 2016., 2017.; PANDŽIĆ i sur., 2018., 2019., 2020.). Postupak ocjene je uobičajen, upotrebom modificirane Conrad-Chapmanove metode na temelju odstupanja od normalnog 30-godišnjeg niza od 1961. do 1990. godine, odnosno od 2019. na temelju odstupanja od višegodišnjeg prosjeka 1981. – 2010.

U navedenim su publikacijama temeljem provedene ocjene klime dane karte klimatskih anomalija za RH na kojima su prema razredima iscertana područja ocjene klimatskih elemenata. Te su ocjene jedini način koji na temelju podataka daje točan smještaj pojedinog razdoblja u odnosu na dugogodišnje prosječne vrijednosti. Potrebne su zbog toga jer se ponekad donose zaključci o određenim razdobljima prema nekim sporednim utjecajima i subjektivnim mjerilima. Na kartama anomalija uz svaku postaju napisana su dva broja. Gornji broj označava odstupanje od višegodišnjeg srednjaka za temperaturu u °C i % za oborinu, a donji broj percentile prema kojima se postaja svrstava u odgovarajući razred.

Karte su preslikane iz biltena i geokodirane u programu ArcGIS 10.1. Na tu su podlogu za određeno razdoblje i godinu preklapani poligoni istraživanog područja i pridruživana percentilna vrijednost za temperaturu i padaline. Pri tome su uzeti podaci za godišnje doba u kome je istraživana jedinka ulovljena, godišnje doba koje je prethodilo ulovu jedinke i pred prethodno godišnje doba koje je prethodilo ulovu jedinke. Na primjer, ako je jedinka odstrijeljena/uhvaćena u ljeto 2012. (lipanj 2012.), tada su jedinki pridruženi temperaturni i oborinski percentili u ljeto 2012., proljeće 2012. i zimi 2011./2012.

4.3. Pretraživanje prikupljenih uzoraka

Primarnim uzorkom u ovom istraživanju smatrala se krv divljih svinja, srna i lisica. Sve uzorkovane krvi pretražene su serološkom metodom mikroskopske aglutinacije. U onih divljih svinja u kojih su bili dostupni organi isti su pretraženi pomoću metode lančane reakcije polimerazom te u onim slučajevima kada su uzorci organa dostavljeni svježi, odnosno unutar 24 sata, učinjena je i renokultura naciepljivanjem tkiva bubrega na hranjivu podlogu po Korthofu.

Pomoću ciljnog sekvencioniranja ključnih regija genoma tipiziran je izolat izdvojen tijekom prethodnih istraživanja leptospiroza u mišolikih glodavaca izlovljenih na Medvednici, koji je bio pohranjen u arhivi Laboratorija za leptospire Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

4.3.1. Test mikroskopske aglutinacije (MAT)

Za detekciju specifičnih protutijela u serumima pretraživanih životinja korišten je test mikroskopske aglutinacije (MAT). MAT je referentna serološka metoda za dijagnosticiranje leptospiroze. Zasniva se na principu aglutinacije antigena i protutijela, pri čemu dolazi do tvorbe netopivih kompleksa – aglutinata, koji se mogu promatrati pomoću mikroskopa s tamnim vidnim poljem. MAT je izveden prema prethodno opisanim protokolima (DIKKEN i KMETY, 1978.; HARTSKEERL i sur., 2006.). Ukratko, za izvođenje MAT-a koristio se živi antigen, odnosno živa kultura leptospira i ispitujući serum. Antigen, odnosno žive leptospire, uzgajane su u tekućem mediju po Korthofu. Gustoća leptospira od $2-4 \times 10^8$ smatrala se pogodnom za izvođenje pretrage. Za postizanje tražene gustoće bilo je potrebno inkubirati kulture leptospira na temperaturi od 20 °C do 30 °C kroz razdoblje od 7 do 10 dana. Budući da su bakterije iz roda *Leptospira* serološki raznolike, prilikom izvođenja testa korišten je panel antigena sastavljen od sojeva referentnih serovara čija se prisutnost na određenom području potvrdila dosadašnjim epidemio-epizootiološkim analizama (Tablica 3). U prvom (kvalitativnom) dijelu pretrage utvrdilo se postoje li u osnovnom razrjeđenju pretraživanog seruma (1:50) protutijela za određeni serovar leptospira. Za one serovare kod kojih je rezultat bio pozitivan rađena su dvostruka serijska razrjeđenja seruma kako bi se odredio točan titar (najveće razrjeđenje seruma u kojem je prisutna pozitivna reakcija). Reakcija se određivala procjenjivanjem broja slobodno plivajućih živih

leptospira u odnosu na negativnu kontrolu. Pozitivnom reakcijom smatrana je ona u kojoj je aglutiniralo najmanje 50 % leptospira (uspoređujući s negativnom kontrolom).

Tablica 3. Panel antigena korišten za izvođenje MAT-a

R.b.	Serološka skupina	Serovar	Soj	Genomska vrsta
1.	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V	<i>L. kirschneri</i>
2.	Sejroe	Sejroe	M 84	<i>L. borgpetersenii</i>
3.	Australis	Bratislava	Jež Bratislava	<i>L. interrogans</i>
4.	Pomona	Pomona	Pomona	<i>L. interrogans</i>
5.	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV	<i>L. interrogans</i>
6.	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	<i>L. interrogans</i>
7.	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin	<i>L. borgpetersenii</i>
8.	Sejroe	Saxkoebing	Mus 24	<i>L. interrogans</i>
9.	Ballum	Ballum	Mus 127	<i>L. borgpetersenii</i>
10.	Bataviae	Bataviae	Swart	<i>L. interrogans</i>
11.	Javanica	Poi	Poi	<i>L. borgpetersenii</i>
12.	Sejroe	Hardjo	Hardjobovis	<i>L. interrogans</i>

Titir 1:50 ili viši smatrao se pozitivnim. Vjerojatna infektivna serološka skupina određena je identifikacijom najvišeg titra na jedan ili više serovara koji pripadaju određenoj serološkoj skupini. U slučajevima kada su isti titir imali predstavnici dvije ili više seroloških skupina, rezultati su označeni kao nedeterminirani.

4.3.2. Izdvajanje uzročnika

Renokultura odnosno izdvajanje leptospira iz tkiva bubrega divlje svinje provedena je u onim slučajevima kad su te divlje životinje bile serološki pozitivne te ukoliko su bili dostupni prikladni uzorci (svježi bubrezi, bez izraženih autolitičnih procesa).

Za izdvajanje se koristila tekuća hranidbena podloga po Korthofu. Potrebni sastojci za izradu ove hranidbene podloge su pepton (0,8 g), NaCl (1,4 g), NaHCO₃ (0,02 g), KCl (0,04 g), CaCl₂ (0,04 g) i KH₂PO₄ (0,18 g). Navedeni sastojci otopljeni su navedenim redoslijedom u 1 l destilirane vode, a potom autoklavirani na 120°C tijekom jednog sata. Dobivena otopina ohlađena je na sobnu temperaturu te je dodan prethodno inaktivirani kuničji serum (inaktiviran na temperaturi od 56°C tijekom 30 minuta) do konačne koncentracije od

10 %. pH hranidbene podloge prilagođen je na 7,4, a otopina je filtrirana kroz Seitz-ov filter (veličina pora 0,22 μm). U mikrobiološkoj biozaštitnoj komori po 5 ml profiltrirane hranidbene podloge razdijeljeno je u staklene epruvete s čepom. Provjera sterilnosti hranidbenih podloga provjerena je inkubacijom na temperaturama od 28°C i 30°C. Provjerena hranidbena podloga je do uporabe pohranjena u hladnjak na 4°C. Prije uzimanja i nasađivanja uzoraka hranidbena podloga se morala temperirati najmanje pola sata na sobnoj temperaturi.

Uzorci bubrega uzeti su, nakon opaljivanja površine bubrega, pomoću staklene Pasteur-ove pipete, koja se potom odlomila u epruvetu koja sadrži hranidbenu podlogu po Korthofu. Tako uzeti uzorci inkubirani su na 28-30°C kroz tri mjeseca uz redovnu kontrolu rasta leptospira jednom tjedno.

4.3.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Svi bubrezi serološki pozitivnih divljih svinja, ukoliko su isti bili dostupni, pretraženi su molekularnom metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *Real-time PCR*) koja u izdvojenoj DNK uzorka utvrđuje prisustvo specifičnog odsječka *lipL32* gena patogenih leptospira (STODDARD, 2013.).

Izdvajanje DNK

Prije samog postupka izdvajanja DNK, uzorak bubrega je u mikrobiološkoj biozaštitnoj komori usitnjen i homogeniziran u Petrijevoj zdjelici pomoću sterilnog nožića, škara, pincete i tarionika. Iz dobivenog homogenata u Eppendorf epruvetu od 1,5 ml odvagano je 25 mg tkiva iz kojeg je potom, korištenjem komercijalnog kompleta (NucleoSpin Tissue, Macherey Nagel, Düren, Njemačka) izdvojena ukupna genomska DNK.

Ukratko, homogenatu tkiva dodano je 25 μl proteinaze K i 180 μl pufera T1. Uzorci su promiješani pomoću laboratorijske tresilice tijekom 15 sekundi te potom preko noći inkubirani u termomiješalici na 56 °C. Idući dan su Eppendorf epruvete centrifugirane na 1 000 okretaja tijekom jedne minute kako bi se spustile kapljice tekućine sa stijenki i čepa epruveta. Nakon toga dodano je 200 μl B3 pufera te je slijedilo kratko vorteksiranje i inkubacija u termomiješalici na 70 °C kroz 10 minuta te ponovo kratko centrifugiranje. Nakon dodavanja 210 μl 96% etilnog alkohola ponovljen je postupak trešnje na laboratorijskoj tresilici i centrifugiranje. Pripravljena smjesa je potom premještena u epruvetu s filter membranom, koja je prethodno umetnuta u sakupljačku epruvetu. Nakon centrifugiranja (1 minuta, 11 000 okretaja/min) epruvete s filter membranom prebačene su u nove sakupljačke

epruvete te je u njih dodano 500 µl pufera BW. Ponovljeno je centrifugiranje (1 minuta, 11 000 okretaja/min) i postupak odbacivanja stare i stavljanja nove sakupljačke epruvete te je u epruvete s filter membranom dodano 600 µl pufera B5. Nakon ponovnog centrifugiranja (1 minuta, 11 000 okretaja/min) epruvete s filter membranom prebačene su u sterilnu Eppendorf epruvetu od 1,5 ml. Dodano je 200 µl pufera BE, a potom je slijedila inkubacija (1 minuta, sobna temperatura) i ponovno centrifugiranje (1 minuta, 11 000 okretaja / min). Eppendorf epruveta s izdvojenom DNK pohranjena je na -20 °C do daljnje uporabe.

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

U svrhu dokazivanja prisutnosti specifičnih odsječaka DNK patogenih bakterija iz roda *Leptospira* koristio se već opisani protokol (STODDARD, 2013.). Ukratko, za izvođenje lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu korišten je komercijalni komplet (QuantiFast Pathogen PCR +IC Kit, Qiagen) koji je optimiziran za visoko osjetljivu detekciju DNK ciljnog patogena, a sadrži i unutarnju kontrolu uspješnosti provedbe PCR reakcije. Uzorci su se pripremali u mikrobiološkoj biozaštitnoj komori gdje je u plastične epruvetice prenesena PCR smjesa koja je sadržavala:

- 2,5 µl 5x QuantiFast Pathogen Master Mix
- 1,94 µl smjese koja sadrži 0,7 µM uzvodnu početnice LipL32-45F i nizvodnu početnice LipL32- 286R početnica te 0,15 µM probu (Tablica 4)
- 1,25 µl smjese početnica za dokaz interne kontrole
- 1,25 µl DNK interne kontrole
- 4,56 µl vode bez DNAza/RNAza.

Svaki uzorak pripremljen je u duplikatu, a u svakoj analizi korištene su pozitivne i negativne kontrole, također u dvije reakcije svaka. U drugoj je prostoriji uzorcima dodano 1µl prethodno izdvojene DNK kako bi ukupan volumen reakcije bio 12,5 µl. U PCR smjesu negativne kontrole dodana je ultračista voda bez DNAza/RNAza, a u PCR smjesu pozitivne kontrole DNK referentnog soja RGA, serovara *Icterohaemorrhagiae*, genomske vrste *L. interrogans*.

Tablica 4. Početnice i proba korištene u lančanoj reakciji polimerazom u stvarnom vremenu (STODDARD, 2013.)

Naziv početnice/probe	Nukleotidni slijed početnice/probe 5'-3'
LipL32-45F	AAGCATTACCGCTTGTGGTG
LipL32- 286R	GAAACTCCCATTTCAGCGATT
LipL32-189P	FAM-AAAGCCAGGACAAGCGCCG-BHQ-1

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu provodila se u uređaju Roto-Gene® Q, Qiagen uz zadane uvjete; aktivacija DNK polimeraze kroz 2 min. pri 95°C te 40 ciklusa denaturacije kroz 5 sekundi pri 95°C i hibridizacije kroz 30 sekundi pri 60°C. Informatički program Software Version Roto-Gene 2. 1. 0. 9 korišten je za analizu podataka. Pozitivnim uzorcima smatrani su oni kod kojih je u obje reakcije Ct vrijednost bila ispod 35.

4.3.4. Metoda sekvenciranja ključnih regija genoma (engl. *Core genome multilocus sequence typing, cgMLST*)

Soj izdvojen s istraživnog područja determiniran je metodom sekvenciranja ključnih regija genoma (engl. *Core genome multilocus sequence typing, cgMLST*) koja se temelji na tipizaciji ukupno 545 sekvenci gena (GUGLIELMINI i sur., 2019.). Ova molekularna metoda ima veću razlučivost te se njenom uporabom može odrediti tip sekvence i klonalna grupa. Budući da je riječ o novoj metodi koja se u rutini ne izvodi, ovu pretragu napravili smo uz pomoć Instituta Pasteur u Parizu, Francuska.

Ukratko, DNK je izdvojena i pročišćena pomoću uređaja MagNA Pure 96 nakon čega je izdvojena DNK obrađena i pripremljena za sekvenciranje na platformi Illumina. Spektrofotometrom je provjerena čistoća i koncentracija DNK u uzorcima, a prihvatljivi su bili oni uzorci s vrijednostima koncentracije od 1 ng/μl i omjerima A260/A280 ≥ 2,00.

Pomoću platforme Illumina u istraživnog je soja sekvencioniran i ulančan set od 545 različitih gena. Podaci su potom uneseni u bazu podataka BIGsdb (Institut Pasteur) – platformu koja upravlja i analizira bakterijske genome, a može pohraniti i organizirati cjelokupne sekvencije genoma i pridružene podatke za različite bakterijske izolate.

Tip sekvence istraživanog izolata određen je kao jedinstvena identifikacija soja leptospira, koje se zasniva na alelnim profilima ključnih regija genoma, dok se identifikacija klonalne grupe temeljila na jednostrukom povezivanju cgMLST profila uz prag od 40 alelnih razlika.

Dobiveni nukleotidni sljedovi obrađeni su programom MAFFT v7. Dobivenim sekvencijama ključnih regija genoma ekstrahirane su 53 sekvencije gena ribosomskih proteinskih podjedinica. Pripadnost genomskoj vrsti potvrđena je usporedbom rMLST alela sekvencija pretraživanih izolata i izolata iz baze podataka.

4.4. Epidemiološka analiza

Divlje svinje raspoređene su u tri dobne kategorije: divlje svinje starosti do jedne godine (prasad), divlje svinje starosti godinu do dvije godine (nazimad) i divlje svinje starije od dvije godine (odrasle).

Srne su raspoređene u pet dobnih kategorija: mladunčad (srne starosti godinu i mlađe), pomladak (srne starosti godinu do dvije), mlado (srne starosti dvije do tri godine), srednjedobno (srne starosti tri do pet godina) i zrelo (srne starije od pet godina).

Izračun vjerojatnosti pronalaska pozitivnih nalaza izračunat je pomoću omjera vjerojatnosti (engl. *odds ratio*, OR), uz izračun intervala pouzdanosti od 95% te p vrijednosti. Znakovitost je postavljena na $p < 0,05$. Omjer izgleda govori kolika je vjerojatnost da će se neki događaj dogoditi u odnosu na to da neće. Dobiveni podatci uspoređeni su prema spolu, dobi, lokaciji i vremenu uzorkovanja.

Razlike su ispitane Fisher-ovim egzaktnim testom, hi-kvadrat (χ^2) testom i McNemar testom. Fisherov egzaktni test koristi se za dvije nominalne varijable koje se ne mogu organizirati u logički slijed, već se redaju proizvoljno, abecednim redom ili po učestalosti. Koristi se za testiranje jednakosti distribucija. Pogodan je kada je broj uzoraka mali.

Programski alat Akaike Information Criterion koristio se za analizu i izbor modela (AIC_c, BURNHAM i ANDERSON, 2002.) koji je izabran u onim slučajevima kad je $\Delta AIC < 2$ jedinice. Na isti je način računata i Akaike težina (w_i), odnosno vjerojatnost da je model najbolji od svih ostalih uspoređivanih modela. Temeljna pretpostavka AIC analize jest da se određena zavisna varijabla treba opisati sa što manje nezavisnih varijabli (pretkazivača). Pri tome je najpovoljniji model onaj s najnižom AIC vrijednošću.

