

- terisation of *Leptospira* spp. strains isolated from small rodents in Croatia. *Epidemiol Infect* 2003; 130: 159–166.
- [20] Hookey JV. Characterization of *Leptospiraceae* by 16S restriction fragment length polymorphisms. *J Gen Microbiol* 1993; 139: 1681–1689.
- [21] Pérolat P, Lecuyer I, Postic D, Baranton G. Diversity of ribosomal DNA fingerprints of *Leptospira* serovars provides a database for subtyping and species assignment. *Res Microbiol* 1993; 144: 5–15.
- [22] Pérolat P, Merien F, Ellis WA, Baranton G. Characterization of *Leptospira* isolates from serovar hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR and mapped restriction site polymorphism. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1949–1957.
- [23] Herrmann JL, Baril C, Bellenger E, Pérolat P, Baranton G, Saint Girons I. Genome conservation in isolates of *Leptospira interrogans*. *J Bacteriol* 1991; 173: 7582–7588.
- [24] Herrmann JL, Bellenger E, Pérolat P, Baranton G, Saint Girons I. Pulsed-field gel electrophoresis of *NotI* digests of leptospiral DNA; a new rapid method of serovar identification. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1696–1702.
- [25] Collares-Pereira M, Korver H, Cao Thi BV, Santos-Reis M, Bellenger E, Baranton G, Terpstra WJ. Analysis of *Leptospira* isolates from mainland Portugal and the Azores islands. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 185: 181–187.
- [26] Postic D, Riquelme-Sertour N, Merien F, Pérolat P, Baranton G. Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: application to *L. meyeri*. *Res Microbiol* 2000; 151: 333–341.
- [27] Ciceroni L, Ciarrocchi S, Ciervo A, Petrucca A, Pinto A, Calderaro A, Viani I, Galati L, Dettori G, Chezzi C. Differentiation of leptospire of the serogroup *Pomona* by monoclonal antibodies, pulsed-field gel electrophoresis and arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Res Microbiol* 2002; 153: 37–44.
- [28] Galloway R, Levett PN. Evaluation of a modified pulsed-field gel electrophoresis approach for the identification of *Leptospira* serovars. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78: 628–632.
- [29] Ellinghausen HC, McCullough WG. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am J Vet Res* 1965; 26: 45–51.
- [30] Johnson RC, Harris WG. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire. Growth at low temperatures. *J Bacteriol* 1967; 94: 27–31.
- [31] Mérien F, Amouriaux P, Pérolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2219–2224.
- [32] Zaharija I. Sojevi *L. canicola* izolirani iz pasa u Zagrebu (Hrvatska). *Vet arhiv* 1954; 24: 13–14.
- [33] Zaharija I. Mikromamalijska Hrvatske – rezervoari leptospira. Zbornik radova III naučnog sastanka infektologa Jugoslavije, Portorož 1968, Partizanska knjiga, Ljubljana. 1968. (Citirano iz Zaharija I, Fališevac J, Borčić B, Modrić Z. Leptospiroze. 30-godišnje istraživanje i izučavanje u SR Hrvatskoj. JUMENA, JAZU, Zagreb, 1982.
- [34] Zaharija I, Modrić Z, Gregurić J. Istraživanja leptospiroze životinja u Hrvatskoj. XII. Kliconoštvo leptospira u klinički zdravih svinja. *Vet arhiv* 1975; 45: 13–16.
- [35] Modrić Z, Karlović M. Leptospirosis in hare (*Lepus europaeus Pall.*) in Croatia. *Vet arhiv* 1977; 47: 251–256.
- [36] Modrić Z, Herceg M, Ramadan P, Potočić M. Leptospiroza u kooperativnom tovu teladi u okolici Zagreba. *Vet arhiv* 1979; 49: 291–298.
- [37] Modrić Z, Herceg M, Župančić Ž, Bambir S, Hahn V, Ramadan P. Leptospiroza pasa u Zagrebu i okolici uzrokovana serološkim tipom icterohaemorrhagiae. *Vet arhiv* 1985; 55: 93–102.
- [38] Postic D, Riquelme-Sertour N, Merien F, Pérolat P, Baranton G. Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: application to *L. meyeri*. *Res Microbiol* 2000; 151: 333–341.
- [39] Modrić Z. Leptospirosis in the cat (*Felis domestica*) in Baranja, Summaries XXI World veterinary congress, Moscow. 1979; 4: 50–51.
- [40] Modrić Z, Bambir S, Sabočanec R. Leptospirosis in domestic cat (*Felis domestica* Briss.) in Baranja. *Vet arhiv* 1981; 51: 167–173.
- [41] Esseveld H, Collier WA. Leptospirose bei Katzen auf Java. *Z Immun Forsch* 1938; 93: 512–528.
- [42] Carlos ER, Kunding WD, Watten RH, Tsai CC, Irving GS, Carlos ET, Directo AC. Leptospirosis in the Philippines. *Am J Vet Res* 1971; 32: 1455–1456.
- [43] Bryson DG, Ellis WA. Leptospirosis in a British domestic cat. *JSAP* 1976; 17: 459–465.
- [44] Modrić Z. Prirodna i eksperimentalna leptospiroza u mačke, Doktorska disertacija, Zagreb, 1976. Izvadak disertacije. *Vet arhiv* 1978; 48: 147–156.
- [45] Zaharija I, Živković R. Leptospiroza na području Opće bolnice u Pakracu (Hrvatska) godine 1952. i 1953. *Higijena* 1956; 8: 56.
- [46] Smolić V, Špiranec N. Epidemiološka i klinička zapažanja kod leptospiroza na Odjelu za zarazne bolesti u Varaždinu 1965.–1979. god. 1982 (Citirano iz Zaharija I, Fališevac J, Borčić B, Modrić Z. Leptospiroze, 30-godišnje istraživanje i izučavanje u SR Hrvatskoj. JUMENA, 1982; 92–94.
- [47] Manev C. Serological characteristics of the *Leptospira* serogroup *Pomona*, I. Factor analysis of the reference strains. *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig A* 1976; 236: 316–322.
- [48] Modrić Z, Herceg M, Ramadan P, Potočić M. Leptospiroza u kooperativnom tovu teladi u okolici Zagreba. *Vet arhiv* 1979; 49: 291–298.
- [49] Modrić Z, Herceg M, Župančić Ž, Bambir S, Hahn V, Ramadan P. Leptospiroza pasa u Zagrebu i okolici uzrokovana serološkim tipom icterohaemorrhagiae. *Vet arhiv* 1985; 55: 93–102.
- [50] Modrić Z, Čuljak K, Hahn V. Leptospiroza u psa uzrokovana s *Leptospira interrogans* serološkom varijantom pomona. *Vet glasnik* 1987; 41: 43–47.

L. interrogans sensu stricto od *L. kirschneri* to je moguće analizom odsječaka nakon restrikcije s endonukleazom *DdeI* (slika 3). Naime, u slučaju izolata LG-36 izdvojenog iz poljske voluharice konačno identificiranog kao serovar *Grippotyphosa*, nakon restrikcije s endonukleazom *MnII* nije bilo razlučivo kojoj genomskoj vrsti pripada, jer je od prije poznato da se serovar *Grippotyphosa* može naći i u genomске vrste *L. interrogans* sensu stricto i u genomске vrste *L. kirschneri* [8]. Restrikcijom s endonukleazom *DdeI* potvrdili smo da svih 13 pretraživanih izolata leptospira pripada genomskoj vrsti *L. interrogans* sensu stricto.

