

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Meta KODRE

**SEROTIPSKA IN GENOTIPSKA OPREDELITEV
LEPTOSPIR**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Meta KODRE

SEROTIPSKA IN GENOTIPSKA OPREDELITEV LEPTOSPIR

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**SEROTYPIC AND GENOTYPIC IDENTIFICATION OF
LEPTOSPIRA SPECIES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, in sicer v Laboratoriju za diagnostiko boreloz in leptospiroze.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je na seji, dne 23. junija 2008, odobrila temo diplomske naloge in za mentorico imenovala prof. dr. Eva Ružić-Sabljić, dr. med. ter za recenzentko prof. dr. Katjo Seme, dr. med.

Mentorica: prof. dr. Eva Ružić-Sabljić

Recenzentka: prof. dr. Katja Seme

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Eva Ružić-Sabljić, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za
mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Katja Seme, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za
mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Meta Kodre

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.834.083:616.936(043)=163.6
KG zootože/leptospiroza/leptospire/serotipizacija/imunski serumi/genotipizacija/PCR v realnem času
AV KODRE, Meta
SA RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva (mentorica)/SEME, Katja (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2009
IN SEROTIPSKA IN GENOTIPSKA OPREDELITEV LEPTOSPIR
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XII, 65 str., 10 pregl., 20 sl., 3 pril., 65 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Leptospire so vijačno zavite spirohete, ki imajo značilno kljukasto zakriviljene konce. Povzročajo bolezen imenovano leptospiroza, ki prizadene tako živali kot ljudi. Posamezne živalske vrste so običajno gostitelji za določene serovare leptospir. Tako lahko z opredelitvijo serovara pogosto predvidimo tudi možen vir okužbe in s tem omogočimo nadzor nad širjenjem bolezni. Za opredelitev leptospir je na voljo več fenotipskih in genotipskih metod. Fenotipsko leptospire uvrščamo na podlagi antigenske sorodnosti v serovare in serološke skupine (serotipizacija). Do sedaj je priznanih več kot 200 serovarov, ki so razdeljeni v 25 seroloških skupin. Danes serotipizacijo vse bolj nadomešča genotipizacija, s katero vse znane serovare uvrščamo v 17 vrst. Kljub temu, da imamo za identifikacijo vrst na voljo veliko metod, so te v večini primerov zahtevne, časovno zamudne in predrage, da bi se jih lahko posluževala večina rutinskih laboratorijskih. Namen diplomskega dela je bila primerjava med serotipsko in genotipsko opredelitvijo leptospir. Uporabili smo 69 izolatov leptospir, od tega 42 izolatov uporabljajo pri rutinskem testu mikroaglutinacije, 27 izolatov pa je bilo osamljenih iz humanih vzorcev. Serotipsko smo izolate opredelili na podlagi aglutinacije z imunskimi serumi, za genotipsko opredelitev pa smo uporabili PCR v realnem času. DNA leptospir smo pomnoževali v napravi LightCycler, analiza temperature taljenja (Tm) pomnožkov pa nam je omogočila razlikovanje med patogenimi leptospirami, vsaka vrsta ima namreč značilen Tm. Z obema metodama smo opredelili 58 izolatov, ki smo jih uvrstili v 15 seroloških skupin in v 6 vrst. Serotipska opredelitev se je tudi ujemala z genotipsko, skladno z rezultati predhodnih raziskav. Zaključili smo, da je PCR v realnem času specifična, enostavna in hitra metoda za opredelitev leptospir.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.834.083:616.936(043)=163.6
CX zoonosis/leptospirosis/*Leptospira*/serotyping/immunoserum/genotyping/real time PCR
AU KODRE, Meta
AA RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva (supervisor)/SEME, Katja (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2009
TI SEROTYPIC AND GENOTYPIC IDENTIFICATION OF LEPTOSPIRA SPECIES
DT Graduation thesis (University studies)
NO XII, 65 p., 10 tab., 20 fig., 3 ann., 65 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Leptospires are tightly coiled spirochetes with characteristic hooked ends responsible for a disease called leptospirosis, which affects both animals and humans. Certain serovars are often associated with specific animal hosts. By identifying the serovar, it is often possible to predict potential sources of infection and thereby control the spread of the disease. Several genotypic and phenotypic methods are available for identification of *Leptospira*. One of the phenotypic methods is serotyping, which classifies leptospires into serovars and serogroups on the basis of their antigenic relatedness. More than 200 serovars are recognized, which are divided into 25 serogroups. Phenotypic classification of leptospires has been replaced with genotypic classification in which all known serovars are divided among 17 species. Although various methods for identifying *Leptospira* species are available, many of them are time consuming and too expensive for majority of routine laboratories. The aim of this study was to compare serotypic and genotypic methods for *Leptospira* identification. We analyzed 69 *Leptospira* strains, 42 strains that are routinely used in microagglutination test and 27 strains that were isolated from patients suffering from leptospirosis. We performed agglutination-absorption reaction with hyperimmune sera for serotyping and real-time PCR using LightCycler for genotyping. Because distinct *Leptospira* species have specific melting temperatures, melting curve analysis using real-time PCR enabled us to distinguish between pathogenic species. We identified 58 *Leptospira* strains using both assays. We grouped all strains within 15 serogroups and 6 *Leptospira* species. Moreover, genotypization of species was in perfect agreement with the serotypization. We conclude that the use of LightCycler real-time PCR based on melting curve analysis is a specific, simple and rapid method for *Leptospira* determination.