Logistička stepenasta regresija unaprijed korištena je za izračun vjerojatnosti infekcije (HOSMER i LEMESHOF, 2000.), dok je značajnost svakog pojedinog modela utvrđena log-likelihood ratio testom. Značajnost koeficijenata zavisnih varijabli (pretkazivača) bazirana je na χ^2 Wald statistici (Wald-ov χ^2), dok je relativna važnost nezavisnih varijabli unutar svakog modela dobivena množenjem višestrukih koeficijenata logističke regresije (β) sa standardnom devijacijom svake varijable. Za procjenu doprinosa rasta jedinice nezavisnih varijabli (pretkazivača) na vjerojatnost WVC-a, korišten je omjer izgleda.

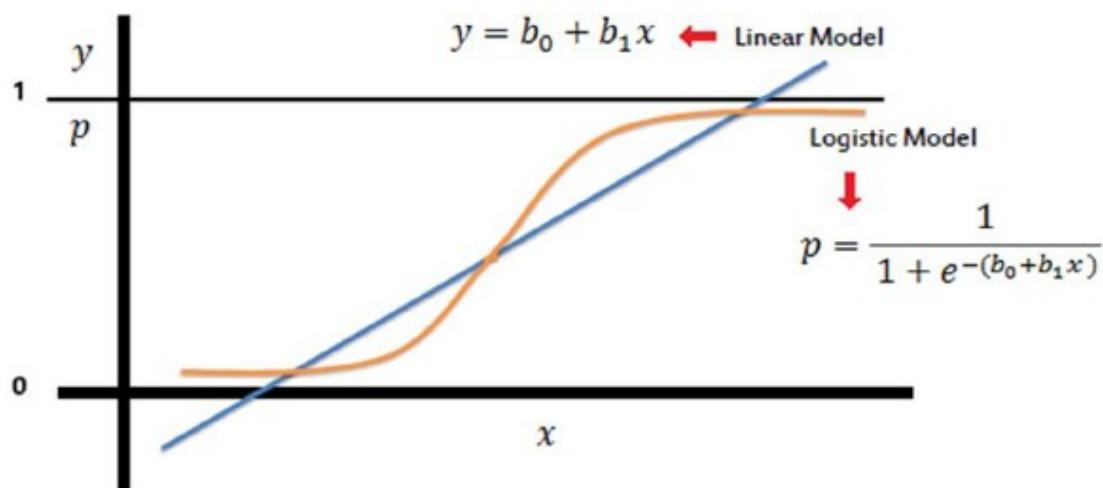
Logistička regresija korištena je za definiranje odnosa između nezavisnih i zavisnih varijabli te zapravo predstavlja vrstu regresijske analize u kojoj je zavisna varijabla binarna i kodira se s 0 ili 1 te postoji najmanje jedna nezavisna odnosno prediktorska varijabla. Korištena je za modeliranje problema kod kojeg se ciljni događaj mogao prevesti u kategorijsku varijablu (da/ne). Regresijski koeficijenti kod logističke regresije interpretirani su kao kod obične regresije – utjecaj nezavisne na zavisnu varijablu, pod pretpostavkom male i nikakve kolinearnosti, bio je veći što je koeficijent viši. Međutim, u slučajevima kad smo htjeli dobiti vrijednost zavisne varijable (vrijednost između 0 i 1), ona je računata putem modela

$$\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots$$

koji ne daje izravno vrijednost zavisne varijable nego predstavlja vrijednost logaritma kojim se mora potencirati prirodna baza (e) da bi se dobila vrijednost zavisne varijable logističke (logit) regresije. Točnije vrijednost zavisne varijable logit regresije dobije se prema obrascu (<http://www.math.wpi.edu/saspdf/stat/chap39.pdf>):

$$p = \frac{1}{1 + e^{(\beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots)}}$$

Uz pretpostavku pozitivne koreliranosti uspjeha s nezavisnim varijablama, na vrlo niskim razinama vrijednosti nezavisne varijable, vjerojatnost doseže do 0. Slično, s porastom vrijednosti nezavisne varijable vjerojatnost podiže krivulju, ali onda nagib počinje opadati tako da će uz povećanje razine nezavisne varijable vjerojatnost težiti do 1, ali nikada je neće dostignuti (Slika 12.).



Slika 12. Logistička regresija (Izvor: BISTROVIĆ, 2018.)

Logistička regresija koristi metodu maksimalne vjerodostojnosti za procjenu parametara i time se oslanja na aproksimacije velikih uzoraka pa se i dobra prilagođenost modela oslanja na dovoljno velike uzorke slijedom čega će logistička regresija zahtijevati veću veličinu ukupnog uzorka, npr. veličine uzorka veće od 400 (HOSMER i sur., 2013.). Osnovna mjera koja pokazuje koliko dobro procjena maksimalne vjerodostojnosti odgovara opaženim vrijednostima zavisne varijable odgovara dvostrukoj vrijednosti logaritamske vjerodostojnosti $-2LL$ (engl. *two times log likelihood*). Minimalna vrijednost za $-2LL$ je 0, što odgovara savršenom prilagođavanju (likelihood = 1 i $-2LL = 0$). Što je niža vrijednost $-2LL$, model je bolje prilagođen. Vrijednost $-2LL$ se može koristiti za uspoređivanje jednadžbi ugniježđenih modela (engl. *nested models*) ili izračunavanje mjera usporedivih s R^2 mjerama u višestrukoj linearnoj regresiji. Pseudo R^2 mjere se tumače na način sličan koeficijentima determinacije u višestrukoj linearnoj regresiji, a u ovoj analizi je korišten Nagelkerke-ov R^2 (NAGELKERKE, 1991.). Vrijednost dobivena množenjem pseudo R^2 sa 100 predstavlja postotak determinirane varijance pretkazivača, odnosno točnost modela.

Kao zavisna varijabla korišteni su rezultati pretrage: 0 – negativan nalaz, 1 – pozitivan nalaz. Kao pretkazivači (nezavisne varijable) su korišteni:

- ✓ Percentili količine oborina u godišnjem dobu ulova jedinke (P_x), percentili količine oborina u godišnjem dobu koja je prethodilo ulovu jedinke (P_{x-1}) i percentili količine oborina u pred prethodnom godišnjem dobu koje je prethodilo ulovu jedinke (P_{x-2}).

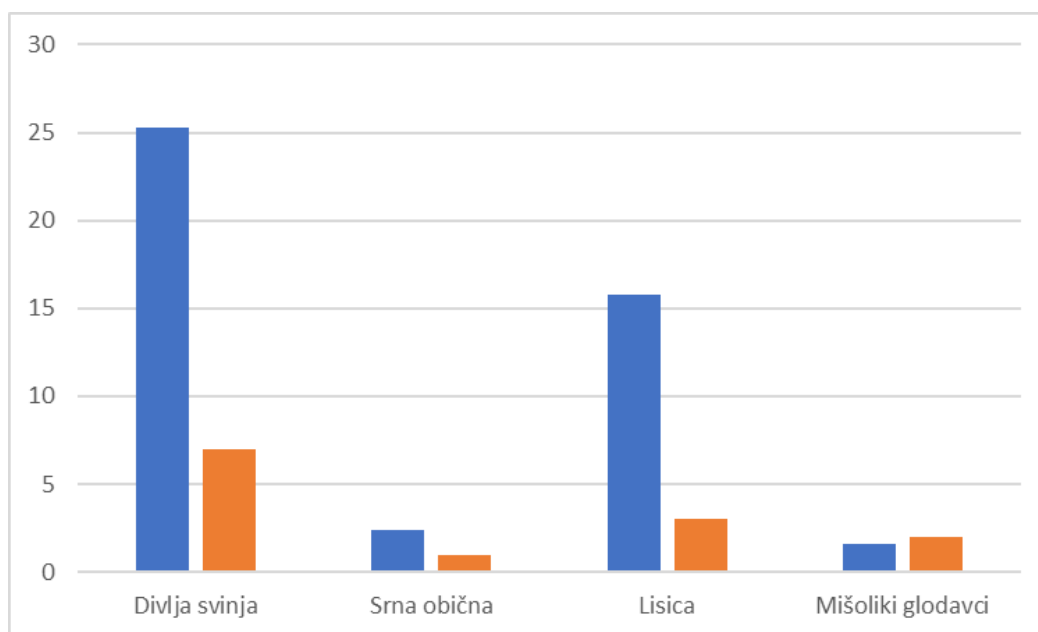
- ✓ Percentili temperature zraka u godišnjem dobu ulova jedinke (T_x), percentili temperature zraka u godišnjem dobu koja je prethodilo ulovu jedinke (T_{x-1}) i percentili temperature zraka u pred prethodnom godišnjem dobu koje je prethodilo ulovu jedinke (T_{x-2}).
- ✓ Spol: 1 – mužjaci, 0 – ženke.
- ✓ Dobni razredi lisice: 0 – juvenilne jedinke (jedinke mlađe od jedne godine), 1 – adultne jedinke (jedinke starije od godinu dana).
- ✓ Dobni razredi divlje svinje: 0 – prasad (jedinke mlađe od jedne godine), 1 – nazimad (jedinke u dobi od jedne godine) i 2 – veprovi i krmače (jedinke starije od jedne godine).

Statistička analiza je provedena u statističkom paketu Statistica 13.5.0.17 (TIBCO Software Inc. 2018) i Decision Tools Suite 7.

5. REZULTATI

5.1. Opći podatci

U ovom istraživanju prikupljeni su i analizirani podaci o serološkom pretraživanju krvi (n=303), bakteriološkom (n=373) i molekularnom pretraživanju tkiva bubrega (n=51) mišolikih glodavaca i malih sisavaca izlovljenih na pretraživanom području. Zastupljenost vrsta utvrđenih morfološkom determinacijom bila je kako slijedi: žutogrli miš (*Apodemus flavicollis*, n = 227), šumska voluharica (*Myodes glareolus*, n = 103), obični šumski miš (*Apodemus sylvaticus*, n=23) i prugasti poljski miš (*Apodemus agrarius*, n=2). U 16 miševa, jedne voluharice i jedne rovke morfološki se mogla utvrditi samo pripadnost određenom rodu (*Apodemus* spp., *Microtus* spp. odnosno *Sorex* spp.). Divljač je u ovom istraživanju zastupljena s jednom vrstom svejeda (divlja svinja, *Sus scrofa*), jednom vrstom mesojeda (lisica, *Vulpes vulpes*) i jednom vrstom biljojeda (srna obična, *Capreolus capreolus*). U analizi podataka divlje svinje su zastupljene s ukupno 158 uzoraka, lisice s ukupno 38 uzoraka, a srne obične s ukupno 41 uzorkom. Najviša prevalencija i najveći broj različitih seroloških skupina leptospira utvrđen je u divljih svinja, potom u lisica, a najmanji u mišolikih glodavaca i srne obične (Slika 13).



Slika 13. Prikaz prevalencije (%; plavi stupci) i broja utvrđenih vjerojatnih seroloških skupina (n; narančasti stupci), ukupno prema vrstama životinja.

Sve molekularne pretrage polučile su negativan rezultat, a leptospire su uspješno izdvojene iz samo jednog glodavca. Stoga se sve daljnje epidemiološke analize i pripadajući rezultati temelje na rezultatima dobivenim serološkom dijagnostikom.

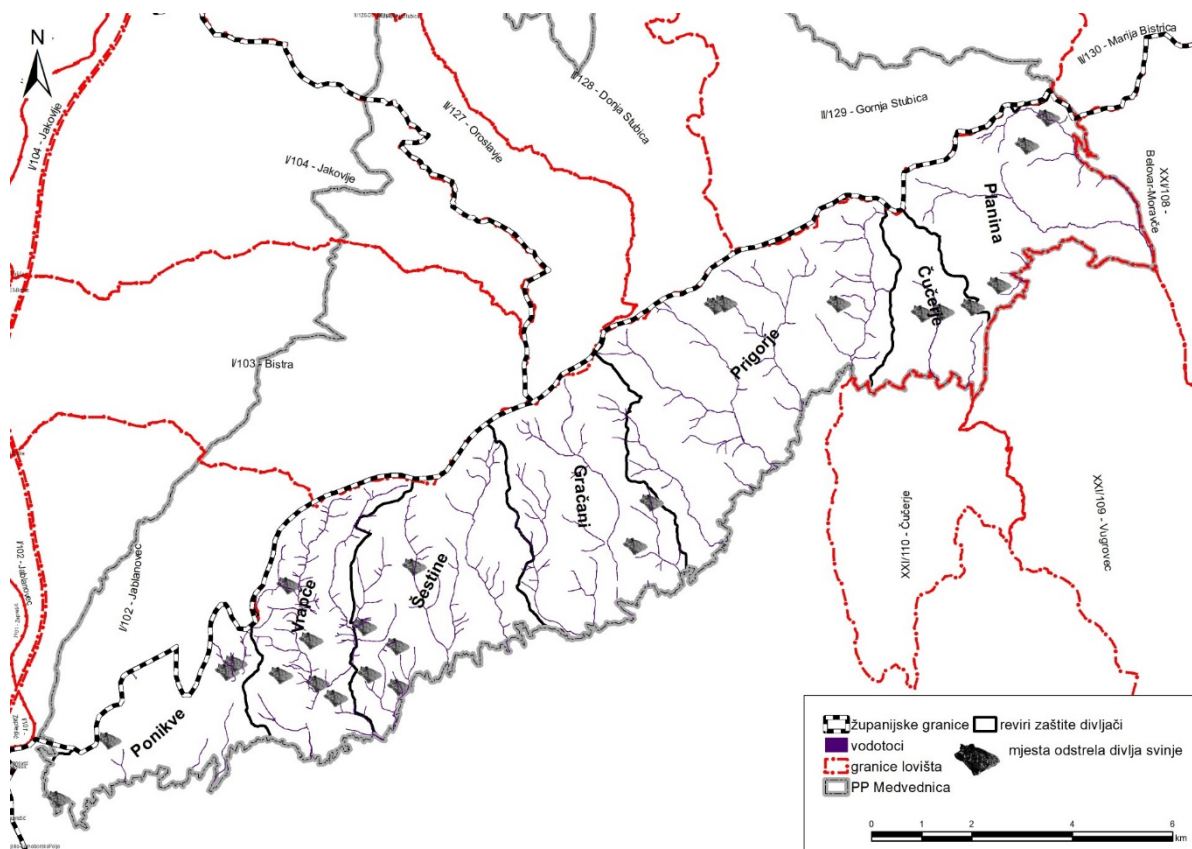
Vjerojatnost nalaza serološki pozitivne divlje svinje bila je 1,8 puta veća u odnosu na nalaz serološki pozitivne lisice (OR = 1,807; CI 95% od 0,7042 do 4,6413; $p = 0,218$), 13,56 puta veća u odnosu na nalaz serološki pozitivne srne obične (OR = 13,559; CI 95% od 1,8050 do 101,8565; $p = 0,011$) te 20 puta veća u odnosu na nalaz serološki pozitivnog mišolikog glodavca (odnosi se na sve vrste zajedno) (OR = 20,00; CI 95% od 7,7047 do 51,9166; $p = 0,0001$). Vjerojatnost nalaza serološki pozitivne lisice bila je 7,5 puta veća u odnosu na nalaz serološki pozitivne srne obične (OR = 7,50; CI 95% od 0,8585 do 65,5216; $p = 0,0685$), odnosno 11 puta veća u odnosu na nalaz serološki pozitivnih mišolikih glodavaca (OR = 11,06; CI 95% od 3,1961 do 38,2903; $p = 0,0001$). Vjerojatnost nalaza serološki pozitivne srne obične je svega 1,5 puta veća u odnosu na nalaz serološki pozitivnih mišolikih glodavaca (OR = 1,475; CI 95% od 0,1680 do 12,9485; $p = 0,7258$).