Od 1990. god. poznato je da su rezultati dobiveni gel elektroforezom u pulsirajućem polju obično u suglasju s rezultatima dobivenim serološkom tipizacijom [19, 23, 24, 26, 27, 28].

Primjenom gel elektroforeze u pulsirajućem polju nakon makrorestrikcije genomске DNK s restrikcijskim enzimom *NotI* ustanovljena je heterogenost serovara unutar genomске vrste *L. meyeri* [26] i identificirana i analizirana skupina izolata serološke skupine *Pomona* [27].

Restrikcijski enzimi *NotI* i *SgrAI* poznati su kao endonukleaze s malim brojem mjesta cijepanja DNK (tzv. »rare cutting«) i najčešće su primjenjivani u identifikaciji serovara leptospira. Ta metoda ima mnoštvo prednosti u smislu objektivnosti, brzine izvođenja, lako dostupnih komercijalnih reagensa, mogućnosti interpretacije i objektivne analize rezultata. No, unatoč svim prednostima njezina je primjena još daleko od rutinske.

Razlike restrikcijskih profila čitavoga genoma omogućuju pouzdanu identifikaciju svakog pretraživanog izolata leptospira u usporedbi s pojedinim referentnim sojem određene serološke skupine unutar neke genomске vrste. Analizom odsječaka genoma dobivenih cijepanjem DNK s endonukleazama možemo ustanoviti bliskost odnosno genetsku raznolikost među pretraživanim sojevima leptospira. Što su leptospire genetski različitije, to su im i profili restrikcijskih odsječaka različitiji i obratno.

Budući smo od 13 izolata leptospira na osnovi analize razlika u restrikcijskim profilima ustanovili osam različitih serovara, smatramo kako u Republici Hrvatskoj, osobito u nizinama rijeka Save i Drave postoji velika genetska raznolikost leptospira unutar jedne genomске vrste, *Leptospira interrogans* sensu stricto.

U slučaju da se radi o više različitih genomskih vrsti, što u ovom istraživanju nije bio slučaj, spomenute dvije metode mogu se dopuniti analizom sekvenci gena za 16S rDNK i njihovim filogenetskim pozicioniranjem.

Istraživanje molekularne epidemiologije i epizootiologije leptospiroze je tek u začetku i potrebno je provesti daljnja istraživanja uzročnika i njegove genetske raznolikosti koja će dopuniti i proširiti spoznaje o odnosu rezervoara i domaćina u epidemio-epizootiološkom lancu leptospiroze.

Literatura

- [1] Zaharija I, Fališevac J, Borčić B, Modrić Z. Leptospiroze: 30-godišnje istraživanje i izučavanje u SR Hrvatskoj. Zagreb: JUMENA, 1982.
- [2] Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev 2001;14: 296–326.
- [3] Kmety E, Dikken H. Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. Groningen: University Press, 1993.
- [4] Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F, Brenner DJ. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. Int J Syst Bacteriol 1987; 37: 407–415.
- [5] Ramadass P, Jarvis BDW, Corner CJ, Penny D, Marshall RB. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. Int J Syst Bacteriol 1992; 42: 215–219.
- [6] Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomspecies. Int J Syst Bacteriol 1999; 49: 839–858.
- [7] Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Steigerwalt AG. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. Int J Syst Evol Microbiol 2006; 56: 671–673.
- [8] Babić I. Typhus canum u Zagrebu (Typhus canum in Zagreb). Jug vet glas 1927; 7: 21.
- [9] Antunovic-Mikacic S. O prvom slučaju Weilove bolesti na našem Primorju. (The first case of Weil's disease on our coastal region). Liječ vjesn 1935; 57: 377.
- [10] Faine S, Adler B, Bolin C, Pérolat P. *Leptospira* and Leptospirosis, Second Edition, MediSci, Melbourne, Australia, 1999.
- [11] Modrić Z, Astaloš D, Perić J, Astaloš F. Leptospiroza kao uzrok rane embrionalne smrtnosti u svinja. Vet stanica 2001; 32: 195–204.
- [12] Modrić Z, Turk N, Artuković B, Matanović K, Starešina V, Baranton G. Leptospiroza prasadi uzrokovana s *Leptospira interrogans* sensu stricto serovar *Icterohaemorrhagiae*. Hrvat vet vjesn 2006; 29: 223–230.
- [13] Borčić B, Kovačić H, Šebek Z, Aleraj B, Tvrtković N. Small terrestrial mammals as reservoir of leptospires in the Sava Valley (Croatia). Folia Parasitol 1982; 29: 177–182.
- [14] Borčić B, Kovačić H, Šebek Z, Aleraj B, Tvrtković N. Small terrestrial mammals as reservoirs of leptospires in the Drava Valley. Vet arhiv 1983; 53: 41–49.
- [15] Golubić D, Vurušić B, Krčmar N, Markotić A. Acute renal failure in leptospiral infection in north-western Croatia. Neurol Croat 1997; 46 (suppl 1): 83–86.
- [16] Markotić A, Kuzman I, Babić K, Gagro A, Nichol S, Ksiazek TG, Rabatić S, Dekaris D. Double Trouble: Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome and Leptospirosis. Scand J Infect Dis 2001; 34: 221–224.
- [17] Martin L, Pettit A. Sérodiagnostic de la leptospirose ictérohémo-rhagique. Bull Mém Soc Méd Hop (Paris) 1918; 42: 672–675.
- [18] Dikken H, Kmety E. Serological typing methods of leptospires. In: Methods in Microbiology. (Bergan T. and Norris J. R eds. Vol. 11). New York: Academic Press, 1978; 259–307.
- [19] Turk N, Milas Z, Margaletic J, Staresina V, Slavica A, Riquelme-Sertour N, Bellenger E, Baranton G, Postić D. Molecular charac-

Na osnovi dosad poznatih činjenica, uključujući i rezultate ovog istraživanja, ostaje otvoreno pitanje uloge mačke u epidemiologiji i epizootologiji leptospiroze te je potrebno učiniti daljnja istraživanja leptospiroze u mačaka, poglavito u geopizootiološkim područjima pogodnim za održanje leptospira.

Izolat leptospire iz krmače D-67, koji je izdvojen s područja Baranje, odakle su i tri izolata iz mačaka (jedan *Bataviae*, dva *Pomona*) također je determiniran kao serovar *Bataviae*. To je prvi put da je u svinja ustanovljena leptospira serovara *Bataviae* kao mogući uzročnik leptospiroze, iako je dosad bilo nekih podataka o nalazu serumskih protutijela za serovar *Bataviae* u svinja s područja Republike Hrvatske (prema usmenom priopćenju, Modrić Z.). Osim izolata leptospire D-67 izdvojenog iz krmače, na području Baranje izdvojen je i izolat iz klinički zdrave svinje (tovljenika) C-502, u ovom istraživanju serološki i genetski determiniran kao serološka skupina *Pomona*, serovar *Pomona* što odgovara prijašnjoj serološkoj determinaciji.