KAZALO VSEBINE

	stran
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJ RAZISKOVANJA.....	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 EPIDEMIOLOGIJA IN GEOGRAFSKA RAZŠIRJENOST LEPTOSPIROZE..	3
2.1.1 Leptospiroza pri živalih	4
2.1.2 Leptospiroza pri ljudeh.....	5
2.1.3 Leptospiroza v Sloveniji	6
2.2 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI LEPTOSPIR	7
2.2.1 Taksonomija leptospir.....	7
2.2.2 Struktura celice.....	9
2.2.3 Metabolizem in gojenje leptospir	10
2.2.4 Antigenska sestava.....	10
2.2.4.1 Lipopolisaharidi.....	11
2.2.4.2 Proteini zunanje membrane	11
2.2.5 Genom.....	12
2.2.5.1 Organizacija genoma	12

2.2.5.2 Primerjava genoma <i>L. bifexa</i> s.s., <i>L. borgpetersenii</i> in <i>L. interrogans</i> s.s.	13
2.3 LEPTOSPIROZA	14
2.3.1 Klinični znaki bolezni.....	14
2.3.1.1 Neikterična oblika leptosiroze	15
2.3.1.2 Ikterična oblika leptosiroze oz. Weilov sindrom.....	15
2.4 DIAGNOZA LEPTOSPIROZE	16
2.4.1 Osamitev in identifikacija.....	16
2.4.2 Serološko dokazovanje.....	17
2.4.3 Dokaz molekule DNA	18
2.4.4 Druge metode dokazovanja leptospir	18
2.5 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE	19
2.5.1 Razvoj cepiv	19
2.6 TIPIZACIJSKE METODE.....	20
2.6.1 Fenotipske tipizacijske metode	20
2.6.1.1 Serotipizacija	21
2.6.1.2 Denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS-PAGE).....	21
2.6.2 Genotipske tipizacijske metode	22
2.6.2.1 Hibridizacija	22
2.6.2.2 Polimorfizem restrikcijskih fragmentov celotne DNA (REA - restriction endonuclease analysis, REA)	23
2.6.2.3 Ribotipizacija.....	23
2.6.2.4 Pulzna gelska elektroforeza (PFGE - pulsed field gel electrophoresis) ..	24
2.6.3 Tipizacijske metode, ki temeljijo na pomnoževanju DNA.....	25
2.6.3.1 Verižna reakcija s polimerazo s poljubnim začetnim oligonukleotidom (AP-PCR)	25
2.6.3.2 Polimorfizem dolžin pomnoženih delov (AFLP - amplified fragment length polymorphism).....	25
2.6.3.3 PCR v realnem času z analizo temperature taljenja	26