5.2. Analiza rezultata serološke pretrage na uzorcima podrijetlom od divljih svinja

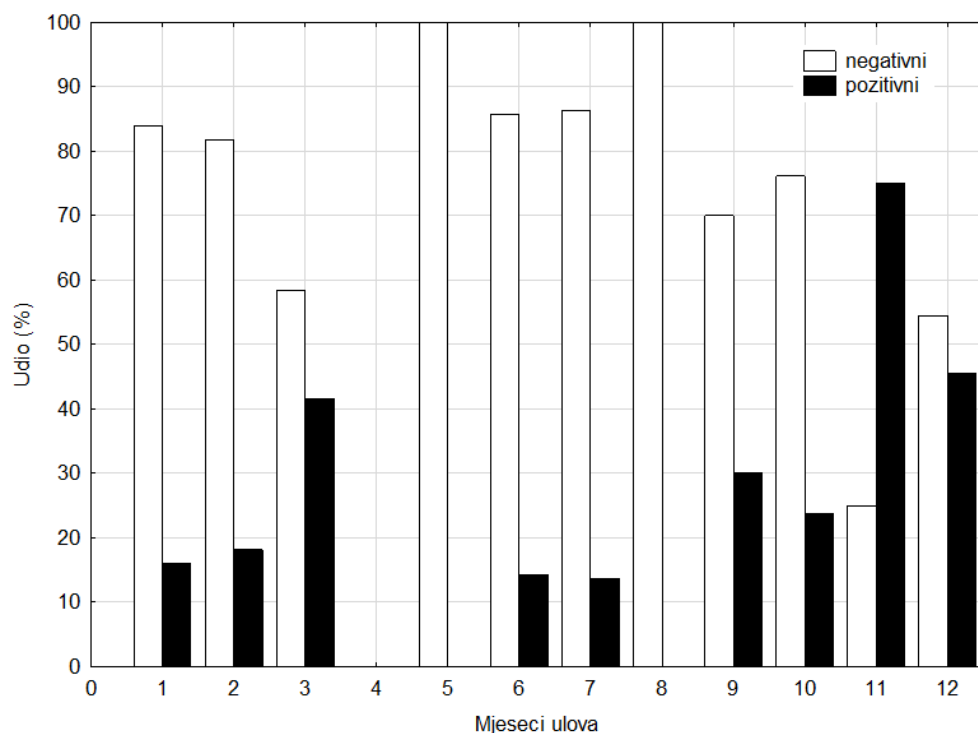
Od 158 uzoraka divljih svinja, serološki je pozitivno bilo njih 40 ($P = 25,3 \%$), a iz niti jednog od 40 pretraženih uzoraka bubrega nismo uspjeli izdvojiti leptospire ili u njima dokazati prisustvo DNK patogenih leptospira. Gledano prema spolu, prevalencija u muških jedinki iznosila je 20,4 %, a u ženki 32,3 %. Prema dobnim kategorijama, prevalencija u prasadi iznosila je 27,5 %, nazimadi 21,4 %, a u odraslih grla 29,5 %. Za razliku od lisice, za koju nema podataka iz svibnja, lipnja, kolovoza, listopada i prosinca, kod divlje svinje bili su zastupljeni uzorci iz gotovo cijele godine. Izuzetak je travanj tijekom kojeg nije bilo izlova jer se čekalo rješenje o odstrjelu. Slika 14 prikazuje lokacije odstrjela/uzorkovanja divljih svinja na području Parka prirode Medvednica. Pored lokacije odstrjela/uzorkovanja, neophodno je obratiti pozornost i na razvedenost vodotoka na području PP Medvednica.

Na istraživanom području, pozitivne jedinice divljih svinja mogle su se detektirati gotovo cijele godine. Izuzetak su bile divlje svinje odstreljene ili pronađene uginule tijekom svibnja i kolovoza, a koje su sve bile negativne na leptospirozu (Slika 15). Tijekom siječnja, veljače, lipnja i srpnja, udio serološki pozitivnih jedinki iznosio je manje od 20 %, tijekom rujna i listopada manje od 30 %, a tijekom ožujka i prosinca preko 40 %. Najviši udio

pozitivnih bio je u studenome (75 %). Općenito, najviši udio serološki pozitivnih utvrđen je krajem jeseni i početkom zime (studen-prosinac), a najniži tijekom ljeta (lipanj-kolovoz). Godišnja dinamika odstrjela divljih svinja, kao i zastupljenost serološki pozitivnih divljih svinja po mjesecima prikazana je na Slici 15.

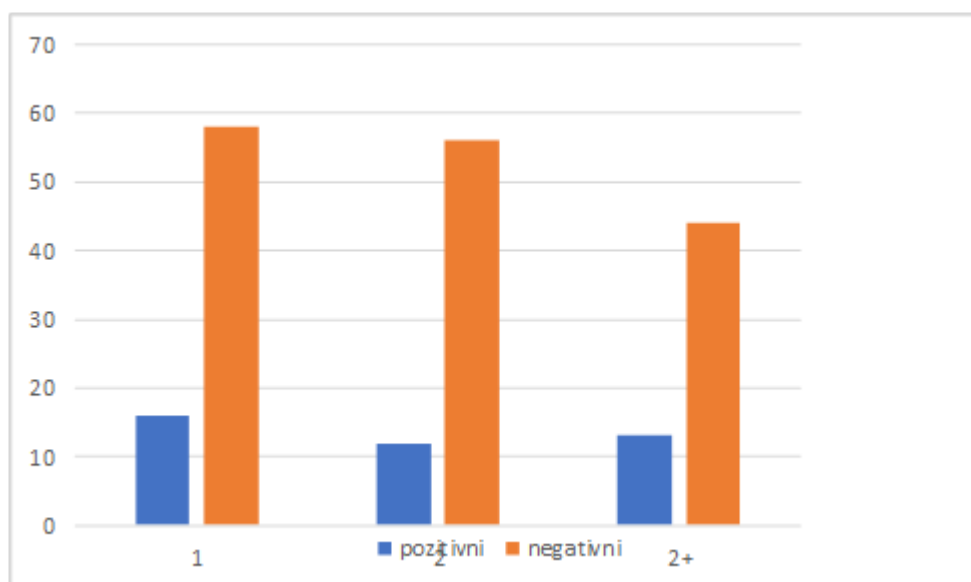


Slika 14. Lokacije odstrjela divljih svinja.



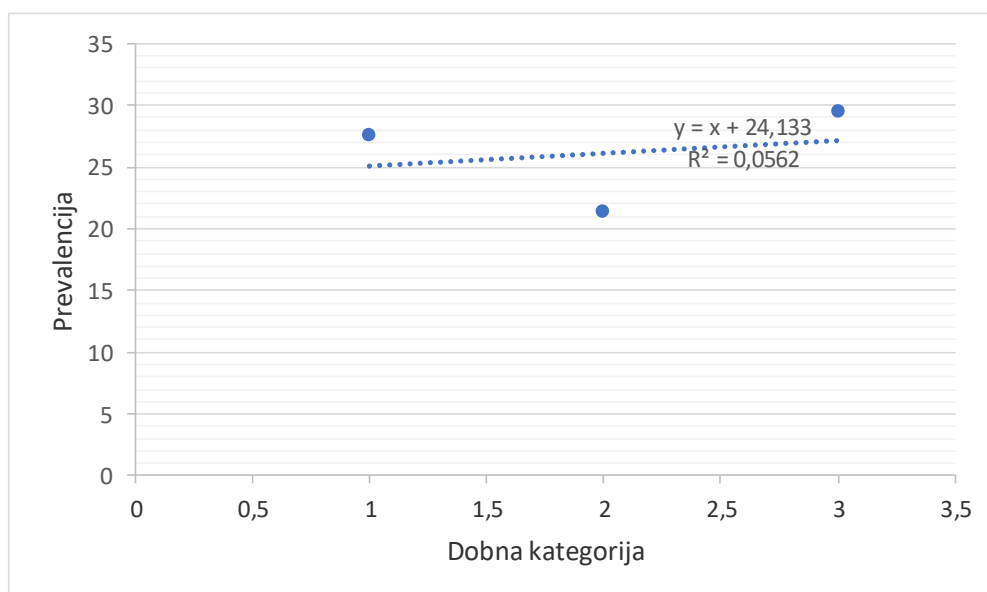
Slika 15. Godišnja dinamika odstrjela i zastupljenost serološki pozitivnih divljih svinja po mjesecima

Vjerojatnost da će ženka divlje svinje biti pozitivna, ukupno prema svim dobnim kategorijama, bila je 1,86 puta veća u odnosu na mužjake (OR = 1,8589; CI 95% od 0,9011 do 3,8346; $p = 0,0933$).



Slika 16. Nalaz serološki pozitivnih (plavi stupci) i negativnih divljih svinja (narančasti stupci) prema dobnim kategorijama.

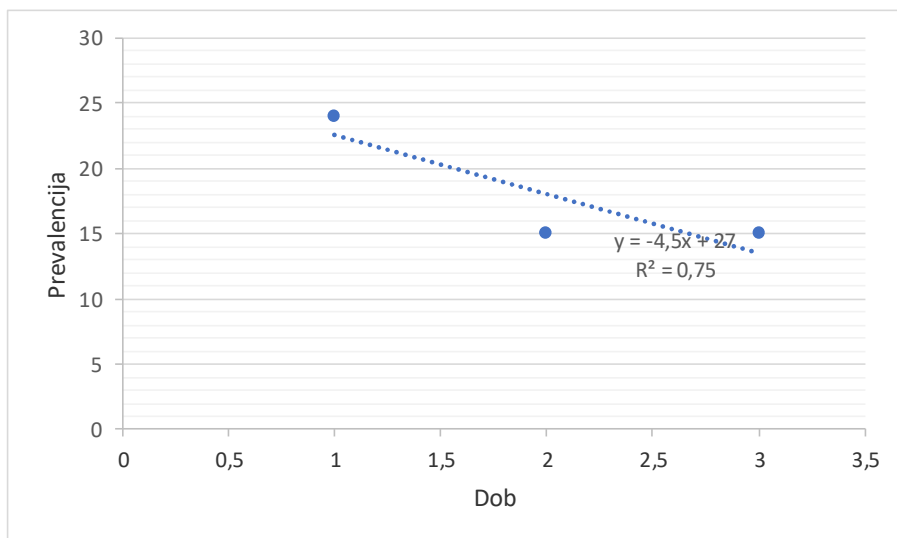
Trend kretanja pozitivnih divljih svinja u ovisnosti prema dobnoj kategoriji prikazan je na Slici 17.



Slika 17. Odnos prevalencije serološki pozitivnih grla prema dobnoj kategoriji divljih svinja.

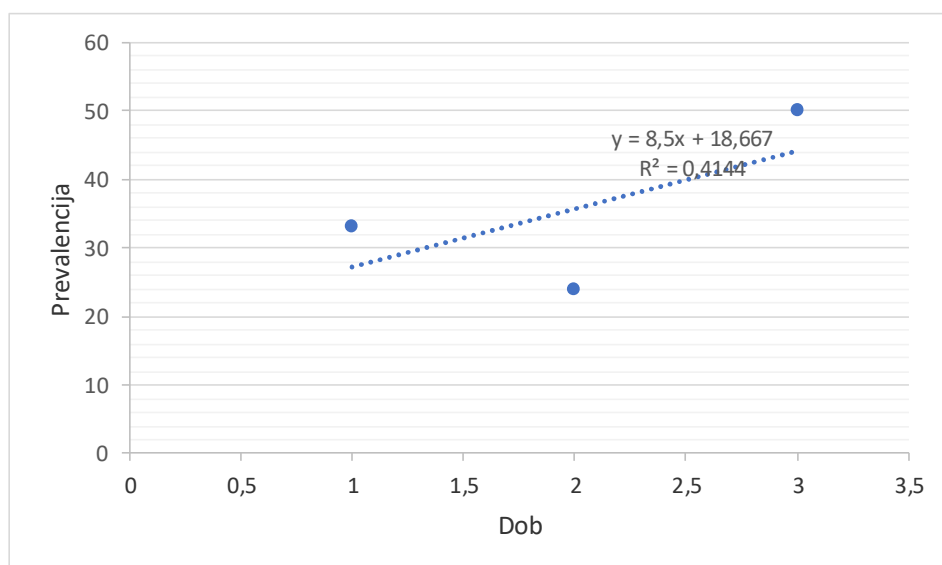
Najniža prevalencija ustanovljena je u kategoriji nazimadi ($P = 21,4 \%$), a najviša u kategoriji odraslih grla ($P = 29,5 \%$). U kategoriji prasadi prevalencija je iznosila $27,5 \%$. Utvrđene vrijednosti linearne regresije $y = x + 24,133$, i čimbenik korelacije $R^2 = 0,0562$, ukazuju na izostanak korelacije između dobi i seroprevalencije kod divljih svinja kada se promatraju oba spola zajedno. Gledano prema spolu i dobnoj kategoriji, prevalencija u kategoriji muške prasadi iznosila je $23,5 \%$, ženske prasadi $33,3 \%$, muške nazimadi $15,4 \%$, a u kategoriji ženske nazimadi $23,5 \%$. Konačno, u kategoriji odraslih mužjaka prevalencija je iznosila $15,4\%$, a odraslih ženki čak 50% .

Odnos prevalencije serološki pozitivnih mužjaka u odnosu na dobnu kategoriju prikazan je na Slici 18.



Slika 18. Prevalencija u mužjaka ovisno o dobi, linearna regresija

Iz Slike 18 razvidno je da se prevalencija serološki pozitivnih mužjaka smanjuje s porastom dobi. Vrijednosti linearne regresije imaju negativan predznak ($y = -4,5x + 27$), dok je čimbenik korelacije $R^2 = 0,75$. Za razliku od mužjaka, u ženki je vidljiv porast prevalencije serološki pozitivnih grla u najstarijoj dobnoj kategoriji u odnosu na prasad i nazimad. Odnos prevalencije i dobi ženki prikazan je na Slici 19.



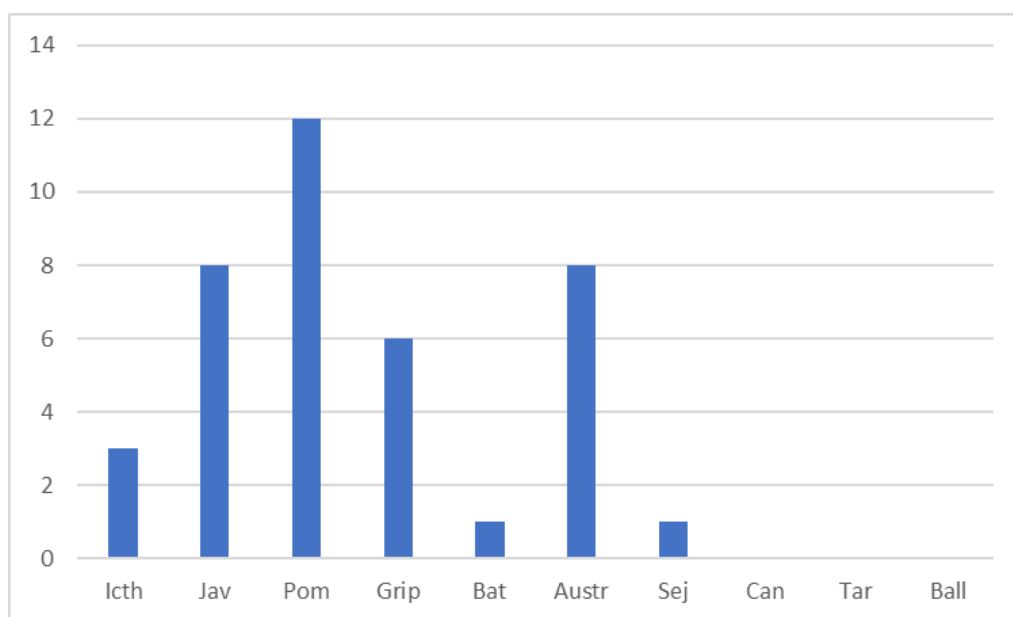
Slika 19. Prevalencija u ženki ovisno o dobi, linearna regresija.

Iz Slike 19 vidljivo je da porastom dobi ženki divljih svinja dolazi do porasta prevalencije. Vrijednost linearne regresije iznosi $Y = 8,5x + 18,667$, dok je čimbenik korelacije $R^2 = 0,4144$.

Gledajući prema spolu, unutar iste dobne kategorije, vjerojatnost da je žensko prase serološki pozitivno bila je 1,63 puta veća u odnosu na nalaz serološki pozitivnog muškog praseta (OR = 1,625, CI 95% od 0,5088 do 5,1896; p = 0,4125). U nazimadi, vjerojatnost da je ženka serološki pozitivna bila je 1,69 puta veća u odnosu na mužjaka iste dobne kategorije (OR = 1,6923; CI 95% od 0,4486 do 6,3844; p = 0,4374). Kada promatramo odrasla grla (starija od 2 godine), vjerojatnost da će ženka biti pozitivna je 5,5 puta veća u odnosu na mužjaka (OR = 5,500; CI 95% od 1,3425 do 22,5326; **p = 0,0178**).

Uspoređujući dobne kategorije međusobno treba izdvojiti nalaz da je vjerojatnost da će odraslo grlo biti serološki pozitivno svega 1,1 puta veća u odnosu na prase (OR = 1,1008; CI 95% od 0,4628 do 2,6186; p = 0,828), odnosno 1,54 puta veća u odnosu na nazime (OR = 1,5376; CI 95% od 0,6194 do 3,8174; p = 0,3537). Vjerojatnost da će prase biti serološki pozitivno bila je 1,4 puta veća u odnosu na nazime (OR = 1,3968; CI 95% od 0,5913 do 3,2998; p = 0,4461). Gledajući prema dobnim kategorijama nije utvrđena statistički znakovita razlika.

Slika 20 prikazuje učestalost vjerojatno infektivnih seroloških skupina utvrđenih u divljih svinja.