U skupini izolata leptospira serološki determiniranih kao serološka skupina *Pomona* (VARDARAC M-5, N-BOLMAN, R-25/75, TELE II i C-502) R-25/75, izolat izdvojen iz zeca genomski se razlikuje od ostalih izolata te skupine. Ima jedan odsječak veličine oko 200 kb koji ne dolazi u ostalih izolata te skupine i zato rezultira i neznatno drugačijim restriktivnim profilom dobivenim elektroforezom u pulsirajućem polju. Usporedbom s referentnim serovarima utvrdili smo da za razliku od ostalih izolata koji odgovaraju serovaru *Pomona*, izolat R-25/75 pripada serovaru *Pomona* Kennewicki (bivši Kennewicki) (slika 4). Iako je genetska raznolikost između serovara *Pomona* i *Pomona* Kennewicki gotovo neznatna, ta se dva serovara razlikuju i serološki [47]. Slična genetska raznolikost među izolatima serološke skupine *Pomona* ustanovljena je i drugdje [27]. U Republici Hrvatskoj su dosad unutar serološke skupine *Pomona* ustanovljeni serovari *Pomona*, *Pomona* Kennewicki, *Tsaratsovo* [19] i *Mozdok* (Zaharija I., neobjavljeno) što dokazuje izuzetnu genetsku raznolikost leptospira te serološke skupine.

Izolat TELE II izdvojen iz bubrega teleta koje je bolovalo od leptospiroze u okolici Zagreba ustanovljen je kao serovar *Pomona*. Taj nalaz je u suglasju sa serološkom tipizacijom učinjenom prije [48], ali i s dosad ustanovljenom spoznajom da u goveda u Republici Hrvatskoj serovar *Pomona* uglavnom dominira kao uzročnik leptospiroze u goveda [1].

Od triju izolata izdvojenih iz krvi bolesnih pasa na zagrebačkom području ustanovili smo u dva serološku skupinu *Icterohaemorrhagiae*, ŠVRČO 62/96 – serovar Copenhageni i 58/96 – serovar *Icterohaemorrhagiae*, a jedan izolat je bio serološke skupine *Canicola*, PAS-493 – serovar *Canicola*. Dok izolati ŠVRČO 62/96 i 58/96 dosad nisu bili serološki tipizirani, izolat PAS-493 prije je determiniran kao serovar *Canicola* što smo i potvrdili u ovom istraživanju. Od prvog otkrića leptospiroze pasa u Repu-

blici Hrvatskoj [8] i izdvajanja prvih sojeva leptospira iz pasa, serovara *Canicola* [32], prošlo je mnogo godina. Od 1973. do 1982. u pasa je ustanovljeno 30 nalaza leptospiroze uzrokovane serovarem *Icterohaemorrhagiae* [49], a bio je i jedan nalaz leptospiroze psa uzrokovan serovarem *Pomona* [50]. Identifikacija izolata ŠVRČO 62/96 dokazuje prvi put u Republici Hrvatskoj slučaj leptospiroze pasa uzrokovan leptospirama serovara Copenhageni.

Izolate leptospira izdvojene iz bubrega sitnih glodavaca na području Podravine determinirali smo kao serovar *Canicola* (HB-38) i serovar *Grippytyphosa* (LG-36). Dok je u slučaju izolata LG-36 nalaz serovara *Grippytyphosa* u ovom istraživanju identičan rezultatu serološke tipizacije učinjenom prije [1], izolat HB-38 determinirali smo kao serovar *Canicola*, prije determiniran kao serovar *Icterohaemorrhagiae*. Zanimljivo je istaknuti da serološkom tipizacijom serološke skupine izolata HB-38 nismo uspjeli ustanoviti serološku skupinu, jer je konačni titar protutijela s hiperimunim serumima za serološku skupinu *Canicola* i *Icterohaemorrhagiae* bio identičan i iznosio je 1:3200. Pripadnost izolata HB-38 serološkoj skupini *Canicola* razriješana je tek genetskom tipizacijom (slika 4, tablica 2.).

Dosad je bilo poznato da u širokom području Podravine [1, 14] i Posavine [13, 19] u sitnih glodavaca uglavnom dominiraju serovari *Sejroe*, *Grippytyphosa* i *Pomona*, premda se u manjem broju pojavljuju i drugi serovari leptospira kao *Istrica*, *Lora*, *Tsaratsovo*, *Jalna*, *Bratislava* i *Saxkoebing* [13, 14, 19].

Izolat HB-38 prva je leptospira izdvojena iz sitnih glodavaca u Republici Hrvatskoj određena kao serovar *Canicola* i to je nova spoznaja o kliconoštvu leptospira u sitnih glodavaca u nas. Identifikacija izolata LG-36 kao serovar *Grippytyphosa* potvrđuje dosadašnju spoznaju o vezi poljske voluharice (*Microtus arvalis*) i serovara *Grippytyphosa* [13, 14].

Da bi se proširile spoznaje o međusobnom odnosu sitnih glodavaca, ljudi i životinja u – epizoo-epidemiološkom lancu leptospiroza, smatramo da je u Republici Hrvatskoj i dalje potrebno istraživati ulogu sitnih glodavaca kao rezervoara leptospira, osobito na razini molekularne epizootologije.

Merien i sur. [31] su prvi put, a nešto poslije i Postić i sur. [26], uputili na značaj početnih 330 bp (pozicija 46-375 kod *Echerichia coli*) 16S rDNK gena leptospira kao osnove za usporedbu različitih izolata leptospira. Naime, ustanovljeno je da je 16S rDNK gen u leptospira izuzetno konzerviran, a da je više od 50 % raznovolikih pozicija čitavoga gena 16S smješteno u početnih 330 bp [26].

U ovom istraživanju potvrdili smo da analiza odsječaka dobivenih restriktivnom s *MnII* omogućuje identifikaciju genomske vrste *L. interrogans* sensu stricto u koju pripada većina patogenih sojeva u Republici Hrvatskoj (slika 2), a u slučajevima kada je potrebno razlikovati genomske vrste

Tablica 2. Zbirni prikaz rezultata identifikacije pretraživanih izolata leptospira dobivenih serološkom (MAT) i genetskom tipizacijom (RFLP i PFGE).**Table 2.** Results of serologic (MAT) and genetic identification of isolates (RFLP and PFGE).

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

specifičnost koja može biti posljedica heterospecifičnosti referentnih hiperimunih seruma [38], a i prvotna serološka analiza rađena je s tada dostupnim, manjim brojem hiperimunih seruma.

Rezultati dobiveni elektroforezom u pulsirajućem polju (ustanovljeni serovari) u potpunosti su (100 %) u suglasju s rezultatima dobivenim serološkom determinacijom seroloških skupina s 23 hiperimuna seruma, tj. ustanovljeni serovari odgovaraju pojedinoj serološkoj skupini leptospira. To uvijek ne mora biti tako. Od 228 izolata leptospira izdvojenih na području Portugala i Azorskih otoka 149 ih je tipizirano serološkom metodom monoklonskih protutijela, a 71 gel elektroforezom u pulsirajućem polju, 45 metodom MRSP i 32 izolata metodom AP-PCR te je utvrđena podudarnost rezultata dobivenih serološkom tipizacijom s monoklonskim protutijelima i genetskom metodom PFGE od 64 % [25].

Leptospire izdvojene iz bubrega mačaka; ČEMINAC M-1 (serovar *Bataviae*), VARDARAC M-5 (serovar *Pomona*), N-BOLMAN M-5 (serovar *Pomona*) i M-1303 (serovar *Lora*) zaslužuju poseban osvrt, jer čine najveću zbirku izolata iz mačaka dosad objavljenu u Europi. U mačaka inficiranim leptospirama opisani su blagi klinički simptomi [39, 40] a dosad je izdvojen malen broj izolata leptospira iz bubrega mačaka [39, 40, 41, 42, 43, 44], pa su i spoznaje o njima oskudne. Molekularna identifikacija leptospira izdvojenih iz bubrega mačaka nije dosad učinjena.