2.6.4 Tipizacijske metode, ki temeljijo na določanju nukleotidnega zaporedja	27
2.6.4.1 Tipizacija zaporedij multiplih lokusov (MLST).....	27
3. MATERIALI IN METODE	29
3.1 MATERIALI	29
3.1.1 Kulture leptospir, ki jih uporabljam za mikroaglutinacijski test (MAT)	29
3.1.2 Kulture leptospir izolirane iz humanih vzorcev	29
3.2 METODE	30
3.2.1 Priprava gojišča EMJH.....	31
3.2.2 Osamitev leptospir iz kužnine bolnikov	31
3.2.3 Gojenje leptospir	32
3.2.4 Identifikacija leptospir z imunskimi serumi	32
3.2.5 Izolacija DNA v agaroznih kockicah	33
3.2.6 Izolacija DNA iz agaroznih kockic.....	34
3.2.7 Izolacija DNA iz kulture	34
3.2.8 Pomnoževanje DNA leptospir v realnem času	34
3.2.8.1 Način detekcije	36
3.2.8.2 Analiza rezultatov.....	37
3.2.8.3 Redčenje kultur leptospir.....	37
4 REZULTATI.....	38
4.1 SEROTIPSKA OPREDELITEV	38
4.2 GENOTIPSKA OPREDELITEV	39
4.3 PRIMERJAVA SEROTIPSKE IN GENOTIPSKE OPREDELITVE	40
4.3.1 Opredeljeni vzorci	40
4.3.2 Neopredeljeni vzorci	43
4.3.2.1 Vzorci, ki jih je potrebno dodatno opredeliti.....	43
4.3.2.2 Vzorci, ki niso imeli specifičnih temperatur taljenja.....	48
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	50

5.1	RAZPRAVA.....	50
5.1.1	Serotipska opredelitev.....	51
5.1.2	Genotipska opredelitev	52
5.1.3	Primerjava serotipske in genotipske opredelitve.....	53
5.2	SKLEPI.....	56
6	POVZETEK.....	57
7	VIRI	58
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

stran

Preglednica 1: Razširjenost nekaterih najpomembnejših serovarov med domačimi in divjimi živalmi (Bedernjak, 1993).....	5
Preglednica 2: Nekateri serovari, ki pripadajo več vrstam (Levett, 2001).....	8
Preglednica 3: Sestava gojišča Ellinghausen McCullough modificirano po Johnson in Harris (EMJH).....	31
Preglednica 4: Sestava uporabljenih pufrov.....	34
Preglednica 5: Oligonukleotidni začetniki za pomnoževanje DNA leptospir.....	35
Preglednica 6: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo s polimerazo v realnem času.....	35
Preglednica 7: Program za pomnoževanja in analizo pomnožkov	36
Preglednica 8: Rezultati serotipizacije z imunskimi serumi.....	38
Preglednica 9: Rezultati genotipizacije in povprečne temperature taljenja pomnožkov za posamezno gensko skupino.....	39
Preglednica 10: Rezultati genotipizacije in serotipizacije pred in po redčitvah izhodnih kultur.....	48