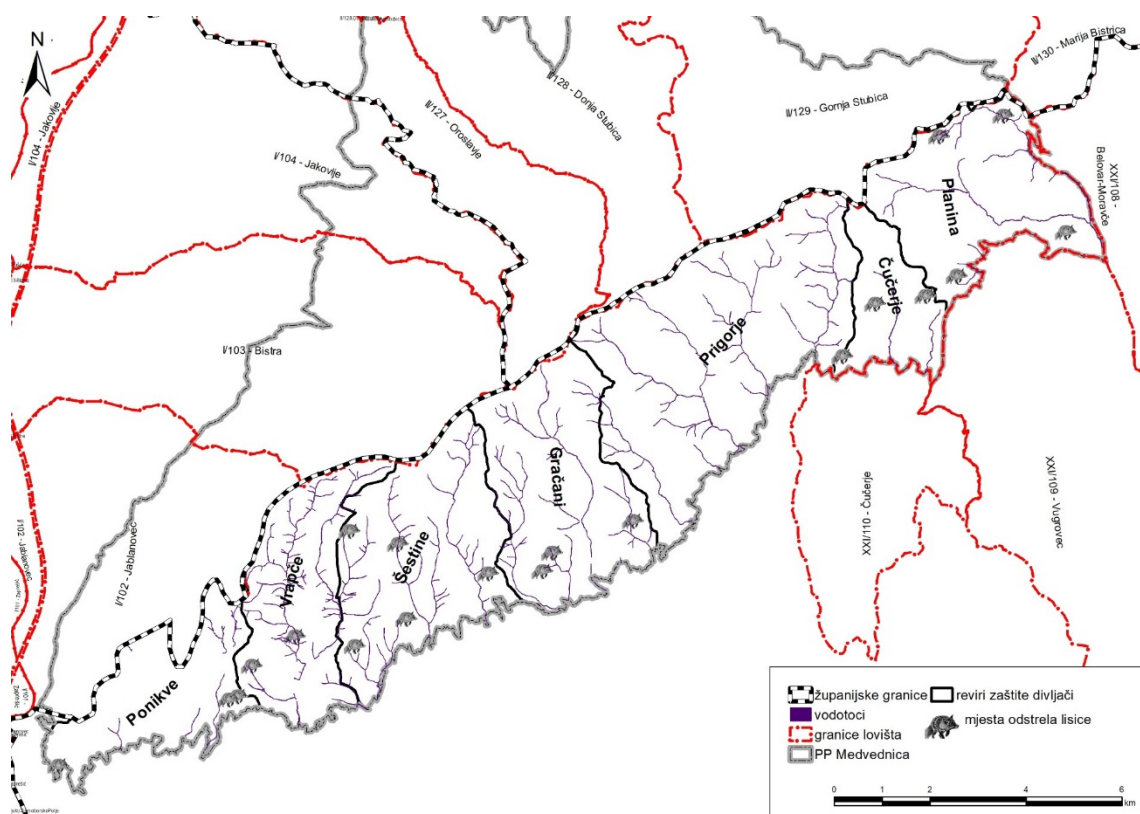


Slika 20. Učestalost vjerojatno infektivnih seroloških skupina u divljih svinja

Vjerojatnost da će serološka skupina Pomona uzrokovati infekciju u divljih svinja bila je 4 puta veća u odnosu na Icterohaemorrhagiae (OR = 4,00; CI 95% od 1,0485 do 15,2599; **p = 0,0424**), 1,5 puta veća u odnosu na Javanica/Australis (OR = 1,50; CI 95% od 0,5539 do 4,0620; p = 0,4250), 2 puta veća u odnosu na Grippotyphosa (OR = 2,00; CI 95% od 0,6836 do 5,8514; p = 0,2057) te 12 puta veća u odnosu na serološke skupine Sejroe ili Batavie (OR = 12,00; CI 95% od 1,4893 do 96,6877; **p = 0,0196**). Vjerojatnost da će serološke skupine Javanica ili Australis uzrokovati infekciju bila je 2,6 puta veća u odnosu na Icterohaemorrhagiae (OR = 2,667; CI 95% od 0,6593 do 10,7861; p = 0,1689), 1,3 puta veća u odnosu na serološku skupinu Grippotyphosa (OR = 1,333; CI 95% od 0,4240 do 4,1927; p = 0,6226), te 8 puta veća u odnosu na serološke skupine Sejroe ili Batavie (OR = 8,00; CI 95% od 0,9559 do 66,9557; p = 0,0551). Uslijed koaglutinacija u istom titru u jedne serološki pozitivne divlje svinje nije bilo moguće utvrditi vjerojatno infektivnu serološku skupinu.

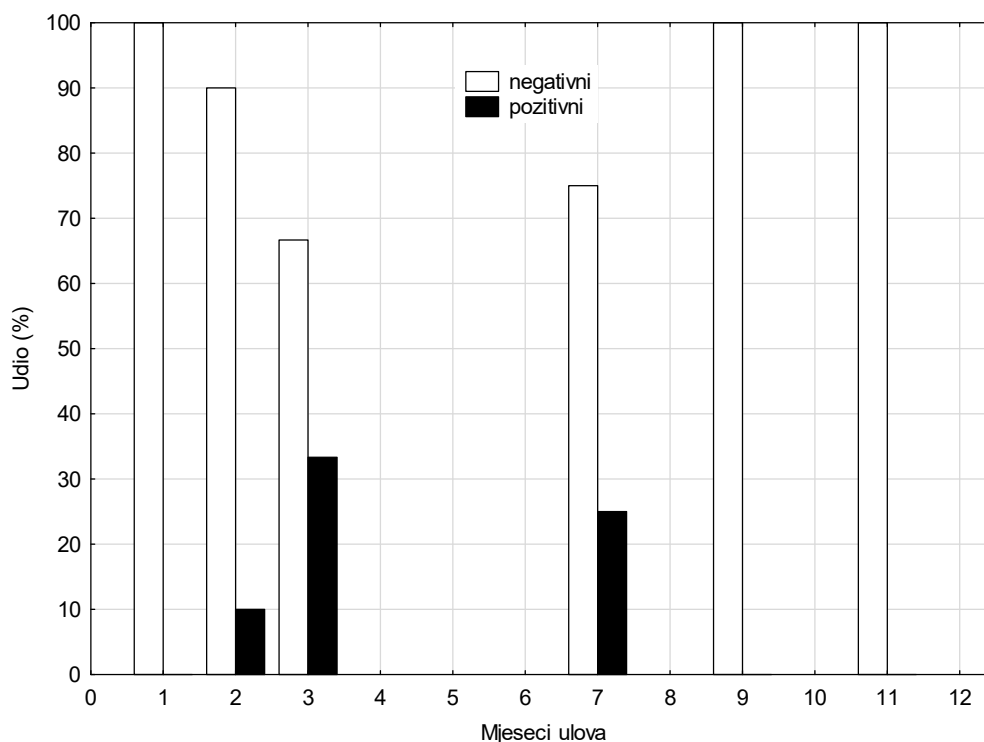
5.3. Analiza rezultata serološke pretrage na uzorcima podrijetlom od lisica

Lisice su odstreljene u siječnju, veljači, ožujku, srpnju, rujnu i studenom. Tijekom travnja i svibnja lisice nisu lovljene zbog trajanja postupka ishoda rješenja resornih ministarstava o odobrenju odstrjela. U ostalim mjesecima lisice nisu odstrjeljivane, usprkos dobivenoj dozvoli za odstrjel. Tijekom siječnja i veljače odstrijeljeno je 18 lisica, što čini 47 % uzorka ove vrste. Lokacija odstrjela lisica prikazana je na Slici 21.



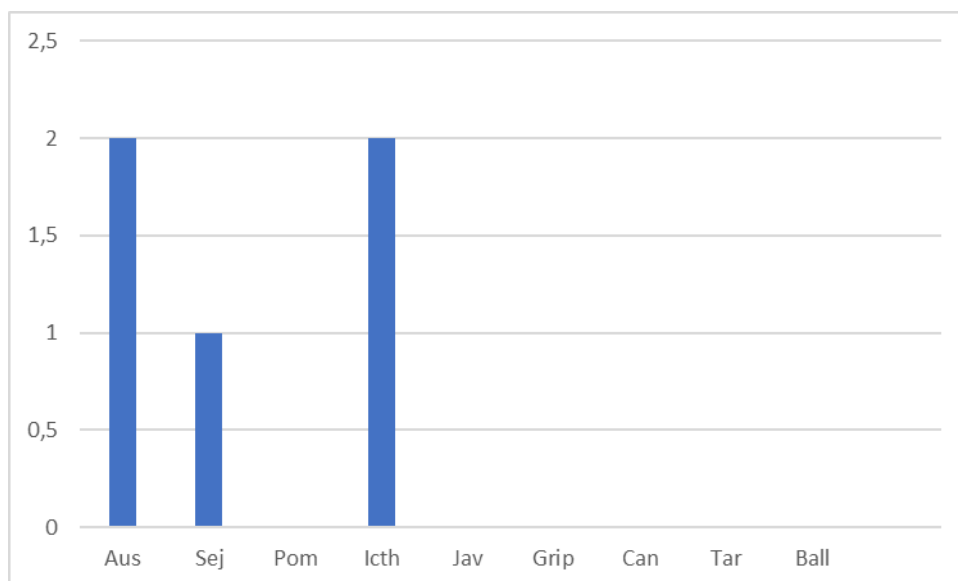
Slika 21. Lokacije odstrjela/uzorkovanja lisica.

Dinamika odstrjela lisica i zastupljenost serološki pozitivnih lisica po mjesecima prikazana je na Slici 22.



Slika 22. Godišnja dinamika odstrjela i zastupljenost serološki pozitivnih lisica po mjesecima.

Od 38 analiziranih lisica, na leptospirozu je bilo pozitivno 6 jedinki što daje ukupnu seroprevalenciju od 15,8 %. Serološki pozitivne jedinke ulovljene su tijekom veljače, ožujka i srpnja (Slika 23). U ovisnosti o mjesečnoj visini odstrjela, najviše je pozitivnih lisica zabilježeno u ožujku (jedna trećina odstrjeljenih jedinki). Kod lisica odstrjeljenih u srpnju ustanovljena je seropozitivnost u 25 % jedinki, a kod onih odstrjeljenih tijekom veljače u 10 % analiziranih jedinki. Rezimirajući rezultate analize, jedinke pozitivne na leptospirozu odstrjeljene su tijekom zime, proljeća i ljeta. Gledano prema spolu, seroprevalencija u mužjaka iznosila je 17,6 %, a ženki 20 %. Ukoliko lisice raspodjelimo prema dobi na mlade (do 2 godine) i starije od dvije godine, prevalencija iznosi 19,2 % i 16,6 %. Utvrđene vjerojatno infektivne serološke skupine u lisica prikazane su na Slici 23.



Slika 23. Vjerojatno infektivne serološke skupine utvrđene u lisica

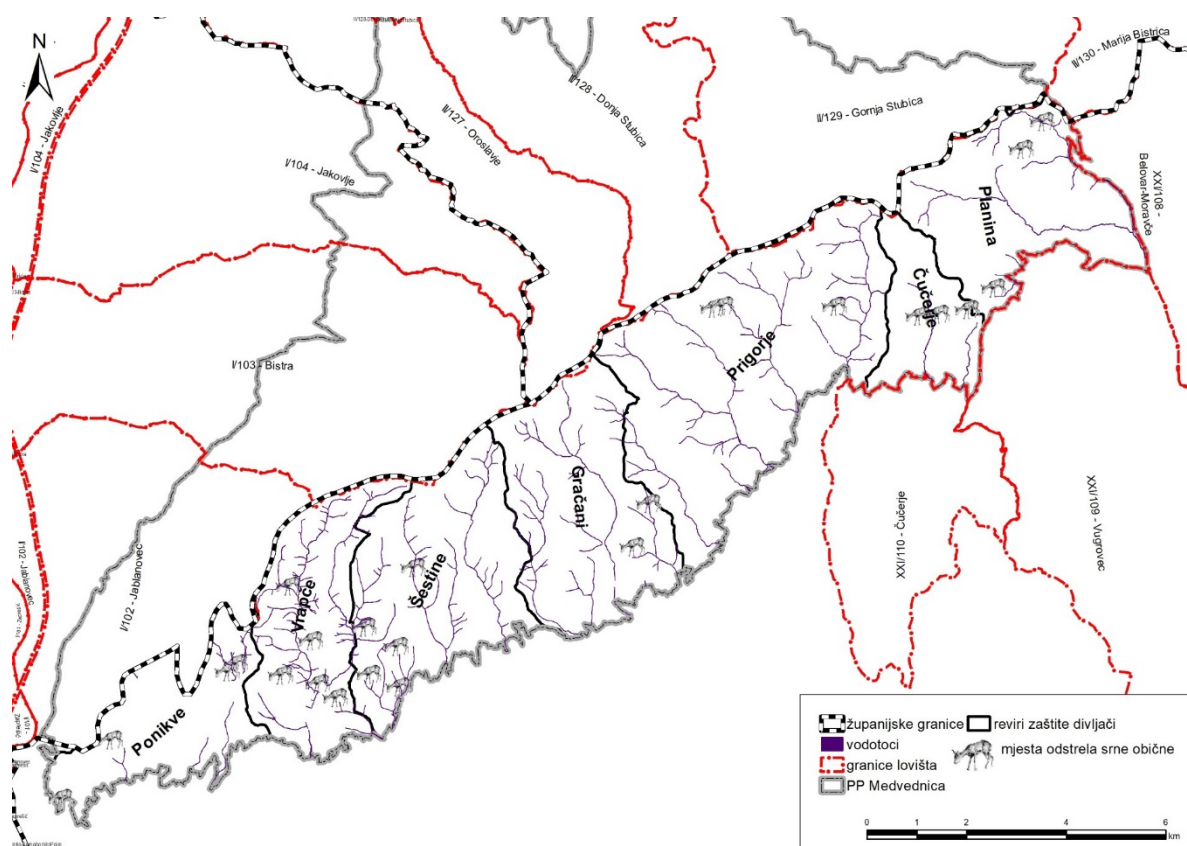
Iz Slike 23 vidljivo je da su u lisica najčešće utvrđene vjerojatno infektivne skupine bile Australis i Icterohaemorrhagiae te nešto rjeđe serološka skupina Sejroe. U jednom pozitivnom uzorku zbog koaglutinacija u istom titru nije bilo moguće odrediti vjerojatno infektivnu serološku skupinu.

Vjerojatnost da će ženka lisice biti pozitivna je 1,17 puta veća u odnosu na mužjake (OR = 1,1667; CI 95% od 0,1975 do 6,8933; $p = 0,8649$).

5.4. Analiza rezultata serološke pretrage na uzorcima podrijetlom od srne obične i mišolikih glodavaca

Prevalencija serološki pozitivnih srna iznosi 2,4 %. Serološki pozitivan bio je samo jedan mužjak, a utvrđena vjerojatno infektivna skupina bila je Pomona. Lokacije odstrjela/uzorkovanja srne obične prikazane su na Slici 24. U mišolikih glodavaca i malih sisavaca ukupna je seroprevalencija iznosila 1,32 %, a od svih pretraživanih vrsta serološki pozitivna reakcija detektirana je u tri žutogrļa miša i jedne šumske voluharice. Seroprevalencija unutar vrste iznosila je u žutogrlih miševa 1,86 %, a u šumskih voluharica 1,16 %. Vjerojatnost da je žutogrli miš serološki pozitivan je 1,62 puta veća u odnosu na šumsku voluharicu (OR = 1,619; CI 95% od 0,1784 do 14,6967; $p = 0,6685$). Serološkim

pretraživanjem utvrđena su samo protutijela na serovar *Grippytyphosa* ($n = 4$). Bakteriološkom pretragom pretraženo je ukupno 373 uzoraka bubrega mišolikih glodavaca i malih sisavaca, a bakterije iz roda *Leptospira* uspješno su izdvojene iz samo jednog mužjaka žutogrlog miša. Genotipiziranjem je izdvojeni soj determinaran kao serovar Mozdok, serološka skupina Pomona, genomska vrsta *L. kirschneri*, što će biti detaljno prikazano u poglavlju koje slijedi.



Slika 24. Lokacije odstrjela/uzorkovanja srne obične.

5.5. Razvoj modela za predviđanje pojave leptospiroze

5.5.1. Divlja svinja

U divljih svinja je pojavu leptospiroze prema kriteriju $\Delta AIC < 2$ jedinice bilo moguće procijeniti pomoću 11 modela (Tablica 5). Međutim, točnost procjene bila je izrazito slaba i kretala se od 9 do 13 % (model 8). U svim modelima za procjenu pojave leptospiroze kao pretkazivač(i) se javljaju temperaturni percentili, a u samo jednom modelu (model 11) i percentil oborina u godišnjem dobu odstrjela jedinke. U jednom modelu (model 3) kao

pretkazivač se javlja samo percentil temperature zraka u godišnjem dobu koje je prethodilo odstrjelu.