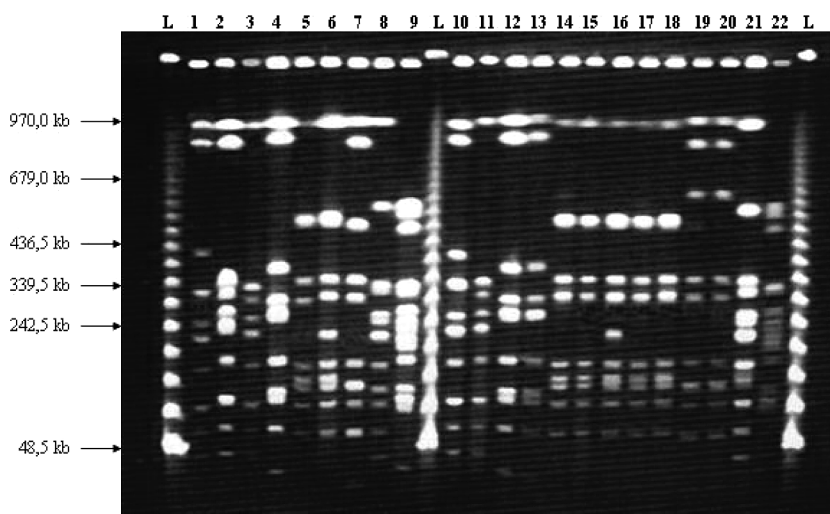
Prema dosad objavljenim podacima mačka se ne smatra životinjom koja ima osobit značaj u epidemio-epizooti-

ološkom lancu leptospira, zbog svoje evolucijske adaptacije na leptospire koja je posljedica načina hranidbe (uglavnom sitni glodavci, glavni rezervoari leptospira). Dosad je u prirodno inficiranih mačaka ustanovljeno kliconoštvo leptospira do 64 dana [40], a u eksperimentalno inficirane mačke sa serovarom *Pomona* do 80 dana [44]. Ostaje otvoreno pitanje mogu li u slučajevima nekih kroničnih infekcija, kao što su infekcije virusom leukemije mačaka (FeLV) te virusom imunodeficijencije mačaka (FIV), ili pak u slučajevima kroničnih bolesti bubrega druge etiologije, mačke ostati kliconoše leptospira duže vrijeme.

Od četiri izolata leptospira identificiranih molekularnim metodama ustanovljeno je tri različita serovara što upućuje na određenu heterogenost leptospira u populaciji mačaka.

Na području Baranje u Republici Hrvatskoj, serovar *Bataviae* dosad je u životinja izdvojen iz mačke [40] i gotovo zanemariv je podatak o vrlo maloj seroprevalenciji u poljskih miševa (*Apodemus agrarius*) [13], a važno je spomenuti da je na području Varaždina, Pakraca i Sessvetskog Kraljevca dosad ustanovljena leptospiroza u ljudi uzrokovana serovarom *Bataviae* [45, 46], a izdvojena su i dva izolata iz krvi čovjeka; prvi u Pakracu [45], drugi izolat 1974. god. na području Sessvetskog Kraljevca [neobjavljeno].

Osim serovara *Bataviae*, ustanovljen je i serovar *Pomona* (dva izolata), dosad u Republici Hrvatskoj ustanovljen u različitim domaćih i divljih životinja i ljudi [1, 40] i *Lora* (jedan izolat) dosad ustanovljen samo u žutogrlog miša (*Apodemus flavicollis*) [19].



Slika 4. Gel elektroforeza u 1%-tnom agaroznom gelu restrikcijskih odsječaka genomske DNK istraživanih sojeva leptospira te kontrolnih genotipova nakon restrikcije s restrikcijskim enzimom *NotI*. Kolone 1–9 su kontrolni serovari (genomovari), 1 – serovar Copenhageni M20, 2 – serovar Copenhageni Wijnberg, 3 – serovar *Icterohaemorrhagiae* RGA, 4 – serovar *Bataviae* Swart, 5 – serovar Pomona Pomona, 6 – serovar Pomona Kennewicki LT1026, 7 – serovar *Canicola* Hond Utrecht GP, 8 – serovar Lora Lora, 9 – serovar *Grippothyphosa* Moskva V. Kolone 10–22, 10 – ŠVRČO 62/96, 11 – 58/96, 12 – ČEMINAC M-1, 13 – D-67, 14 – VARDARAC M-5, 15 – N-BOLMAN M-5, 16 – R-25/75, 17 – TELE II, 18 – C-502, 19 – PAS-493, 20 – HB-38, 21 – M-1303, 22 – LG-36. L – standard poznate molekularne mase – Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs, UK).

Figure 4. Pulse field gel electrophoresis of *NotI* restriction fragments of investigated leptospiral isolates and positive controls. Lanes 1–9 control serovars, 1 – serovar Copenhageni M20, 2 – serovar Copenhageni Wijnberg, 3 – serovar *Icterohaemorrhagiae* RGA, 4 – serovar *Bataviae* Swart, 5 – serovar Pomona Pomona, 6 – serovar Pomona Kennewicki LT1026, 7 – serovar *Canicola* Hond Utrecht GP, 8 – serovar Lora Lora, 9 – serovar *Grippothyphosa* Moskva V. Lanes 10–22, 10 – ŠVRČO 62/96, 11 – 58/96, 12 – ČEMINAC M-1, 13 – D-67, 14 – VARDARAC M-5, 15 – N-BOLMAN M-5, 16 – R-25/75, 17 – TELE II, 18 – C-502, 19 – PAS-493, 20 – HB-38, 21 – M-1303, 22 – LG-36. L – Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs, UK).

62/96 ima sličan restrikcijski profil s referentnim serovarom Copenhageni (soj M20), izolat 58/96 ima sličan profil sa serovarom *Icterohaemorrhagiae* (soj RGA), izolati ČEMINAC M-1 i D-67 slični su serovaru *Bataviae* (soj Swart), izolati VARDARAC M-5, N-BOLMAN M-5, TELE II i C-502 imaju sličan profil sa serovarom Pomona (soj Pomona), izolat R-25/75 ima sličan restrikcijski profil sa serovarom Pomona Kennewicki (soj LT1026), izolati PAS-493 i HB-38 imaju sličan profil sa serovarom *Canicola* (soj Hond Utrecht GP), izolat M-1303 ima sličan profil sa serovarom Lora (soj Lora) i izolat LG-36 ima sličan restrikcijski profil sa serovarom *Grippothyphosa* (soj Moskva V) (slika 4).

Restrikcijski profili dobiveni restrikcijom s restrikcijskim enzimom *SgrAI* nalazili su se u granicama molekularne mase > 40–550 kb. *SgrAI* restrikcijski enzim rezultira puno većim brojem odsječaka ne toliko jasno odijeljenih zbog malih razlika u molekularnoj masi, što otežava usporedbu restrikcijskih profila. Zbirni prikaz rezultata dobivenih serološkom tipizacijom i genetskom tipizacijom istraživanih sojeva leptospira prikazujemo u tablici 2.