Tablica 5. Izbor modela procjene pojave leptospiroze u divlje svinje

RB	Model	K	AIC	ΔAIC	w_i	Nagelkerke R^2
1.	$T_x + T_{x-1}$	2	165,61	0,00	0,04	0,09
2.	$T_x + T_{x-1} + Spol$	3	165,79	0,18	0,03	0,12
3.	T_{x-1}	1	166,09	0,48	0,03	-
4.	$T_{x-1} + T_{x-2}$	2	166,21	0,60	0,03	0,09
5.	$T_{x-1} + Spol$	2	166,35	0,74	0,03	0,10
6.	$T_x + T_{x-1} + T_{x-2}$	3	166,62	1,02	0,02	0,11
7.	$T_{x-1} + T_{x-2} + Spol$	3	166,81	1,20	0,02	0,11
8.	$T_x + T_{x-1} + T_{x-2} + Spol$	4	167,07	1,46	0,02	0,13
9.	$T_x + T_{x-1} + Dob$	3	167,43	1,83	0,02	0,09
10.	$T_x + T_{x-1} + Spol + Dob$	4	167,56	1,95	0,01	0,11
11.	$P_x + T_x + T_{x-1}$	3	167,56	1,95	0,01	0,10

Tablica 6. Točnost procjene serološki pozitivnih jedinki i parametri modela procjene pojave leptospiroze u divlje svinje (koeficijenti označeni crvenom bojom ukazuju na statistički značajan utjecaj uz prag statističke znakovitosti $p < 0,05$)

Model	Točnost procjene (%)		konstanta	P_x	P_{x-1}	P_{x-2}	T_x	T_{x-1}	T_{x-2}	Spol	Dob
	Negativne jedinke	Pozitivne jedinke									
1.	100	0	6,547				0,024	-0,079			
2.	95	10	6,635				0,025	-0,085		0,560	
3.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.	100	0	13,588					-0,098	-0,034		
5.	100	0	9,707					-0,094		0,553	
6.	100	0	9,988				0,020	-0,089	-0,024		
7.	100	0	13,068					-0,098	-0,030	0,497	
8.	95	10	9,216				0,021	-0,088	-0,020	0,520	
9.	100	0	6,311				0,024	-0,079			0,101
10.	97	0	5,872				0,025	-0,079		0,538	0,118
11.	100	0	7,069	0,002			0,026	-0,089			

Točnost procjene serološki negativnih jedinki kretao se od 95 % (modeli 2 i 8) do 100 % (modeli 1, 4, 5, 6, 7, 9 i 11), dok je točnost procjene serološki pozitivnih jedinki bila izuzetno mala i u većini modela iznosila 0 % (Tablica 6). Drugim riječima, tim modelima nije moguće procijeniti pojavnost leptospiroze u divljih svinja bez obzira na godišnje doba. U najboljem slučaju je moguće procijeniti 10 % svih serološki pozitivnih jedinki u populaciji. Ovo ukazuje kako su modeli procjene pojavnosti leptospiroze u divljih svinja nedostatno točni, odnosno jednostavno nisu primjenjivi. Razlog tome može biti relativno veliki životni prostor jedinki.

5.5.2. Lisica

Prema kriteriju $\Delta AIC < 2$ jedinice izdvojena su 3 modela procjene pojave leptospiroze u lisica (Tablica 7). U sva tri modela su ušle vrijednosti oborinskih i temperaturnih percentila. Uz spomenute pretkazivače u model 2 je izabran spol, a u model 3 dob lisica. Prema vrijednosti Nagelkerke-ovog R^2 , točnost procjene pojave leptospiroze u lisica kreće se od 45,2 % (model 2) do 63,9 % (model 3).

Tablica 7. Izbor modela procjene pojave leptospiroze u lisice

RB	Model	K	AIC	ΔAIC	w_i	Nagelkerke R^2
1.	$P_x + P_{x-1} + P_{x-2} + T_x + T_{x-1} + T_{x-2}$	6	23,13	0,00	0,07	0,636
2.	$P_x + P_{x-1} + P_{x-2} + T_x + T_{x-1} + T_{x-2} + Spol$	7	24,30	1,17	0,04	0,452
3.	$P_x + P_{x-1} + P_{x-2} + T_x + T_{x-1} + T_{x-2} + Dob$	7	25,05	1,92	0,03	0,639

U sva tri modela jedinice koje nisu serološki pozitivne na leptospirozu točno se procijene u 100 % slučajeva. Točnost procjene serološki pozitivnih jedinki je puno manja. Tako prema modelima 1 i 3 pozitivne jedinice se procijene u 75 % slučajeva, a prema modelu 2 u svega 50 % slučajeva.

Tablica 8. Parametri modela procjene pojave leptospiroze u lisice (koeficijenti označeni crvenom bojom ukazuju na statistički značajan utjecaj uz prag signifikantnosti $p < 0,05$)

Model	konstanta	P_x	P_{x-1}	P_{x-2}	T_x	T_{x-1}	T_{x-2}	Spol	Dob
1.	6351,467	6,082	-0,576	2,780	-6,038	-31,721	-34,340		
2.	44,269	0,036	0,071	-0,068	0,050	-0,053	-0,474	2,267	
3.	6459,212	6,182	-0,591	2,830	-6,150	-32,253	-34,920		0,472

Uspoređujući vrijednosti koeficijenata pojedinih pretkazivača (Tablica 8) pojave serološki pozitivnih lisica, može se uočiti poklapanje predznaka klimatskih značajki u

modelima 1 i 3. U modelu 2 većina klimatskih pretkazivača ima suprotan predznak u odnosu na ostala dva modela. Već je rečeno kako su modeli 1 i 3 bolji u pretkazivanju pojave leptospiroze u lisice. Stoga se, na temelju parametara tih modela, može reći kako na vjerojatnost pojave leptospiroze u lisica pozitivno utječe količina oborina u godišnjem dobu kada je jedinka odstrijeljena te u pred prijašnjem godišnjem dobu, dok količina oborina u godišnjem dobu koje je prethodilo onom u kome je jedinka odstrijeljena količina oborina ima negativan utjecaj na pojavu leptospiroze. Suprotno tome, percentili temperature imaju negativan utjecaj na pojavnost ove bolesti. Drugim riječima, bez obzira na godišnje doba leptospiroza će se javljati kada su temperature niže od prosjeka za to doba godine.

5.6. Sekvenciranje ključnih regija genoma

Sekvenciranjem ključnih regija genoma postojećeg izolata (M-1391) izdvojenog iz žutogrlog šumskog miša s područja Medvednice dobivena je sekvenca ukupne duljine 4.416,020 bp s udjelom G+C baza od 35,92 %. Analizom dobivenih podataka pretraživanom je izolatu dodijeljen sekvencijski tip (cgST) 1006, a izolat je svrstan u klonalnu grupu 73.

Analizom sekvenci 53 gena ribosomskih proteinskih podjedinica utvrđeno je da izolat pripada genomskoj vrsti *L. kirschneri*. Osnovne filogenetske analize svrstale su izolat M-1391 u P1 podskupinu patogenih leptospira, a daljnjim filogenetskim analizama ključne regije genoma ovog izolata su uspoređene s ostalim, do sad tipiziranim, sojevima izdvojenim na području Republike Hrvatske i referentnim sojevima. Sekvenciranje ključnih regija genoma i identifikacija klonalne grupe ne omogućuje točnu determinaciju serovara. Ipak, klonalna grupa 73 većinom odgovara serološkoj skupini Pomona, a veću razlučivost ima samo kad serovari unutar serološke skupine pripadaju različitim genomskim vrstama. Slika 25 prikazuje kako se pretraživani soj svrstava uz ostale izolate determinirane kao *L. kirschneri*, klonalna grupa 73, serološka skupina Pomona, serovar Mozdok.

Međuodnosi svih izolata klonalne grupe 73 prikazani su minimalno razgranatim stablom na Slici 28. Iako je broj takvih sojeva u BIGSDB bazi ograničen, zanimljivo je primijetiti da se sojevi razdvajaju u tri klastera od kojih dva odvojena klastera prikazuju sojeve izdvojene na području RH.



Slika 25. Filogenetsko stablo temeljeno na analizi 545 gena izdvojenog soja, drugih dosad prikupljenih i analiziranih sojeva s područje Republike Hrvatske, pripadajućih referentnih sojeva i *L. biflexa*, koja je korištena kao vanjska skupina. Stablo je dobiveno pomoću Neighbour joining algoritma, evolucijske udaljenosti izračunate su pomoću Tamura 3 parametra, a varijacija modelirana gama distribucijom. Ljestvica na dnu označava evolucijsku udaljenost.

6. RASPRAVA

Unatoč napretku u razvoju tehnologije i molekularnih metoda korištenih za dokaz i tipizaciju bakterija iz roda *Leptospira*, za potrebe epidemioloških istraživanja još uvijek se većinom koriste serološke metode. Pojedine studije dovode u pitanje ovakav pristup, a svoje zaključke temelje na objašnjenju da serološke metode mogu dovesti do pogrešnih tumačenja obzirom da one zapravo potvrđuju izloženost određenom uzročniku bolesti, ali ne pružaju točne podatke o sposobnosti životinja da održe kroničnu infekciju i uistinu sudjeluju u održavanju i prijenosu određenog serovara. Pri razmatranju ove pretpostavke treba svakako uzeti u obzir vrlo kompleksnu epizootologiju leptospiroze (ELLIS, 2015). Iako je u studijama kojima se pokušavaju identificirati rezervoari neophodno iz njih izdvojiti i tipizirati uzročnika, serološka istraživanja i dalje su atraktivan način otkrivanja prisutnosti uzročnika bolesti u populaciji, budući da pokazuju da je imunokompetentna jedinka bila u kontaktu s uzročnikom bolesti. Naime, u održavanju pojedinih serovara leptospira sudjeluju brojne životinjske vrste u kojih je kliconoštvo nakon infekcije trajno ili pak vremenski ograničeno. Ukoliko uzmemo u obzir da je serološki odgovor posljedica infekcije, moglo bi se zaključiti kako će seroprevalencija pozitivno korelirati s dinamikom infekcije u navedene vrste. Ona će pak biti praćena izlučivanjem leptospira u okoliš. Pritom se potencijal određene životinjske vrste kao rezervoara može procijeniti samo ukoliko se u obzir uzme i ekološka niša unutar koje ona obitava. Kao što je već prethodno spomenuto, do sad su relativno dobro opisani rezervoari, načini prijenosa i povezani rizici unutar tipičnih prirodnih žarišta leptospiroze (ELLIS, 2015.). Uloga divljači, kao i načini širenja bolesti unutar tzv. „atipičnih“ prirodnih žarišta još su uvijek nejasni i nedovoljno istraženi (HAAKE i LEVETT, 2015.).

U ovom istraživanju seroprevalencija je očekivano bila najniža u glodavaca. Naime, kolonizacija bubrežnih tubula leptospirama, karakteristična za prave rezervoare (glodavce), praćena je njihovom organizacijom u biofilm (RISTOW i sur., 2008.), unutar kojeg leptospire ostaju skrivene od imunskog sustava, zbog čega izostaje dugoročni imunski odgovor na infekciju serovarom na kojeg se određena vrsta prilagodila. Trajanje seropozitivnosti nije jasno definirano niti traje doživotno (LLOYD-SMITH i sur., 2007.). Posljedično, serološki status utvrđen u pravih rezervoara najčešće ne korelira s kliconoštvom i često ne odražava serovare leptospira koje te životinje trajno izlučuju. Ipak, u ovom istraživanju i učestalost izdvajanja leptospira iz bubrega glodavaca bila je izrazito niska. Usprkos višestrukom uzorkovanju tijekom godina, koje je obuhvaćalo različite mikrolokacije unutar istraživanog područja leptospire su izdvojene iz samo jednog žutogrlog miša. Vrlo mali udio kliconoša

unutar populacije utvrđen je i tijekom drugih istraživanja glodavaca iz gorskih predjela Republike Hrvatske (BJEDOV, 2015.). Iako pretpostavka da učestalost leptospiroze u glodavaca i drugih životinjskih vrsta opada kako nadmorska visina raste još uvijek nije nedvosmisleno potvrđena, u prilog joj svakako idu i rezultati ovog istraživanja. Tako je utvrđena seroprevalencija u lisica iznosila 15,8 %, odnosno bila upola niža u odnosu na seroprevalenciju koju su SLAVICA i sur. (2007.) utvrdili u lisica iz nizinskih staništa RH (31,25 %) u prethodnim istraživanjima.

Utjecaj nadmorske visine na seropozitivnost utvrđena je i u divljih svinja tijekom prethodnih istraživanja u kojima su divlje svinje iz nizinskih krajeva bile statistički znakovito češće seropozitivne u odnosu na one iz gorske Hrvatske, ali i susjednih zemalja (SLAVICA i sur., 2010.; CHIARI i sur., 2016.). Potvrđena je i rezultatima ovog istraživanja. Naime, prema istraživanju SLAVICA i sur. (2007.; 2010.) seroprevalencija u divljih svinja RH iznosila je od 31,9 % do 35,03 %, dok je u ovom istraživanju utvrđena seroprevalencija od 25,3 %. Sukladno tome razvidno je da je seroprevalencija niža s porastom nadmorske visine staništa, no ipak je ta razlika u ovom slučaju manja negoli je to očekivano. Relativno visoka prevalencija utvrđena u ovom istraživanju mogla bi se objasniti vertikalnim migracijama divljih svinja tijekom kojih dolazi do spuštanja svinja u primarno suburbana i urbana područja. Za razliku od uobičajenih oblika vertikalnih migracija, u slučaju migracije divljih svinja na području PP Medvednica većina svinja migrira iz urbanih područja na područje PP Medvednica tijekom zime (veća dostupnost hrane, manje uznemiravanje rekreativnim aktivnostima ljudi i manja prisutnost pasa bez povodca). Veća pojavnost leptospiroze u nizinama može se objasniti nagibom tla, koje je u gorju izraženije pa su tla ocjedita, vodotoci brži, a mogućnost stvaranja rukavaca, bara i lokvi manja. Vlažna tla (tla s oko 20 % vlage), kao i tla natopljena vodom predstavljaju čimbenike koji pogoduju održavanju leptospira (BARRAGAN i sur., 2017.; YANAGIHARA i sur., 2022.). Ovdje treba naglasiti kako u istraživanom području Medvednice prevladavaju značajno nagnuti (nagib od 12^0 do 32^0) i nagnuti (nagib od 5^0 do 12^0) tereni, koji imaju udio od čak 92 %. Stoga su vlažna tla i tla natopljena vodom u ovome području ograničena uglavnom na jarke. Nadalje, na području PP Medvednica uglavnom su razvijena automorfna tla (KRAPINEC, 2020.), pri čemu dominiraju kambisoli (razvijeni su na oko 80 % istraživanog prostora). Jedino hidromorfno tlo je pseudoglej ravničarski, no ono obuhvaća svega 0,3 % istraživanog područja (isključivo istočni dio). Takva, teška, hladna i vlažna tla uglavnom se nalaze u udolinama i jarcima. Pored toga treba uzeti u obzir potrebu divljih svinja za kaljužanjem i rovanjem te

posljedičnim zadržavanjem na takvim područjima. Sukladno svemu navedenome, ne čudi relativno visok postotak seropozitivnih divljih svinja.

U ovom istraživanju u divljih svinja nije utvrđena statistički znakovita povezanost između dobi ukoliko se razmatraju oba spola zajedno, što je u skladu s drugim studijama iz država u okruženju (CHIARI i sur., 2016.). Ipak, važno je napomenuti kako je seroprevalencija nešto viša u odraslih jedinki u usporedbi s prasadi i nazimadi, ali to je pripisivo primarno porastu seroprevalencije s dobi u ženki. Tako je primjerice vjerojatnost pronalaska seropozitivne divlje krmače čak 5,5 puta veća u odnosu na veprove (OR = 5,500; CI 95% od 1,3425 do 22,5326), što je ujedno i statistički znakovito ($p = 0,0178$). Ovisnost seropozitivnosti prema dobi u ženki vidljiva je i iz linearne regresije. Gledajući prema spolu rezultati ukazuju na izostanak razlike u seropozitivnosti između muške i ženske prasadi i nazimadi. Dobiveni rezultati mogli bi se objasniti biologijom ponašanja navedene vrste u koje ženke, prasad i nazimad do dobi od 8 – 15 mjeseci žive u čoporu, dok se mužjaci iza navedene dobi odvajaju i žive ili u manjim skupinama ili pojedinačno (TACK, 2018.). U takvim uvjetima infekcija leptospirama puno se lakše širi unutar krda, osobito tijekom zajedničkog kaljužanja.

Neke od prethodnih studija kao najvažniji rizični čimbenik koji utječe na pojavnost leptospiroze na području Republike Hrvatske navode temperaturu i količinu oborina (HABUŠ i sur., 2017.). U divljih svinja točnost procjene dobivanja serološki pozitivnog rezultata dobivena prediktivnim modelima koji su kao pretkazivače koristili temperaturne i oborinske percentile bila je izrazito niska. Usprkos tome, najviši udio serološki pozitivnih divljih svinja utvrđen je krajem jeseni i početkom zime (studeni-prosinac), odnosno tijekom i nakon kišnog perioda, a najniži tijekom ljeta (lipanj-kolovoz) kad su oborine oskudnije. Za razliku od ovog, prediktivni modeli imali su relativno visoku točnost u predviđanju nalaza serološki negativnih rezultata u divljih svinja. Na temelju pokazatelja tih modela, moglo bi se zaključiti kako na vjerojatnost pojave leptospiroze u divljih svinja pozitivno utječe spol, što je i dokazano linearnom regresijom i izračunom mjera povezanosti, dok je temperatura uglavnom pokazala pozitivan predznak. Drugim riječima, pozitivno odstupanje temperature u odnosu na srednju vrijednost ima pozitivan utjecaj na pojavu serološki pozitivnih grla. Oba koeficijenta (za temperaturu i spol) su razmjerno niska te je njihov utjecaj i relativno slab. Mogući razlog neučinkovitosti prediktivnih modela u divljih svinja može biti relativno široki areal kretanja ove vrste životinja i geografska pozicija istraživanog područja. Životni prostor divlje svinje, čak i unutar jedne regije, dosta je varijabilan. Izbor pogodnog mjesta gdje će se krmače oprasiti ključan je čimbenik neonatalnog preživljavanja, a utječe i na kondiciju jedinke.