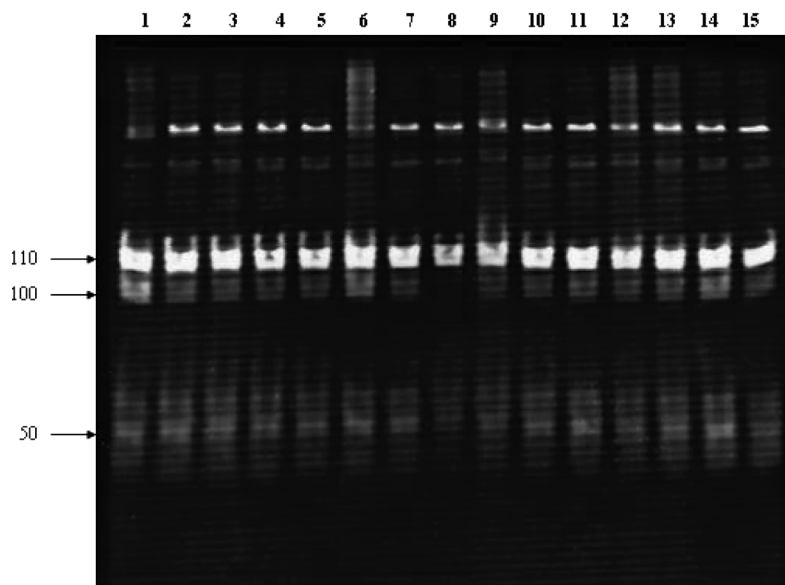
Diskusija

Svih 13 izolata leptospira korištenih u ovom istraživanju potječe iz područja uz rijeku Savu i Dravu od prije poz-

natih kao prirodna žarišta leptospiroze, gdje su u stvaranju tih žarišta vrlo važnu ulogu odigrali specifični klimatski, edafski i hidrološki čimbenici pogodni za održanje leptospira.

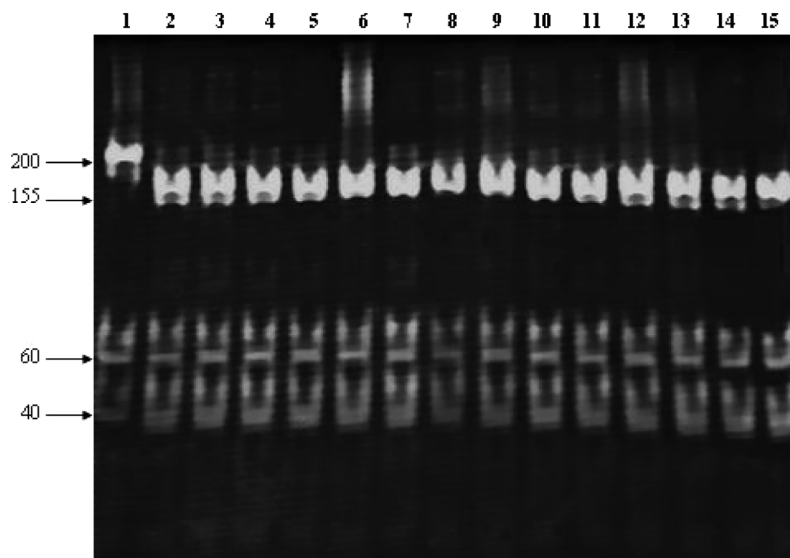
Ovim istraživanjem u potpunosti je učinjena serološka tipizacija s 23 referentna hiperimuna seruma i izolati leptospira svrstani su u pojedine serološke skupine, a molekularnim metodama; lanačane reakcije polimerazom sa specifičnim početnicama za leptospire i amplifikacijom početnih 330 bp 16S rDNK gena te gel elektroforeze u pulsirajućem polju identificirane su leptospire te je ustanovljena pripadnost određenom serovaru.

U slučaju izolata leptospira koji su već bili djelomice ili potpuno serološki identificirani, dobiveni rezultati uglavnom su bili u suglasju s rezultatima serološke tipizacije učinjene prije [32, 33, 34, 35, 36, 37] osim u slučaju izolata M-1303 (mačka) prije određen kao serološka skupina *Australis*, serovar Jalna (sada određen kao serološka skupina *Australis*, serovar Lora), D-67 (krmača) prije određenog kao serološka skupina *Tarassovi*, serovar Tarassovi (sada određen kao serološka skupina *Bataviae*, serovar *Bataviae*) te izolata HB-38 (kućni miš) prije određenog kao serološka skupina *Icterohaemorrhagiae*, serovar *Icterohaemorrhagiae* (sada određen kao serološka skupina *Canicola*, serovar *Canicola*). Mogući razlog takve razlike u rezultatima serološke tipizacije je njezina nedovoljna



Slika 2. Gel elektroforeza na 12%-tnom akrilamidnom gelu odsječaka početnih 330 bp rDNK za gen 16S izolata leptospira nakon restrikcije s *MnII*. Kolone 1–15, 1 – pozitivna kontrola *L. kirschneri*, 2 – pozitivna kontrola *L. interrogans* sensu stricto, 3 – ŠVRČO 62/96, 4 – 58/96, 5 – ČEMINAC M-1, 6 – D-67, 7 – VARDARAC M-5, 8 – N-BOLMAN M-5, 9 – R-25/75, 10 – TELE II, 11 – C-502, 12 – PAS-493, 13 – HB-38, 14 – M-1303, 15 – LG-36.

Figure 2. Gel electrophoresis on 12 % polyacrylamide gel after restriction of PCR amplified first 330 bp leptospira 16S rDNA by *MnII*. Lanes 1–15, 1 – positive control *L. kirschneri*, 2 – positive control *L. interrogans* sensu stricto, 3 – ŠVRČO 62/96, 4 – 58/96, 5 – ČEMINAC M-1, 6 – D-67, 7 – VARDARAC M-5, 8 – N-BOLMAN M-5, 9 – R-25/75, 10 – TELE II, 11 – C-502, 12 – PAS-493, 13 – HB-38, 14 – M-1303, 15 – LG-36.



Slika 3. Gel elektroforeza na 12%-tnom akrilamidnom gelu odsječaka početnih 330 bp rDNK za gen 16S sojeva leptospira nakon restrikcije s *DdeI*. Kolone 1–15, 1 – pozitivna kontrola *L. kirschneri*, 2 – pozitivna kontrola *L. interrogans* sensu stricto, 3 – ŠVRČO 62/96, 4 – 58/96, 5 – ČEMINAC M-1, 6 – D-67, 7 – VARDARAC M-5, 8 – N-BOLMAN M-5, 9 – R-25/75, 10 – TELE II, 11 – C-502, 12 – PAS-493, 13 – HB-38, 14 – M-1303, 15 – LG-36. Vrpce manje od 40 bp su zbog lošije kvalitete gela teže uočljive.

Figure 3. Electrophoresis on 12 % polyacrylamide gel after restriction of PCR amplified first 330 bp leptospira 16S rDNA by *DdeI*. Lanes 1–15, 1 – positive control *L. kirschneri*, 2 – positive control *L. interrogans* sensu stricto, 3 – ŠVRČO 62/96, 4 – 58/96, 5 – ČEMINAC M-1, 6 – D-67, 7 – VARDARAC M-5, 8 – N-BOLMAN M-5, 9 – R-25/75, 10 – TELE II, 11 – C-502, 12 – PAS-493, 13 – HB-38, 14 – M-1303, 15 – LG-36. Bands smaller than 40 bp are not visible due to low gel quality.

Tablica 1. Restriksijski odsječci dobiveni mikrorestrikcijom početnih 330 bp 16S rDNK gena genomskih vrsti *L. interrogans* sensu stricto i *L. kirschneri* s restriksijskim enzimima *MnII* i *DdeI*. Brojevi u tablici predstavljaju parove baza (bp).