Budući da se krmače prase uglavnom tijekom zime, a termoregulacija u prasadi slabo je razvijena, krmače za gnijezda obično izabiru toplije mikrolokacije (FERNÁNDEZ-LLARIO, 2004.). Nakon prasenja disperzija grla najveća je tijekom zime 3. godine oprasenih jedinki (siječanj-ožujak). Ženska će grla biti vjernija području gdje su i oprasena. U dobi od dvije godine na dalje krmače više ne pokazuju tendenciju širenja životnog prostora i zadržavaju se u području promjera oko osam kilometara. Veći areal kretanja imat će muške jedinke. STUBBE i sur. (1989.) navode kako je udaljenost koju su prelazili bila vrlo varijabilna i obuhvaćala je razdaljine od 17 pa čak i do 100 kilometara, što je prvenstveno ovisilo o strukturi staništa. Tendencija smanjenja veličine životnog prostora utvrđena je u veprova starijih od 4 godine vjerojatno jer u toj dobi već bolje poznaju prvotno područje obitavanja, oprezniji su pa se na manjoj površini životnog prostora osjećaju sigurnije. U navedenoj studiji utvrđeno je i kako se divlja svinja u poljoprivrednim područjima uglavnom dulje vrijeme zadržava na poljima na kojima je posijan kukuruz. Nakon žetve te se životinje najčešće ne vraćaju u staro stanište već osvajaju nova. Konačno, prema HELL i sur. (1984.) optimalne klimatske prilike za ovu divljač su do 400 m nadmorske visine, no ona se cijele godine zadržavaju i na nadmorskim visinama do 800 m (tijekom ljeta i na većim visinama). Osim toga, za gustoću populacije je od odlučujućeg značaja i tip šumskih sastojina. Na području Slovačke je najveća gustoća populacije zabilježena u sastojinama hrastova (*Quercus* spp.) i obične bukve (*Fagus sylvatica*), a najmanja u sastojinama smreke (*Picea abies*). Upravo bukove sastojine čine gotovo 50 % šumskih površina na području Parka prirode Medvednica, dijela koji teritorijalno spada u Grad Zagreb (KRAPINEC, 2020.). Iako prostorni raspored divlje svinje na području Medvednice do sada nije istraživani, može se pretpostaviti kako tijekom ljeta dio jedinki prelazi na sjevernu stranu ovog masiva, na hladnije i vlažnije terene. Također, obzirom na blizinu glavnog grada vrlo je vjerojatno da se ove životinje u nekom trenutku spuštaju do rubova, ili pak ulaze u sam grad. Sve navedeno povećava areal njihovog rasprostiranja (životnog područja), a samim time mijenja i pretkazivače korištene u ovom istraživanju.

Tijekom ovog istraživanja u divljih svinja su najčešće utvrđene vjerojatno infektivne serološke skupine Pomona i Australis, što je u skladu s rezultatima drugih istraživanja u Republici Hrvatskoj, ali i drugim državama Europe (JANSEN i sur., 2007.; SLAVICA i sur., 2010.; VALE-GONÇALVES i sur., 2014.; CILLIA i sur., 2020.). U relativno velikog broja životinja utvrđena je i seroreaktivnost na serovar *Icterohaemorrhagiae*, što i nije tako neočekivano. Naime, rezervoari serovara serološke skupine *Icterohaemorrhagiae* su štakori, a učestali ulasci divljih svinja u grad potaknuti su lako dostupnom hranom koju svinje nalaze u

blizini kontejnera za smeće, kao i štakori. Relativno visok udio seroloških reakcija na serovar Poi treba tumačiti s oprezom zbog visoke reaktivnosti ovog serovara, kao i činjenice da on često koaglutinira u serumima životinja inficiranih serovarom Icterohaemorrhagiae.

Antropogeni utjecaj može se iščitati i iz nalaza seroloških pretraga u lisica u kojih je najveći broj životinja bio pozitivan na serovare iz serološke skupine Icterohaemorrhagiae i serološke skupine Australis. U Republici Hrvatskoj najčešći rezervoari serovara iz serološke skupine Australis su mali mišoliki glodavci pa je ovakav nalaz očekivan, obzirom da oni čine velik udio prehrane lisica. S druge strane, prisutnost štakora kao rezervoara serovara Icterohaemorrhagiae na istraživanom području puno je češća u naseljenom području ili u okolini brojnih turističkih objekata, osobito onih koji se bave pripremom hrane. Zanimljivo je i da su prediktivni modeli imali relativno visoku točnost u predviđanju nalaza serološki pozitivnog rezultata u lisica. Na temelju pokazatelja tih modela, moglo bi se zaključiti kako na vjerojatnost pojave leptospiroze u lisica pozitivno utječe količina oborina u godišnjem dobu kada je jedinka odstrijeljena te u pred prijašnjem godišnjem dobu, dok su količina oborina u godišnjem dobu koje je prethodilo onom u kome je jedinka odstrijeljena i percentili temperature imali negativan utjecaj na pojavu leptospiroze. Zanimljivo je da pretkazivači temperature imaju negativan predznak, što je neobično s obzirom da leptospirama u načelu ne odgovaraju temperature niže od 10°C. Mogući razlog ovakvoga nalaza je činjenica da mišoliki glodavci pretežu u prehrani lisica upravo tijekom zime (DELL'ARTE i sur., 2007.). Viši udio ovih vrsta u prehrani povećava i rizik od izloženosti leptospirama.

Seroprevalencija u srna u ovom istraživanju bila je vrlo niska (2,44 %). Na nešto manjem uzorku srna SLAVICA i sur. (2007.) su u prijašnjim istraživanjima u RH ustanovili seroprevalenciju od 6,07 %. Vrlo slično, FENNESTAD i BORG-PETERSEN (1972.) na području Danske utvrđuju seroprevalenciju od 3,8 %, dok ANDREOLI i sur. (2014.) na području središnjih Alpa u uzorcima srna uopće ne uspijevaju dokazati prisutnost specifičnih protutijela u srneće divljači. Svi navedeni rezultati upućuju da srna vjerojatno nije uobičajeni domaćin leptospira.

Tijekom ovog istraživanja, neočekivano, usprkos relativno visokoj seroprevalenciji od 25%, u bubrezima divljih svinja nismo uspjeli niti kulturelno niti molekularnim metodama dokazati prisustvo leptospira. Radovi drugih autora navode učestalu renalnu, ali i genitalnu kolonizaciju u različitim dobnih kategorija, što pak upućuje na endemsku infekciju i mogući vertikalni, ali i veneralni prijenos među divljim svinjama, kao i visoki rizik infekcije lovaca koji tijekom manipulacije i čišćenja divljači uglavnom ne koriste zaštitne rukavice. Pojedina novija istraživanja upućuju da unutar ekosustava u kojima okolišni uvjeti ne pogoduju

preživljavanju leptospira čak i u domaćih životinja prevladava genitalna kolonizacija i alternativni ciklusi kruženja. Stoga bi u idućim istraživanjima leptospiroze u divljih svinja trebalo pokušati koristiti drugačije metode uzorkovanja tkiva bubrega, ali i genitalnih organa (maternica, testisi, epididimisi) uz obveznu homogenizaciju čitavog ili bar većeg dijela organa kako bi se povećala mogućnost detekcije bakterija ili njihovo izdvajanje.

U slučaju uspješnog izdvajanja, za tipizaciju izdvojenih sojeva mogu se koristiti nove molekularne metode, kao što je primjerice sekvencioniranje ključnih regija genoma (GUGLIELMINI i sur., 2019.). Ovom metodom se tijekom tipizacije soja izdvojenog iz mišolikog glodavca uspjela postići veća razlučivost u odnosu na one dobivene konvencionalnim molekularnim metodama. U filogenijskim je analizama vrlo korisna i BIGSDB baza podataka, koja omogućuje upravljanje i usporedbe s drugim genomima pohranjenima u bazi. Usporedbom ključnih regija genoma svih izolata koji pripadaju klonalnoj skupini 73 i njihovim prikazom pomoću minimalno razgranatog stabla, vrlo je zanimljivo primijetiti da se dostupni izolati izdvojeni iz različitih domaćina u Republici Hrvatskoj svrstavaju u dva međusobno nepovezana klastera. Pritom se soj izdvojen tijekom ovog istraživanja svrstava u klaster u kojem se nalaze uglavnom sojevi izdvojeni iz pasa u okolnom području. Za konkretnije zaključke bit će ipak potrebno pričekati da se ovom metodom pretraži veći broj izolata, s različitih geografskih područja i dobivenim podacima dopuni baza podataka.

Koncept prirodnih žarišta, među ostalim, podrazumijeva da će pojavnost različitih zoonoza ovisiti o promjenama u samom ekosustavu, ali i o brojnim drugim čimbenicima čijom će se aktivacijom omogućiti širenje patogena. Longitudinalne eko-epidemiološke studije koje u obzir uzimaju složene interakcije između mogućih domaćina, ekosustava i određenih rizičnih čimbenika mogle bi razjasniti specifičnu ulogu i relativnu važnost svake životinjske vrste, kao i složenu dinamiku prijenosa u različitim okolišima.

7. ZAKLJUČCI

1. Unutar istraživanog atipičnog prirodnog žarišta najviša seroprevalencija utvrđena je u divljih svinja te potom u lisica, dok je u srna bila vrlo niska. Pritom su i seroprevalencija i učestalost kliconošta u mišolikih glodavaca bili iznimno niski.
2. Potencijal određene životinjske vrste kao rezervoara može se procijeniti samo ukoliko se u obzir uzme i biologija istraživane vrste i ekološka niša unutar koje ona obitava. Pritom se ne smije zanemariti izravan ili neizravan antropogeni utjecaj.
3. U divljih svinja vjerojatnost da će serološka skupina Pomona uzrokovati infekciju bila je značajno veća od mogućnosti infekcije drugim utvrđenim serološkim skupinama, izuzev serološke skupine Australis. Utvrđen je i porast prevalencije s dobi, ali samo u ženki.
4. Razvoj modela za predviđanje nalaza serološki pozitivnih divljih svinja nije polučio očekivani rezultat. Točnost predviđanja pozitivnih jedinki bila je izrazito slaba, vjerojatno zbog širokog areala kretanja i vertikalnih migracija ovih životinja koje uključuju ulazak u periurbana i urbana područja, što povećava antropogeni utjecaj, mijenja dinamiku prijenosa, a samim time i pretkazivače korištene u ovom istraživanju.
5. Točnost predviđanja pronalaska serološki pozitivne lisice iznosila je, ovisno o prediktivnom modelu, 50-75 %. Kao rizični čimbenici izdvajaju se veća količina oborina te okolišne temperature niže od prosjeka, što se može objasniti višim udjelom glodavaca u prehrani lisica tijekom zime. U prilog tome idu i najčešće utvrđene vjerojatno infektivne serološke skupine koje su u lisica bile Australis i Icterohaemorrhagiae, a čiji su rezervoari upravo mišoliki glodavci odnosno štakori.
6. Prevalencija i učestalost infekcija u svih pretraživanih vrsta životinja bila je niža u odnosu na one utvrđene u nizinskim područjima RH, vjerojatno zbog geomorfologije tla koje zbog svoje strukture, nagiba i ocjeditosti ne podržava preživljavanje leptospira u okolišu.

8. POPIS LITERATURE

AHMAD BHAT, K., B. A. BHAT., B. A. GANAI, A. MAJEED, N. KHURSHID, M. MANZOOR (2023): Food habits of the Red Fox *Vulpes vulpes* (Mammalia: Carnivora: Canidae) in Dachigam National Park of the Kashmir Himalaya, India. J. Threat. Taxa 15, 22364–22370.

AHMED, N., S. MANJULATA DEVI, M. DE LOS A 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. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 5, 28.

ANDREOLI, E., E. RADAELLI, I. BERTOLETTI, A. BIANCHI, E. SCANZIANI, S. TAGLIABUE, S. MATTIELLO (2014): *Leptospira* spp. infection in wild ruminants: a survey in Central Italian Alps. Vet. Ital. 50, 285-291.

BALČIAUSKIENĖ, L., L. BALČIAUSKAS (2016): Pelvis of the striped field mouse *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771): sexual dimorphism and relation to body weight. NW J. Zool. 12, 50-57.

BALEN TOPIĆ, M., J. HABUŠ, Z. MILAS, E. ČELJUSKA TOŠEV, Z. ŠTRITOF, N. TURK (2010): Human leptospirosis in Croatia: current status of epidemiology and clinical characteristics. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 104, 202-206.

BARNABÉ, N. N. D. C., R. R. SOARES, D. K. S. BARROS, D. B. NOGUEIRA, F. T. R. D. COSTA, J. P. ARAÚJO JÚNIOR, C. D. MALOSSI, L. S. ULLMANN, D. F. D. COSTA, M. L. C. R. SILVA, S. S. D. S. HIGINO, C. D. S. A. B. SANTOS, S. S. D. AZEVEDO, C. J. ALVES (2023): Bovine Leptospirosis in Caatinga Biome, Brazil: New Insights into Diagnosis and Epidemiology. Trop. Med. Infect. Dis. 8(3), 177.

BARNABÉ, N. N. D. C., R. R. SOARES, D. K. S. BARROS, J. P. ARAÚJO JÚNIOR, C. D. MALOSSI, M. L. C. R. SILVA, A. W. D. L. BRASIL, D. F. D. COSTA, S. S. D. S. HIGINO, C. D. S. A. B. SANTOS, S. S. D. AZEVEDO, C. J. ALVES (2024): The Role of

Transplacental Infection in *Leptospira* spp. Epidemiology in Cattle in Caatinga Biome, Brazil. Microorganisms 12(6), 1044.

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, e01190-17.

BERIĆ, J. (2021): Suzbijanje glodavaca na poljima. Dostupno na: <https://www.savjetodavna.hr/2021/03/03/suzbijanje-glodavaca-na-poljima/?print=print>

BHARTI, A. R., J. E. NALLY, J. N. RICALDI, M. A. MATTHIAS, M. M. DIAZ, M. A. LOVETT, P. N. LEVETT, R. H. GILMAN, M. R. WILLIG, E. GOTUZZO, J. M. VINETZ, PERU-UNITED STATES LEPTOSPIROSIS CONSORTIUM (2003): Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect. Dis. 3, 757-771.

BILUŠIĆ DUMBOVIĆ, B., V. KUŠAN, T. BIROV, S. RAPIĆ, Z. MESIĆ, D. STRESEC (2013): Krajobrazna studija Zagrebačke županije za razinu obrade krajobraznih tipova/područja. Zagrebačka županija, Zavod za prostorno uređenje Zagrebačke županije, Zagreb.

BISTROVIĆ, I. (2018): Logistička regresija u analizi smrtnosti. Završni specijalistički rad. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.

BJEDOV, L. (2015): Odnosi populacija sitnih glodavaca kao rezervoara prirodno-žarišnih zoonoza u šumskim ekosustavima obične bukve (*Fagus sylvatica* L.) u Republici Hrvatskoj. Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Zagreb.

BJEDOV, L., M. VUCELJA, J. MARGALETIĆ (2016a): Priručnik o glodavcima šuma Hrvatske. Hrvatski šumarski institut, Jastrebarsko, Republika Hrvatska.

BJEDOV, L., P. SVOBODA, A. TADIN, J. HABUŠ, Z. ŠTRITOF, N. LABAŠ, M. VUCELJA, A. MARKOTIĆ, N. TURK, J. MARGALETIĆ (2016b): Utjecaj uroda sjemena obične bukve (*Fagus sylvatica* L.) na populacije sitnih glodavaca i pojavnosti hantavirusa u

šumama Nacionalnog parka "Plitvička jezera" i Parka prirode "Medvednica". Šumarski list 140 (9-10), 455–464.

BUJANIĆ, M. (2024): Populacijske značajke srednjoeuropske divlje svinje (*Sus scrofa* L.). U: Afrička svinjska kuga u divljih svinja – osnove i mjere sprječavanja (Konjević, D., M. Bujanić, ur.). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Republika Hrvatska, str. 1-9.

BURNHAM, K. P., D. R. ANDERSON (2002): Model Selection and Multimodal Inference. A Practical Information-Theoretic Approach, 2nd edn. Springer Verlag, New York, 488 pp.

CAMERON, C. E. (2015): Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 387, 21-41.

CAVALLINI, P. (1996): Variation in the social system of the red fox. Ethol. Ecol. Evol. 8, 323–342.

CHIARI, M., B. M. FIGAROLLI, S. TAGLIABUE, G. L. ALBORALI, M. BERTOLETTI, A. PAPETTI, M. D'INCAU, M. ZANONI, M. B. BONIOTTI (2016): Seroprevalence and risk factors of leptospirosis in wild boars (*Sus scrofa*) in Northern Italy. Hystrix, Ital. J. Mammal. 27, 145-149.

CILIA, G., F. BERTELLONI, M. ANGELINI, D. CERRI, F. FRATINI (2020a): *Leptospira* Survey in Wild Boar (*Sus scrofa*) Hunted in Tuscany, Central Italy. Pathogens 9: 377.

CILIA, G., F. BERTELLONI, I. PIREDDA, M. N. PONTI, B. TURCHI, C. CANTILE, F. PARISI, P. PINZAUTI, A. ARMANI, B. PALMAS, M. NOWOROL, D. CERRI, F. FRATINI (2020b): Presence of pathogenic *Leptospira* spp. in the reproductive system and fetuses of wild boars (*Sus scrofa*) in Italy. PLoS Negl. Trop. Dis. 14: e0008982.

CONTESSE, P., D. HEGGLIN, S. GLOOR, F. BONTADINA, P. DEPLAZES (2004): The diet of urban foxes (*Vulpes vulpes*) and the availability of anthropogenic food in the city of Zurich, Switzerland. Mammal. Biol. 69, 81-95.

COSTA, F., J. E. HAGAN, J. CALCAGNO, M. KANE, P. TORGERSON, M. S. MARTINEZ-SILVEIRA, C. STEIN, B. ABELA-RIDDER, A. I. KO (2015): Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. PLoS Negl Trop Dis. 9(9): e0003898.

CVETNIĆ, Ž., J. MARGALETIĆ, J. TONČIĆ, N. TURK, Z. MILAS, S. ŠPIČIĆ, I. JURIĆ, M. LOJKIĆ, S. TERZIĆ, L. JEMERŠIĆ, A. HUMSKI, M. MITAK, B. HABRUN, B. KRT (2003): A serological survey and isolation of leptospires from small rodents and wild boars in the Republic of Croatia. Vet. Med.-Czech 48, 321-329.

ČEOVIĆ, I. (1953): Lovstvo. Lovačka knjiga, Zagreb, Hrvatska.

DA LUZ MATHIAS, M., E. B. HART, M. DA GRACA RAMALHINHO, M. JAAROLA (2017): *Microtus agrestis* (Rodentia: Cricetidae). Mamm. Species 49, 23–39.

DELCOURT, J., B. BROCHIER, D. DELVAUX, D. VANGELUWE, P. PONCIN (2022): Fox *Vulpes vulpes* population trends in Western Europe during and after the eradication of rabies. Mammal. Rev. 52, 343-359.

DELL'ARTE, G. L., T. LAAKSONEN, K. NORRDAHL, E. KORPIMÄKI (2007): Variation in the diet composition of a generalist predator, the red fox, in relation to season and density of main prey. Acta Oecol. 31, 276-281.

DERNE, B. T., E. J. FEARNLEY, C. L. LAU, S. PAYNTER, P. WEINSTEIN (2011): Biodiversity and leptospirosis risk: a case of pathogen regulation? Med. Hypotheses 77, 339–344.

DIKKEN, H., E. KMETY (1978): Serological typing methods of leptospires. In: Methods in Microbiology, vol. 11 (Bergan, T., J. R. Norris, eds.). Academic Press, New York, USA, pp. 259–307.

DOUCHET, L., C. MENKES, V. HERBRETEAU, J. LARRIEU, M. BADOR, C. GOARANT, M. MANGEAS (2024): Climate-driven models of leptospirosis dynamics in tropical islands from three oceanic basins. PLoS Negl Trop Dis 18(4), e0011717.

- ELLIS, W. A. (2015): Animal Leptospirosis. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 387, 99-137.
- FAINE, S., B. ADLER, C. BOLIN, P. PEROLAT (1999): *Leptospira* and Leptospirosis, 2nd edn. Medisci Press, Melbourne, Australia.
- FENNESTAD, K. L., C. BORG-PETERSEN (1972): Leptospirosis in Danish wild mammals. J. Wildl. Dis. 8, 343-351.
- FERNÁNDEZ-LLARIO, P. (2004): Environmental correlates of nest site selection by wild boar *Sus scrofa*. Acta Theriol 49, 383–392.
- FERNÁNDEZ-LLARIO, P., A. P. MØLLER (2019): Canine size, condition and health in wild boars. J. Zool. 309, 35–42.
- FONSECA, C., A. A. DA SILVA, J. ALVES, J. VINGADA, A. M. V. M. SOARES (2010): Reproductive performance of wild boar females in Portugal. Eur. J. Wildl. Res. 57, 363–371.
- FRAUENDORF, M., F. GETHÖFFER, U. SIEBERT, O. KEULING (2016): The influence of environmental and physiological factors on the litter size of wild boar (*Sus scrofa*) in an agriculture dominated area in Germany. Sci. Tot. Environ. 541, 877-882.
- FRKOVIĆ, A. (2006): Priručnik za ocjenjivanje lovačkih trofeja. Hrvatski lovački savez, Zagreb.
- GALLOWAY, R. L., P. N. LEVETT (2008): Evaluation of a modified pulsed-field gel electrophoresis approach for the identification of *Leptospira* serovars. ASTMH 78, 628–632.
- GALTON, M. M. (1959): The Epidemiology of Leptospirosis in the United States. Public Health Reports (1896-1970) 74, 141–148.
- GROVES, C. P., P. GRUBB (1993): The Eurasian suids, *Sus* and *Babirusa* - Taxonomy and Description. In: Pigs, Peccaries and Hippos: Status Survey and Action Plan (Gland, O. W. L. R., ed.). IUCN, Switzerland, pp. 126-134.

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: e0007374.

HAAKE, D. A., P. N. LEVETT (2015): Leptospirosis in Humans. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 387, 65-97.

HABUŠ, J. (2013): Genska sljedivost patogenih bakterija roda *Leptospira* u prirodnom žarištu leptospiroze. Doktorski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

HABUŠ, J., Z. PERŠIĆ, S. ŠPIČIĆ, S. VINCE, Z. ŠTRITOF, Z. MILAS, Ž. CVETNIĆ, M. PERHARIĆ, N. TURK (2017): New trends in human and animal leptospirosis in Croatia, 2009–2014. Acta Tropica 168, 1-8.

HAMOND, C., G. MARTINS, M. A. MEDEIROS, W. LILENBAUM (2013): Presence of Leptospiral DNA in Semen Suggests Venereal Transmission in Horses. J. Equine Vet. Sci. 33, 1157-1159.

HANDLER, A. M., E. V. LONSDORF, D. R. ARDIA (2020): Evidence for red fox (*Vulpes vulpes*) exploitation of anthropogenic food sources along an urbanization gradient using stable isotope analysis. Can. J. Zool. 98, 79-87.

HARTSKEERL, R. A., H. L. SMITS, H. KORVER, M. G. A. GORIS, W. J. TERPSTRA (2006): Manual International Course on Laboratory Methods for the Diagnosis of Leptospirosis KIT. Amsterdam, The Netherlands.

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.

HELL, P., M. HRNČIAR, M. ŠIMIÁK (1984): Distribution and territorial planning of wild boar (*Sus scrofa* L.) in Slovakia. Folia venatoria 14, 71-88.

HEWISON, A. J.M., J. P. VINCENT, J. JOACHIM, J. M. ANGIBAUT, B. CARGNELUTTI, C. CIBIEN (2001): The effects of woodland fragmentation and human activity on roe deer distribution in agricultural landscapes. *Can. J. Zool.* 79, 679-689.

HILLSON, S. (2005): *Teeth*, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

HORVÁTH, G. F., D. TÓTH (2018): Abundance of bank vole (*Myodes glareolus* Schreb.) as an indicative factor of different forest structure and management in the Drava plain region. *Šumarski list* 142 (3–4), 161–170.

HOSMER, D. W., S. LEMESHOW (2000): *Applied Logistic Regression*, 2nd edn. John Wiley & Sons Inc, New York, 375 pp.

HOSMER, D. W., L. STANLEY, X. S. RODNEY (2013): *Applied Logistic Regression*, 3rd edn. John Wiley & Sons Inc, New York, 528 pp.

JANICKI, Z., D. SAKAR, A. SLAVICA, D. KONJEVIĆ, K. SEVERIN (2003): Distribution of fox burrows at the north-west area of Croatia. *Zbornik sažetaka 8. hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem* (Besendorfer, V., N. Kopjar, ur.). Hrvatsko biološko društvo, Zagreb, pp. 238-239.

JANICKI, Z., A. SLAVICA, D. KONJEVIĆ, K. SEVERIN (2007): *Zoologija divljači*. Zavod za biologiju, patologiju i uzgoj divljači Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

JANSEN, A., E. LUGE, B. GUERRA, P. WITTSCHEN, A. D. GRUBER, C. LODDENKEMPER, T. SCHNEIDER, M. LIERZ, D. EHLERT, B. APPEL, K. STARK, K. NÖCKLER (2007): Leptospirosis in urban wild boars, Berlin, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 739-742.

JĘDRZEJEWSKA, B., W. JĘDRZEJEWSKI, A. N. BUNEVICH, L. MIŁKOWSKI, Z. A. KRASIŃSKI (1997): Factors shaping population densities and increase rates of ungulates in Białowieża Primeval Forest (Poland and Belarus) in the 19th and 20th centuries. *Acta Theriol.* 42, 399-451.

JEPSEN, J. U., C. J. TOPPING (2004): Modelling roe deer (*Capreolus capreolus*) in a gradient of forest fragmentation: behavioural plasticity and choice of cover. *Can. J. Zool.* 82, 1528-1541.

KESTERČANEK, F. Ž. (1896): Lovstvo. Nakladom Kr. Hrv.-Slav.-Dalm. Zemaljske Vlade, Zagreb.

KMETY, E., H. DIKKEN (1993): Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. University Press Groningen, Groningen, Netherlands.

KONJEVIĆ, D. (2005): Divlja svinja (*Sus scrofa* L.) – od biologije do kuhinje. *Meso* VII(6), 49-52.

KONJEVIĆ, D., V. NJEMIROVSKIJ, T. KEROS (2007): Osobitosti trajnorastućih zuba divljači. *Vet. stn.* 38, 207–213.

KONJEVIĆ, D. (2008): Srna obična (*Capreolus capreolus*): od uzgoja do visokovrijedne namirnice. *Meso* 10(1), 52-58.

KONJEVIĆ, D., I. SUČEC, N. TURK, LJ. BARBIĆ, J. PRPIĆ, K. KRAPINEC, M. BUJANIĆ, L. JEMERŠIĆ, T. KEROS (2022): Epidemiology of Aujeszky disease in wild boars (*Sus scrofa* L.) in Croatia. *Vet. Res. Commun.* 47, 631-639.

KOPIJ, G., M. PANEK (2016): Effect of Winter Temperature and Maize Food Abundance on Long-Term Population Dynamics of the Wild Boar *Sus scrofa*. *Pol. J. Ecol.* 64, 436-441.

KRAPINEC, K., (2020): Program zaštite divljači za dio Parka prirode "Medvednica" – Grad Zagreb za razdoblje 2020. / 2021.-2029. / 2030. Grad Zagreb, Gradski ured za poljoprivredu i šumarstvo.

KUHNERT, P., I. BRODARD, S. ACKERMANN, P. SCHIERACK, J. JORES (2024): Serological and molecular detection as well as typing of *Leptospira* spp. in foxes, raccoons, and other wild carnivores in North-Eastern Germany, 2021–2022. *Heliyon* 10 (1).

KUIKEN, T., J. E. VAN DIJK, W. J. TERPSTRA, B. A. BOKHOUT (1991): The role of the common vole (*Microtus arvalis*) in the epidemiology of bovine infection with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. Vet. Microbiol. 28, 353-361.

LANTOVÁ, P., V. LANTA (2009): Food selection in *Microtus arvalis*: the role of plant functional traits. Ecol. Res. 24, 831-838.

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.

LEVETT, P. N. (2001): Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 14, 296-326.

LEVETT, P. N. (2004): Leptospirosis: A forgotten zoonosis? Clin. Appl. Immunol. Rev. 4, 435-448.

LEVETT, P. N. (2015): Systematics of *Leptospiraceae*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 387, 11-20.

LINDSØ, L. K., P. DUPONT, L. RØD-ERIKSEN, I. PERNILLE ØYSTESE ANDERSSKOG, K. ROALDSNES ULYUND, Ø. FLAGSTAD, R. BISCHOF, N. E. EIDE (2022): Estimating red fox density using non-invasive genetic sampling and spatial capture–recapture modelling. Oecologia 198, 139–151.

LLOYD-SMITH, J. O., D. J. GREIG, S. HIETALA, G. S. GHNEIM, L. PALMER, J. ST LEGER, B. T. GRENFELL, F. M. D. GULLAND (2007): Cyclical changes in seroprevalence of leptospirosis in California sea lions: endemic and epidemic disease in one host species? BMC Infect. Dis. 7, 125.

LORENZINI, R., R. FANELLI, F. TANCREDI, A. SICLARI, L. GAROFALO (2020): Matching STR and SNP genotyping to discriminate between wild boar, domestic pigs and their recent hybrids for forensic purposes. Sci. Rep. 10, 3188.

LOVRIĆ, Z., B. KOLARIĆ, M. L. KOSANOVIĆ LIČINA, M. TOMLJENović, O. ĐAKOVIĆ RODE, K. DANIS, B. KAIĆ, V. TEŠIĆ (2018): An outbreak of haemorrhagic fever with renal syndrome linked with mountain recreational activities in Zagreb, Croatia, 2017. *Epidemiol. Infect.* 146, 1236-1239.

LUNN, K. F. (2022a): Leptospirosis in Animals – Overview. MSD MANUAL. Veterinary Manual. Dostupno na: <https://www.msdsvetmanual.com/generalized-conditions/leptospirosis/leptospirosis-in-animals-overview>

LUNN, K. F. (2022b): Leptospirosis in Dogs. MSD MANUAL. Veterinary Manual. Dostupno na: <https://www.msdsvetmanual.com/infectious-diseases/leptospirosis/leptospirosis-in-dogs>

MACDONALD, D. W., J. C. REYNOLDS (2008): *Vulpes vulpes*. In: IUCN Red List of Threatened Species, version 2012.2. Dostupno na: <http://www.iucnredlist.org>

MACHADO, F. P., L. B. KMETIUK, M. PELLIZZARO, A. C. YAMAKAWA, C. M. MARTINS, V. M. MORIKAWA, I. R. DE BARROS-FILHO, H. LANGONI, A. P. DOS SANTOS, A. W. BIONDO (2021): *Leptospira* spp. antibody in wild boars (*Sus scrofa*), hunting dogs (*Canis lupus familiaris*), and hunters of Brazil. *J. Wildl. Dis.* 57, 184-188.

MAGAJEVSKI, F. S., R. J. S. GIRIO, L. A. MATHIAS, S. MYASHIRO, M. É. GENOVEZ, E. P. SCARCELLI (2005): Detection of *Leptospira* spp. in the semen and urine of bulls serologically reactive to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *Braz. J. Microbiol.* 36, 43-47.

MALKHAZOVA, S. M., V. A. MIRONOVA, T. V. KOTOVA, N. V. SHARTOVA, D. S. ORLOV (2014): Natural-focal diseases: mapping experience in Russia. *Int. J. Health. Geogr.* 13, 21.

MARSH, A. C. W., S. POULTON, S. HARRIS (2001): The Yellow-necked Mouse *Apodemus flavicollis* in Britain: status and analysis of factors affecting distribution. *Mammal. Rev.* 31, 203-227.

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.

MILAS, Z., V. SRUK, N. TURK, V. STAREŠINA, Z. ŠTRITOF, Z. MODRIĆ (2007): Leptospiral antibodies in wild boar (*Sus scrofa*) in northwest Croatia. Proceedings of the 5th Meeting of the International Leptospirosis Society, 17-20 September, Quito, Ecuador, pp. 59-61.

MILAS, Z., Z. ŠTRITOF MAJETIĆ, J. HABUŠ, V. MOJČEC PERKO, V. STAREŠINA, LJ. BARBIĆ, V. STEVANOVIĆ, M. PERHARIĆ, B. LJUBIĆ, N. TURK (2013): The occurrence and maintenance of *Leptospira* serovars Australis and Bratislava in domestic and wild animals in Croatia. Vet. arhiv 83, 357-369.

MILES, A. E. W., C. GRIGSON (1990): Colyer's Variations and diseases of the teeth of animals, revised edition. Cambridge University Press, Edinburgh.

MILLÁN, J., M. G. CANDELA, J. V. LÓPEZ-BAO, M. PEREIRA, M. A. JIMÉNEZ, L. LEÓN-VIZCAÍNO (2009): Leptospirosis in wild and domestic carnivores in natural areas in Andalusia, Spain. Vector Borne Zoonotic Dis. 9, 549-554.

MIŠIĆ-MAJERUS, LJ., J. HABUŠ, Z. ŠTRITOF, N. BUJIĆ, V. MAĐARIĆ, G. KOLARIC-SVIBEN, S. VINCE, Z. PERŠIĆ, N. TURK (2017): Epidemiological and clinical features of leptospirosis in a highly endemic area over three time periods. Trop. Med. Int. Health 22, 1405–1413.

MORGAN, J., S. L. BORNSTEIN, A. M. KARPATI, M. BRUCE, C. A. BOLIN, C. C. AUSTIN, C. W. WOODS, J. LINGAPPA, C. LANGKOP, B. DAVIS, D. R. GRAHAM, M. PROCTOR, D. A. ASHFORD, M. BAJANI, S. L. BRAGG, K. SHUTT, B. A. PERKINS, J. W. TAPPERO, LEPTOSPIROSIS WORKING GROUP (2002): Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. Clin. Infect. Dis. 34, 1593–1599.