Table 1. Restriction fragments gained by microrestriction of first 330 bp 16S rDNA of the genomic species *L. interrogans* sensu stricto and *L. kirschneri* with endonucleases *MnII* and *DdeI*. Numbers in table represent number of base pairs (bp).

Genomska vrsta / Genomic species	<i>MnII</i>	<i>DdeI</i>
<i>L. interrogans</i> sensu stricto	110, 100, 50, 50	155, 60, 40, 34, 27
<i>L. kirschneri</i>	110, 100, 50, 50	200, 60, 40, 20

Razlika u molekularnim masama dobivenih DNK odsječaka vidljiva je i iz tablice 1.

Ekstrakcija DNK, enzimska restrikcija s restriksijskim enzimima NotI i SgrAI i identifikacija serovara primjenom gel elektroforeze u pulsirajućem polju

Ekstrakciju DNK načinili smo prema standardnom protokolu [31], a agarozne DNK blokove smo do uporabe pohranili u 0,5 M EDTA pri 4 °C. DNK plakove podvrgnuli smo restrikciji s restriksijskim enzimima *NotI* i *SgrAI* prema uputi proizvođača, a zatim smo dio bloka (1–2 mm) uklopili u 1% agarozni gel. PFGE migraciju izveli smo u aparatu DRII (Bio–Rad Laboratories, Richmond, CAL, USA). Razdvajanje DNK odsječaka postigli smo primjenom ritma električnog pulsa: od 5 do 70 s kroz 24 h i 200 V te pri temp. od 14 °C. Veličinu DNK vrpce na gelu odredili smo usporedbom s molekularnim markerom – Concatemered λ bacteriophage genome, size range 50–1000 kb (Lambda Ladder PFG Marker, Biolabs, Beverly, MA, USA). Gelove smo fotografirali pod UV iluminacijom nakon bojenja s etidijevim bromidom. Dobivene vrpce na gelu analizirali smo vizualno. Izolate i referentne sojeve s identičnim restriksijskim profilom dobivenih s dvaju različitih restriksijskih enzima smatrali smo istim serovarom leptospira. Kao dopunu i potvrdu rezultata dobivenih s *NotI*, a osobito za izolat M-1303 serovar Lora, proveli smo i makrorestrikciju s restriksijskim enzimom *SgrAI*. Naime, poznato je da se samo na temelju restrikcije s *NotI* ne mogu sa sigurnošću razlučiti profili serovara serološke skupine *Australis* [23, 24].

Rezultati

Identifikacija serološke skupine metodom mikroskopske aglutinacije

Mikroskopskom aglutinacijom s 23 hiperimuna seruma seroloških skupina ustanovili smo da pet sojeva pripa-

da serološkoj skupini *Pomona*, po dva soja serološkoj skupini *Bataviae*, *Canicola* i *Icterohaemorrhagiae* i po jedan soj serološkoj skupini *Australis* i *Grippotyphosa*. Najniži konačni titar protutijela bio je 1:3200, i to kod četiri izolata seroloških skupina *Bataviae*, *Canicola*, *Icterohaemorrhagiae* i *Pomona*. Najveći konačni titar protutijela 1:12800 dobiven je kod dva izolata seroloških skupina *Bataviae* i *Icterohaemorrhagiae*, a u većine istraživanih izolata (sedam) ustanovljen je konačni titar protutijela 1:6400, i to za serološke skupine *Australis*, *Canicola*, *Grippotyphosa*, *Icterohaemorrhagiae* i *Pomona*.

Umnažanje početnih 330 bp gena 16S rDNK metodom lančane reakcije polimerazom

Lančanom reakcijom polimerazom sa specifičnim početnicama za leptospirin 16S rDNK gen, LEPTO A i LEPTO B, umnožili smo početnih 330 bp 16S rDNK iz svakog od ispitivanih sojeva i na osnovi prisutnosti vrpce na gelu te usporedbom s pozitivnom kontrolom potvrdili da se radi o DNK leptospira.

Raznolikost dužine restriksijskih fragmenata dobivenih mikrorestrikcijom s restriksijskim enzimima MnII i DdeI

Svi istraživani sojevi (slika 2, kolone 3–15) pokazuju isti restriksijski profil, a također i referentni kontrolni sojevi *L. kirschneri* i *L. interrogans* sensu stricto (slika 2, kolone 1 i 2). Vidljivo je da se u restriksijskim profilima dobivenih restrikcijom s *MnII* ne uočava razlika između genomskih vrsti *L. kirschneri* (slika 2, kolona 1) i *L. interrogans* sensu stricto (slika 2, kolona 2).

Na osnovi ustanovljenih seroloških skupina i *MnII* restriksijskih profila jasno je da 12 istraživanih sojeva (slika 2, kolone 3–14) pripada genomskoj vrsti *L. interrogans* sensu stricto. Dvojben je bio jedino istraživani soj LG-36 (slika 2, kolona 15) određen kao serološka skupina *Grippotyphosa*. Naime, od prije je poznato da serovar *Grippotyphosa* serološke skupine *Grippotyphosa* može doći u dvjema genomskim vrstama, kao genomski vrsta *L. interrogans* sensu stricto i kao genomski vrsta *L. kirschneri* [6]. Mikrorestrikcijom s restriksijskim enzimom *DdeI* ustanovili smo razliku između tih dviju genomskih vrsta. Na slici 3 jasno se vidi različiti restriksijski profil genomske vrste *L. kirschneri* (kolona 1) i *L. interrogans* sensu stricto (kolona 2). Zaključno, rezultati dobiveni mikrorestriksijskom analizom pokazuju da svi istraživani sojevi leptospira pripadaju genomskoj vrsti *L. interrogans* sensu stricto.

Enzimska restrikcija s restriksijskim enzimima NotI i SgrAI i identifikacija serovara primjenom gel elektroforeze u pulsirajućem polju

Restriksijski profili dobiveni restrikcijom s restriksijskim enzimom *NotI* nalazili su se u granicama molekularne mase od približno > 40–970 kb (slika 4). Izolat ŠVRČO

strikcijskih fragmenata gena za 16S rDNK (PCR – RFLP) i serovar primjenom metode gel elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE).

Pretražili smo sljedeće izolate leptospira: četiri izdvojena iz bubrega mačaka, ČEMINAC M-1, VARDARAC M-5, N-BOLMAN M-5 i M-1303, tri iz krvi ili bubrega pasa, ŠVRČO 62/96, 58/96 i PAS-493, dva iz bubrega sitnih glodavaca, HB-38 iz bubrega kućnog miša (*Mus musculus*) i LG-36 iz bubrega poljske voluharice (*Microtus arvalis*), dva iz bubrega svinja D-67 i C-502 i po jedan iz bubrega teleta, TELE II i zeca (*Lepus europaeus*), R-25/75. Sojevi ČEMINAC M-1, VARDARAC M-5 i M-1303, te sojevi D-67 i C-502 izdvojeni su u Baranji, sojevi ŠVRČO 62/96, 58/96 i PAS-493 te soj N-BOLMAN M-5 izdvojeni su s područja grada Zagreba ili njegove okolice, soj TELE II izdvojen je u okolici Velike Gorice, sojevi HB-38 i LG-36 izdvojeni su u okolici Koprivnice, a soj R-25/75 je s područja Đurđenovca kod Osijeka (slika 1).