MUJEZINOVIĆ, O., J. MARGALETIĆ, T. TREŠTIĆ, M. DAUTBAŠIĆ (2013): Utjecaj staništa na prisutnost šumske voluharice (*Myodes glareolus*) i žutogrlog šumskog miša (*Apodemus flavicollis*) na području Bosne. Šumarski list 137 (9-10), 487-494.

NAGELKERKE, N. J. D. (1991): A note on a general definition of the coefficient of determination. Biometrika 78, 691-692.

NIKOLANDIĆ, D., D. DEGMEČIĆ (2007): Plodnost i veličina legla kod europske srne (*Capreolus capreolus*, L.) u šumi Haljevo. Šumarski list 131(9), 465-474.

PANČIĆ, S., D. JUG, M. IVEZIĆ, I. ŽUGEC (2004): Utjecaj višekratne deratizacije i reducirane obrade tla na dinamiku populacije poljske voluharice (*Microtus arvalis* Pallas, 1778) u usjevu ozime pšenice. Poljoprivreda 1(10), 31-34.

PANDŽIĆ, K., T. LIKSO (2013): Praćenje i ocjena klime u 2011. godini. Prikazi br. 23, Republika Hrvatska, Državni hidrometeorološki zavod, Zagreb, 32 pp.

PANDŽIĆ, K., T. LIKSO (2014a): Praćenje i ocjena klime u 2012. godini. Prikazi br. 24, Republika Hrvatska, Državni hidrometeorološki zavod, Zagreb, 38 pp.

PANDŽIĆ, K., T. LIKSO (2014b): Praćenje i ocjena klime u 2013. godini. Prikazi br. 25, Republika Hrvatska, Državni hidrometeorološki zavod, Zagreb, 38 pp.

PANDŽIĆ, K., T. LIKSO (2015): Praćenje i ocjena klime u 2014. godini. Prikazi br. 26, Republika Hrvatska, Državni hidrometeorološki zavod, Zagreb, 38 pp.

PANDŽIĆ, K., T. LIKSO (2016): Praćenje i ocjena klime u 2015. godini. Prikazi br. 27, Republika Hrvatska, Državni hidrometeorološki zavod, Zagreb, 37 pp.

PANDŽIĆ, K., T. LIKSO (2017): Praćenje i ocjena klime u 2016. godini. Prikazi br. 28, Republika Hrvatska, Državni hidrometeorološki zavod, Zagreb, 37 pp.

PANDŽIĆ, K., T., LIKSO, T. TROŠIĆ LESAR, M. MOKORIĆ (2018): Praćenje i ocjena klime u 2017. godini. Prikazi br. 29, Republika Hrvatska, Državni hidrometeorološki zavod, Zagreb, 62 pp.

PANDŽIĆ, K., T. LIKSO, T. TROŠIĆ LESAR (2019): Praćenje i ocjena klime u 2018. godini. Prikazi br. 30, Republika Hrvatska, Državni hidrometeorološki zavod, Zagreb, 63 pp.

PANDŽIĆ, K., T., LIKSO, T. TROŠIĆ LESAR (2020): Praćenje i ocjena klime u 2019. godini. Prikazi br. 31, Republika Hrvatska, Državni hidrometeorološki zavod, Zagreb, 59 pp.

PEDERSEN, K., T. D. ANDERSON, R. M. MAISON, G. W. WISCOMB, M. J. PIPAS, D. R. SINNETT, J. A. BAROCH, T. GIDLEWSKI (2018): *Leptospira* antibodies detected in wildlife in the USA and the US Virgin Islands. J. Wildl. Dis. 54, 450-459.

POULAKIDA, I., O. S. KOTSIU, S. BOUTLAS, D. STERGIOULA, G. PAPADAMOU, K. I. GOURGOULIANIS, D. PAPAGIANNIS (2024): Leptospirosis incidence post-flooding following storm Daniel: The first case series in Greece. Infect. Dis. Rep. 16, 880-887.

RIOTTE-LAMBERT, L., A. RÉMY, H. P. ANDREASSEN (2012): The disturbance of resident populations of field voles (*Microtus agrestis*) by immigrants. Ann. Zool. Fenn. 49, 103-112.

RISTOW, P., P. BOURHY, S. KERNEIS, C. SCHMITT, M.-C. PREVOST, W. LILENBAUM, M. PICARDEAU (2008): Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. Microbiol. 154, 1309-1317.

ROQUELO, C., A. KODJO, J.-L. MARIÈ, B. DAVOUST (2021): Serological and molecular survey of *Leptospira* spp. infections in wild boars and red foxes from Southeastern France. Veterinary World 14, 825-828.

ROULICHOVÁ, J., M. ANDĚRA (2007): A Simple method of age determination in red fox, *Vulpes vulpes*. Folia Zoologica 56, 440-444.

SCHREIER, S., G. DOUNGCHAWEE, S. CHADSUTHI, D. TRIAMPO, W. TRIAMPO (2013): Leptospirosis: current situation and trends of specific laboratory tests. *Expert. Rev. Clin. Immunol.* 9, 263-80.

SEMPÉRÉ, A. J., V. E. SOKOLOV, A. A. DANILKIN (1996): *Capreolus capreolus*. *Mamm. Species*, 538, 1–9.

SILVA PINTO JORGE, R., F. FERREIRA, J. SOARES FERREIRA NETO, S. DE ARRUDA VASCONCELLOS, E. DE SOUZA LIMA, Z. MARIA DE MORAIS, G. OLIVEIRA DE SOUZA (2011): Exposure of free-ranging wild carnivores, horses and domestic dogs to *Leptospira* spp in the northern Pantanal, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106, 441-444.

SLAVICA, A., Ž. CVETNIĆ, Z. MILAS, Z. JANICKI, N. TURK, D. KONJEVIĆ, K. SEVERIN, J. TONČIĆ, Z. LIPEJ (2007): Incidence of leptospiral antibodies in different game species over a 10-year period (1996–2005) in Croatia. *Eur. J. Wildl. Res.* 54, 305–311.

SLAVICA, A., Ž. CVETNIĆ, D. KONJEVIĆ, Z. JANICKI, K. SEVERIN, D. DEŽDEK, V. STAREŠINA, M. SINDIČIĆ, J. ANTIĆ (2010): Detection of *Leptospira* spp. serovars in wild boars (*Sus scrofa*) from continental Croatia. *Vet. arhiv* 80, 247-257.

SMYTHE, L. D. (2008): Leptospirosis. Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedure, pp. 1-17.

SPITZENBERGER, F., S. ENGELBERGER (2014): A new look at the dynamic western distribution border of *Apodemus agrarius* in Central Europe (Rodentia: Muridae). *Lynx*, n. s. (Praha) 45, 69–79.

STODDARD, R. A. (2013): Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through real-time PCR (qPCR) targeting the LipL32 gene. *Methods Mol. Biol.* 943, 257-266.

STRAUB, M. H., J. L. RUDD, L. W. WOODS, D. L. CLIFFORD, J. E. FOLEY (2021): *Leptospira* prevalence and its association with renal pathology in mountain lions (*Puma concolor*) and bobcats (*Lynx rufus*) in California, USA. *J. Wildl. Dis.* 57, 27-39.

STUBBE, CH., S. MEHLITZ, R. PEUKERT, J. GORETZKI, W. STUBBE, H. MEYNHARDT (1989): Lebensraumnutzung und Populationsumsatz des Schwarzwildes in der DDR – Ergebnisse der Wildmarkierung. Beitr. Jagd- Wildforsch. 16, 212-231.

SUMANTA, H., T. WIBAWA, S. HADISUSANTO, A. NURYATI, H. KUSNANTO (2015): Spatial Analysis of *Leptospira* in Rats, Water and Soil in Bantul District Yogyakarta Indonesia. Open J. Epidemiol. 5, 22-31.

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(4), 395.

ŠKALFA, I. (2000): Divlja svinja. Lovački vjesnik 119 (11), 22-24.

ŠPREM, N. (2009): Morfološke i genetske osobine divljih svinja (*Sus scrofa* L.) u Republici Hrvatskoj. Doktorski rad. Poljoprivredni fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Osijek.

ŠPREM, N., T. SAFNER, T. TREER, T. FLORIJAČIĆ, J. JURIĆ, V. ČUBRIC-ČURIK, A. C. FRANTZ, I. ČURIK (2016): Are the dinaric mountains a boundary between continental and mediterranean wild boar populations in Croatia?. Eur. J. Wildl. Res. 62, 167–177.

ŠTRITOF, Z. (2010): Molekularna epizootiologija leptospiroze u mišolikih glodavaca. Doktorska disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

TACK, J. (2018): Wild Boar (*Sus scrofa*) populations in Europe: a scientific review of population trends and implications for management. European Landowners' Organization, Brussels, 56 pp.

TADIN, A., L. BJEDOV, J. MARGALETIĆ, B. ŽIBRAT, L. CVETKO KRAJINOVIĆ, P. SVOBODA, I. C. KUROLT, Z. ŠTRITOF MAJETIĆ, N. TURK, O. ĐAKOVIĆ RODE, R. ČIVLJAK, I. KUZMAN, A. MARKOTIĆ (2014): High infection rate of bank voles (*Myodes glareolus*) with Puumala virus is associated with a winter outbreak of haemorrhagic fever with renal syndrome in Croatia. Epidemiol. Infect. 142, 1945-1951.

TEW, T. E., D. W. MACDONALD (1994): Dynamics of space use and male vigour amongst wood mice, *Apodemus sylvaticus*, in the cereal ecosystem. Behav. Ecol. Sociobiol. 34, 337–345.

TIBCO Software Inc. (2018): Statistica (data analysis software system), version 13. <http://tibco.com>.

UZUN, I. (2008): Suzbijanje glodavaca u voćnjacima. Specijalistički rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.

VAN BELKUM, A. (2007): Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). FEMS Immunol. Med. Microbiol. 49, 22–27.

VITALE, M., S. AGNELLO, M. CHETTA, B. AMATO, G. VITALE, C. D. BELLA, D. VICARI, V. D. M. L. PRESTI (2018): Human leptospirosis cases in Palermo Italy. The role of rodents and climate. J. Infect. Publ. Health 11, 209-214.

VRATARIĆ, P. (2001): Divlja svinja. Lovački vjesnik 120 (11), 18-22.

WAGENKNECHT, E. (1984): Altersbestimmung des erlegten Wildes. Neumann – Neudamm, Melsungen, Germany.

WALKER, M. D. (2018): Leptospirosis: the possible risk to those participating in water-based sports and activities. Br. J. Gen. Pract. 68, 394–395.

WEBBON, C. C., P. J. BAKER, N. C. COLE, S. HARRIS (2006): Macroscopic prey remains in the winter diet of foxes *Vulpes vulpes* in rural Britain. Mammal. Rev. 36, 85–97.

WOLTON, R. J. (1983): The Activity of Free-Ranging Wood Mice *Apodemus sylvaticus*. J. Anim. Ecol. 52, 781-794.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2003): Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010): Report of the first meeting of the leptospirosis burden epidemiology reference group.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2011): Report of the second meeting of the leptospirosis burden epidemiology reference group.

XU, J., J. CHEN, C. XIONG, L. QIN, B. HU, M. LIU, Y. REN, Y. LI, K. CAI, L. CHEN, W. HOU (2023): Pathogenic *Leptospira* Infections in Hubei Province, Central China. Microorganisms 11: 99.

YALKOVSKAYA, L., P. SIBIRYAKOV, A. BORODIN (2022): Phylogeography of the striped field mouse (*Apodemus agrarius* Pallas, 1771) in light of new data from central part of Northern Eurasia. PLoS One, 17, 1-17.

YANAGIHARA, Y., S. Y. A. M. VILLANUEVA, N. NOMURA, M. OHNO, T. SEKIYA, C. HANDABILE, M. SHINGAI, H. HIGASHI, S. YOSHIDA, T. MASUZAWA, N. G. GLORIANI, M. SAITO, H. KIDA (2022): *Leptospira* Is an Environmental Bacterium That Grows in Waterlogged Soil. Microbiol. Spectr. 10, 1-9.

ZAMIR, L., M. BAUM, S. BARDENSTEIN, S. E. BLUM, J. MORAN-GILAD, M. PERRY MARKOVICH, R. KING, R. LAPID, F. HAMAD, B. EVEN-TOV, E. ELNEKAVE (2022): The association between natural drinking water sources and the emergence of zoonotic leptospirosis among grazing beef cattle herds during a human outbreak. One Health 14: 100372.

ZAVITSANOU, A., F. BABATSIKOU (2008): Leptospirosis: epidemiology and preventive measures. Health Sci. J. 2, 75-82.

ŻMUDZKI, J., A. JABŁOŃSKI, A. NOWAK, S. ZĘBEK, Z. ARENT, Ł. BOCIAN, Z. PEJSK (2016): First overall report of *Leptospira* infections in wild boars in Poland. Acta Vet. Scand. 58, 3.

ŽELE-VENGUŠT, D., R. LINDTNER-KNIFIC, N. MLAKAR-HRŽENJAK, K. JERINA, G. VENGUŠT (2021): Exposure of Free-Ranging Wild Animals to Zoonotic *Leptospira interrogans* Sensu Stricto in Slovenia. *Animals* 11(9), 2722.

9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

Marinela Tadić rođena je 24. veljače 1984. u Sisku, Republika Hrvatska. Osnovnu i srednju školu završila je u Sisku. 2008. godine diplomirala je na Filozofskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer anglistika i bohemistika. 2014. godine diplomirala je na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 2017. godine upisuje poslijediplomski znanstveni sveučilišni doktorski studij iz veterinarskih znanosti. 2017. godine polaže stručni ispit za nastavnika engleskog jezika.

Tijekom studija veterine dobila je dvije dekanove nagrade te nagradu "Dr. Suzana Tkalčić ONE HEALTH award".

Tijekom studija veterine bila je demonstrator na Zavodu za veterinarsku ekonomiku i analitičku epidemiologiju te na Katedri za strane jezike.

Nakon završetka studija veterine od 17.12.2014. do 18.10.2015. radi kao dr. med. vet. (stručno osposobljavanje za rad bez zasnivanja radnog odnosa, poslodavac Mario-veterina d.o.o., Sisak). Od 19.10.2015. do 14.3.2016. radi kao nastavnica engleskog jezika u Strukovnoj školi Sisak. Od 15.3.2016. do 30.6.2017. radi kao učiteljica engleskog jezika u Osnovnoj školi "Braća Bobetko" Sisak. Od 5.9.2017. do 14.1.2018. radi kao učiteljica engleskog jezika u Osnovnoj školi Sela te od 11.9.2017. do 10.1.2018. kao nastavnica engleskog jezika u Srednjoj školi Viktorovac. Od 15.1.2018. do rujna 2021. radi kao nastavnica engleskog jezika u Srednjoj školi Petrinja. Od rujna 2021. do rujna 2023. radi kao nastavnica stručnih predmeta iz područja veterinarske medicine u Srednjoj školi Petrinja. Od rujna 2023. radi kao nastavnica engleskog jezika i nastavnica stručnih predmeta iz područja veterinarske medicine u Srednjoj školi Petrinja. U travnju 2024. održala je predavanja u sklopu ERASMUS KA121 (suradnja s portugalskom srednjom školom).

Članica je Hrvatske veterinarske komore.

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA:

TADIĆ, M., D. KONJEVIĆ, V. MOJČEC PERKO, Z. ŠTRITOF, I. ZEČEVIĆ, I. BENVIN, Z. MILAS, N. TURK, M. BUJANIĆ, S. HAĐINA, J. HABUŠ (2024): The occurrence of *Leptospira* spp. serogroup Pomona infections in wild boars. Vet. stn. 56, 225-233.

TADIĆ, M., D. KONJEVIĆ, V. MOJČEC PERKO, Z. ŠTRITOF, Z. MILAS, N. TURK, M. BUJANIĆ, S. HAĐINA, J. HABUŠ (2021): Serological survey of *Leptospira* spp. in wild

boars from Medvednica Nature Park. 9th International Congress Veterinary Science and Profession Book of abstracts, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 76.

PAVLAK, M., M. TADIĆ, V. STEVANOVIĆ, I. LOHMAN JANKOVIĆ, LJ. MALTAR, T. KIŠ, I. SUČEC, LJ. BARBIĆ (2015): Assessing the validity of an ELISA test for the serological diagnosis of equine viral arteritis. Proceedings 14th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, Mérida, Yucatan, Mexico, 230.

TADIĆ, M. (2014): Pouzdanost imunoenzimnog testa u dijagnostici virusnog arteritisa konja. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

ŠIMIĆ, I., M. TADIĆ, V. STEVANOVIĆ (2012): Emerging pathogen – *Bartonella henselae*. From lymph node to spleen. Proceedings of 23rd Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology, Zagreb.

ŠIMIĆ, I., M. TADIĆ, N. LEMO (2012): Canine Atopic Dermatitis: the Comparative Approach. Acta Clin. Croat. 51, 182.

TADIĆ, M. (2008): The relationship between adjectives and verbs in the predicative position in the modern English language. Diplomski rad. Filozofski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.