Slika 1. U karti Republike Hrvatske zvjezdicama su označena mjesta odakle su izdvojeni pojedini sojevi leptospira

Figure 1. Map of the Republic of Croatia with stars showing places where the strains of leptospira were isolated

Većina referentnih sojeva leptospira koji su korišteni u istraživanju su iz Collection of the WHO Collaboration Centre for Leptospira, Institut Pasteur, Paris, France. Ostali su iz zbirke pohranjenih u Koninklijk Instituut voor de Tropen (KIT), Amsterdam, The Netherlands, University of West Virginia, USA (UWV) i Center for Disease Control, Atlanta, USA (CDC). Svi istraživani sojevi uzgojeni su na 5 mL Korthofove tekuće hranidbene podloge [10] i EMJH tekuće hranidbene podloge [29, 30] pri 30 °C dok nije postignuta gustoća rasta (4+ ili oko 2×10^8 bakterija mL^{-1}) prikladna za mikroskopsku aglutinaciju s 23 hiperimuna seruma (serološke skupine) u svrhu određivanja serološke skupine [18]. Hiperimuni serumi koji su korište-

ni u istraživanju su iz Collection of the WHO Collaboration Centre for Leptospira, Institut Pasteur, Paris, France.

Mikroskopsku aglutinaciju izveli smo u mikrotitracijskoj ploči s ravnim dnom (Dynatech laboratories, Inc., USA) mješanjem po 50 μL bakterijske kulture i 50 μL serijskih razrjeđenja hiperimunih referentnih seruma u duplikatima. Hiperimune serume smo razrijedili s fiziološkom otopinom u razrjeđenja od 100 do 12 800. Nakon inkubacije od 2 h pri sobnoj temperaturi, očitali smo aglutinaciju pod mikroskopom s tamnim vidnim poljem (System Microscope, Olympus BX41). Smatrali smo da ispitujući soj leptospira pripada određenoj serološkoj skupini ako je aglutinacija s odgovarajućim hiperimunim serumom za tu serološku skupinu bila prisutna još u razrjeđenju 400 ili većem.

Priprema termolizata leptospira i umnažanje početnih 330 bp gena 16S rDNK metodom lančane reakcije polimerazom

Po 2 mL bakterijske kulture centrifugirali smo u Eppendorf epruветama pri 12000 okr./10 min. Talog smo resuspendirali s fosfatnim puferom (engl. *Phosphate Buffer Saline* – PBS) i nakon centrifugiranja i odvajanja nadtaloga ponovo ga resuspendirali sa 100 μL redestilirane vode i kuhali u termobloku pri 100 °C tijekom 10 min. Dobivene termolizate pohranili smo do uporabe u zamrzivaču pri –20 °C.

Početnih 330 bp rDNK gena 16S dobili smo inkubacijom po 5 μL termolizata s mješavinom reagensa i Taq-polimeraze (QBIOSCIENCE, Montreal, Canada) s početnicama LEPTOA (5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3') i LEPTOB (5'-TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3') (EUROGENTEC, Seraing, Belgija) [31] u aparatu PTC – 100 Programmable Thermal Controller Peltier-Effect Cycling (MJ RESEARCH, INC. Watertown, MA, USA) pri temperaturi hibridizacije 60 °C. Prisutnost amplifikacijskih proizvoda provjerili smo elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu.

Raznolikost dužine restrikijskih fragmenata dobivenih mikrorestrikcijom s restrikijskim enzimima MnlI i DdeI

Restrikijske enzime *MnlI* i *DdeI* odabrali smo kao najpogodnije prema literaturnim podacima objavljenim ranije [21, 22]. Po 10 μL mješavine restrikijskog enzima *MnlI* i pripadajućeg pufera i po 20 μL PCR-proizvoda inkubirali smo u vodenoj kupelji tijekom 2 h i 30 min. pri temp. od 37 °C. Isti postupak učinili smo i kod primjene restrikijskog enzima *DdeI*. Restrikijske proizvode provjerili smo vertikalnom elektroforezom na 12%-tnom akrilamidnom gelu, debljine 1,5 mm. Nakon bojenja s etidijevim bromidom snimili smo fotografije gela pod UV-iluminacijom. Dobivene vrpce na gelu vizualno smo analizirali usporedbom s kontrolama i odredili genomsku vrstu istraživanih izolata.

Uvod

Leptospiroza je akutna septikemijska zarazna bolest različitih vrsta domaćih i divljih životinja i čovjeka, koja se većinom javlja enzootski ili endemski, a iznimno i u obliku zatvorenih epizootija ili epidemija. U životinja se klinički očituje žuticom, ponekad hemoglobinurijom, a u goveda i svinje pobačajima [1]. U ljudi postoji široki spektar kliničke pojavnosti u razmjeru od subkliničkih infekcija, infekcije različitih organa do teških ikteričnih sindroma s prestankom funkcije bubrega i visokom smrtnošću [2].

Uzročnici bolesti su patogene bakterije unutar roda *Leptospira*. Leptospire su imunološki i genetski heterogeni mikrobi spiralna oblika koji do sada čine više od 250 serovara, organiziranih unutar 28 seroloških skupina [3] i nekoliko genomskih vrsta [4, 5, 6, 7].

Leptospiroza je u Hrvatskoj prvi put ustanovljena u životinja i to u psa 1926. god. [8], a zatim i u ljudi 1935. god. [9]. Izvori zaraze su različite vrste domaćih i divljih životinja bolesne od leptospiroze koje u okoliš izlučuju leptospire urinom (leptospirurija) tijekom bolesti, u rekonvalescenciji i još znatno vrijeme nakon ozdravljenja (kliconoštvo) [1]. Veliku ulogu u održavanju zaraze na nekom području imaju glodavci (štakori, miševi, voluharice) koji bez simptoma nose patogene leptospire, izlučuju ih urinom, čineći prirodna žarišta leptospiroze i osnovni su nositelji ili rezervoari leptospira. Za svaki serovar leptospira postoji osnovni životinjski rezervoar premda on ne mora posvuda po svijetu biti isti. Visoki stupanj međusobne adaptacije razvili su štakor (*Rattus norvegicus*) i serovar Icterohaemorrhagiae, poljska voluharica (*Microtus arvalis*) i serovar Grippotyphosa, poljski miš (*Apodemus agrarius*) i serovar Pomona, žutogrli miš (*Apodemus flavicollis*) i serovar Saxkoebing itd. [1].

Leptospiroza se na životinju i čovjeka prenosi izravnim ili neizravnim kontaktom s urinom zaražene životinje. Interhumani prijenos, je kao i kod većine zoonoza u pravilu rijedak. Ulazna vrata leptospira su preko oštećene kože (abrazije), ali i kroz neoštećene sluznice ili pak očne spojnice. Za epizootologiju i epidemiologiju su od velike važnosti dugo trajanje kliconoštva te mogućnost preživljavanja leptospira u vanjskoj sredini [10].

Leptospire i leptospiroza se u Hrvatskoj sustavno istražuju već više od pedeset godina i u humanoj i u veterinarskoj medicini što je rezultiralo brojnim publikacijama od koji je većina sažeta u monografiji: Leptospiroze, 30-godišnje istraživanje i izučavanje u SR Hrvatskoj [1]. Unatoč propisanim mjerama sprječavanja i iskorjenjivanja, bolest se i dalje pojavljuje u Hrvatskoj [11, 12] poglavito u dolinama rijeka Save i Drave [13, 14] i drugim geoepidemiološkim područjima pogodnim za održanje uzročnika [15, 16].

Da bi se u potpunosti spoznao epidemio-epizootiološki lanac leptospiroze na nekom području, potrebno je izdvo-

jiti i identificirati uzročnika. Razne serološko-tipizacijske i molekularne metode primjenjuju se radi identifikacije i analize leptospira. U proteklih godinama u Hrvatskoj, novo izdvojeni sojevi leptospira, bili su identificirani i klasificirani na temelju njihovih antigenih obilježja primjenom konvencionalnih serotipizacijskih metoda – mikroskopske aglutinacije (MAT) [17] i tzv. križnog aglutinacijskog testa zasićenja s kunićjim hiperimunim serumima (engl. *cross-agglutinin absorption test* – CAAT) [18]. Serotipizacijske metode temelje se na subjektivnoj procjeni i ponekad ih je teško interpretirati. Zato se, u novije vrijeme, serotipizacijske metode dopunjuju genetskim metodama koje su omogućile uvid u genetsku raznolikost izolata leptospira, a time su i evoluirala znanja iz taksonomije i filogenije. Dosad je u Hrvatskoj učinjeno početno istraživanje leptospira primjenom gel elektroforeze u pulsirajućem polju (engl. *Pulsed Field Gel Electrophoresis* – PFGE) i analize sekvenci gena za 16S rDNK te je identificirana i analizirana skupina izolata leptospira izdvojenih iz sitnih glodavaca [19].

Raznolikost dužine restrikcijskih fragmenata rDNK gena (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP) [20, 21, 22] primjenjuje se radi identifikacije genomske vrste leptospira ili za epidemiološko tipiziranje.

Gel elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE) velikih DNK odsječaka dobivenih restrikcijom DNK genoma uporabom različitih endonukleaza predstavlja objektivnu i brzu molekularnu metodu koja se primjenjuje u identifikaciji serovara leptospira [23, 24]. PFGE je posljednjih godina vrlo primjenjivana metoda u identifikaciji izolata na razini serovara unutar različitih seroloških skupina i genomskih vrsta leptospira [25, 26, 27, 28]. U ovom radu prikazujemo identificiranje i analizu 13 izolata leptospira izdvojenih iz različitih vrsta domaćih i divljih životinja u Republici Hrvatskoj koji se nalaze u zbirci Laboratorija za leptospire, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu primjenom molekularnih metoda; raznolikosti dužine restrikcijskih fragmenata gena za 16S rDNK (PCR – RFLP) i gel elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE).

Materijal i metode

Sojevi leptospira korišteni u istraživanju, njihov uzgoj i identifikacija serološke skupine

Ukupno 13 izolata bakterije roda *Leptospira* izdvojenih iz domaćih i divljih životinja iz raznih geografskih područja kontinentalnog dijela Republike Hrvatske, uglavnom u nizinama rijeke Save i Drave, koji se nalaze pohranjeni u zbirci Laboratorija za leptospire, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu identificirali smo najprije serološki primjenom mikroskopske aglutinacije do razine serološke skupine, a zatim smo molekularno ustanovili genomsku vrstu primjenom metode raznolikosti dužine re-

Identificiranje i tipiziranje *Leptospira spp.* primjenom metode raznolikosti dužine restrikcijskih fragmenata rDNK za gen 16S (RFLP) i gel elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE)

Nenad TURK¹⁾, doc. dr. sc., dr. vet. med.
Zoran MILAS¹⁾, prof. dr. sc., dr. vet. med.
Josipa HABUŠ¹⁾, dr. vet. med.
Zrinka ŠTRITOF¹⁾, dr. vet. med.
Vesna MOJČEC¹⁾, dipl. ing. mol. biol.
Zvonko MODRIĆ¹⁾, prof. dr. sc., dr. vet. med.
Vilim STAREŠINA¹⁾, doc. dr. sc., dr. vet. med.
Daniele POSTIC²⁾, dr. sc., dr. med.

- ¹⁾Laboratorij za leptospire, Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska
²⁾Laboratoire des spirochetes, Institut Pasteur, Paris, France

Ključne riječi

leptospiroza
leptospira
molekularno tipiziranje
RFLP
PFGE

Key words

leptospirosis
leptospira
molecular typing
RFLP
PFGE

Primljeno: 2008-05-05

Received: 2008-05-05

Prihvaćeno: 2008-09-15

Accepted: 2008-09-15

Znanstveni rad

Ukupno 13 izolata bakterije roda *Leptospira* izdvojenih iz domaćih i divljih životinja iz kontinentalnog dijela Republike Hrvatske identificirano je najprije serološki metodom mikroskopske aglutinacije (MAT), a zatim genetski uporabom molekularnih metoda; raznolikosti dužine restrikcijskih fragmenata rDNK za gen 16S (RFLP) te gel elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE). Mikroskopskom aglutinacijom s 23 hiperimuna seruma seroloških skupina ustanovljeno je da pet izolata pripada serološkoj skupini *Pomona*, po dva izolata serološkoj skupini *Bataviae*, *Canicola* i *Icterohaemorrhagiae* i po jedan serološkoj skupini *Australis* i *Grippotyphosa*. Umnažanjem početnih 330 bp rDNK za gen 16S analiziranih izolata leptospira i mikrorestrikcije umnoženih fragmenata DNK s restrikcijskim enzimima *MnI* i *DdeI* ustanovljeno je da svi izolati pripadaju genomske vrsti *L. interrogans* sensu stricto. Makrorestrikcijom čitave genomske DNK pretraživanih izolata leptospira s restrikcijskim enzimima *NotI* i *SgrAI* i gel elektroforezom u pulsirajućem polju ustanovljeno je osam različitih serovara: Copenhageni (1), *Icterohaemorrhagiae* (1), *Bataviae* (2), *Pomona* (4), *Pomona Kennewicki* (1), *Canicola* (2), *Lora* (1) i *Grippotyphosa* (1). Budući smo od 13 izolata leptospira na osnovi analize razlika u restrikcijskim profilima ustanovili osam različitih serovara, smatramo kako u Republici Hrvatskoj, osobito u nizinama Save i Drave postoji velika genetska raznolikost leptospira unutar jedne genomske vrste, *Leptospira interrogans* sensu stricto.

Identification and Typing of *Leptospira spp.* by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) of 16S Gene rDNA and Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)

Scientific paper

A total of 13 *Leptospira spp.* strains isolated from domestic and wild mammals in different regions of inland Croatia were identified and characterized serologically by microscopic agglutination (MAT) and by modern molecular biology methods; polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and pulsed field gel electrophoresis (PFGE). After the first typing according to serogroup affinities the isolates appeared to belong to serogroups *Pomona* (five isolates), *Bataviae* (two isolates), *Canicola* (two isolates), *Icterohaemorrhagiae* (two isolates), *Australis* (one isolate) and *Grippotyphosa* (one isolate). RFLP were examined in PCR products from first 330 bp long portion of *rrs* (16S rDNA gene) digested with endonucleases *MnI* and *DdeI* revealed that all strains belonged to *Leptospira interrogans* sensu stricto genomic species. Intact genomic DNA from 13 leptospiral isolates was digested with *NotI* and *SgrAI* restriction enzymes and analyzed by PFGE. The results showed eight different serovars: Copenhageni (1), *Icterohaemorrhagiae* (1), *Bataviae* (2), *Pomona* (4), *Pomona Kennewicki* (1), *Canicola* (2), *Lora* (1) and *Grippotyphosa* (1). By revealing the degree of relatedness among 13 leptospiral restriction fingerprints in Croatia we demonstrated the existence of great genetic diversity within one genomic species, *Leptospira interrogans* sensu stricto especially in the Sava and Drava river valleys.