KAZALO SLIK

	stran
Slika 1: Življanski cikel leptospir v naravi (Faine in sod., 1999).....	4
Slika 2: Regijska porazdelitev prijavljenih primerov leptospiroze v Sloveniji od leta 1997-2007 (Poročilo ..., 2008).....	6
Slika 3: Taksonomska razvrstitev spirohet (Berger's ... , 2008).	7
Slika 4: Morfologija leptospir (Bharti in sod., 2003).	9
Slika 5: Model sestave celične stene leptospir (Zuerner in sod., 2001).	11
Slika 6: Bolezensko dogajanje po okužbi z leptospirami (Ružić Sabljić, 2002).	16
Slika 7: Hibridizacija po Southernu s sondom za 16S rDNA po razrezu DNA z encimom EcoRV (Kamonnaree in sod., 2007).	24
Slika 8: Analiza temperature taljenja za patogene leptospire (Merien in sod., 2005).....	27
Slika 9: Shema poteka dela.....	30
Slika 10: Analiza temperature taljenja pomnožkov za patogene leptospire iz vrst <i>L. interrogans</i> sensu stricto ($T_m = 83,8\text{ }^{\circ}\text{C}$), <i>L. kirshneri</i> ($T_m = 84,6\text{ }^{\circ}\text{C}$) in <i>L. borgpetersenii</i> ($T_m = 86,5\text{ }^{\circ}\text{C}$).	40
Slika 11: Analiza temperature taljenja pomnožkov za patogene leptospire iz vrste <i>L. interrogans</i> sensu stricto ($T_m = 83,8\text{ }^{\circ}\text{C}$).	41
Slika 12: Analiza temperature taljenja pomnožkov za patogene leptospire iz vrste <i>L. borgpetersenii</i> ($T_m = 86,5\text{ }^{\circ}\text{C}$).	41
Slika 13: Analiza temperature taljenja pomnožkov za patogene leptospire iz vrste <i>L. kirshneri</i> ($T_m = 84,6\text{ }^{\circ}\text{C}$).	42
Slika 14: Analiza temperature taljenja pomnožkov za vrsto <i>L. noguchi</i> ($T_m = 85\text{ }^{\circ}\text{C}$) in <i>L. biflexa</i> ($T_m = 84\text{ }^{\circ}\text{C}$).	42
Slika 15: Analiza temperature taljenja pomnožkov za sev Sejroe, Sejroe, M84 (Zagreb)..	44
Slika 16: Analiza temperature taljenja pomnožkov za sev Tarassovi, Tarassovi, Mitis Johnson (Zagreb).....	45
Slika 17: Analiza temperature taljenja pomnožkov za sev Sejroe, Saxkoebing, Mus24 (Zagreb) ..	46
Slika 18: Analiza temperature taljenja pomnožkov za izolat KB 185/02.....	46
Slika 19: Analiza temperature taljenja pomnožkov za izolat ŠŽ 242/02	47
Slika 20: Analiza temperature taljenja pomnožkov po redčitvi kultur.....	49

KAZALO PRILOG

Priloga A: Temperatura taljenja pomnožkov za *L. interrogans* sensu stricto.

Priloga B: Temperatura taljenja pomnožkov za *L. borgpetersenii* in *L. kirshneri*.

Priloga C: Temperatura taljenja pomnožkov za *L. noguchi*, *L. meyeri* in *L. biflexa*.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (angl. amplified fragment lenght polymorphism)
AP-PCR	verižna reakcija s polimerazo s poljubnim začetnim oligonukleotidom (angl. arbitrarily primed polymerase chain reaction)
bp	bazni par
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
EMJH	gojišče za kultivacijo leptospir (Ellinghausen McCullough modificirano po Johnson in Harris)
LC	naprava LightCycler
LPS	lipopolisaharid
MAT	mikroaglutinacijski test
MLST	tipizacija zaporedij multiplih lokusov (angl. multilocus sequence typing)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PFGE	pulzna gelska elektroforeza (angl. pulsed field gel electrophoresis)
REA	polimorfizem restrikcijskih fragmentov celotne DNA (angl. restriction endonuclease analysis)
SDS-PAGE	denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza
Tm	temperatura taljenja (angl. melting temperature)

1 UVOD

Leptospire so drobno zavite, gibljive spirohete, ki imajo značilno kljukasto zakriviljene konce. V rod *Leptospira* uvrščamo tako nepatogene kot patogene vrste. Slednje povzročajo bolezen imenovano leptospiroza. Leptospiroza je ena od najbolj razširjenih zoonoz na svetu (Levett, 2001). V Sloveniji se bolezen stalno pojavlja, endemična je v Pomurju (Cerar in sod., 2005). Spekter oblik bolezni je pri ljudeh zelo pester, od subkliničnih okužb do skrajno hudih potekov, ki se velikokrat končajo s smrtnim izidom. Glavni gostitelji leptospir so glodavci, vmesni pa številni drugi sesalci in tudi človek (Bedernjak in Bedernjak Bajuk, 2003). Posamezne živalske vrste so običajno gostitelji za določene serovare leptospir, zato je identifikacija teh pomembna iz stališča javnega zdravstva, saj lahko nakazuje vzrok okužbe in rezervoar ter omogoča določitev metod za preprečevanje in nadzor (WHO, 2003). Tako je za opredelitev leptospir na voljo več fenotipskih in genotipskih metod.

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Patogene leptospire razvrščamo znotraj rodu na osnovi antigenskih lastnosti v serološke skupine in naprej v serovare (serotipizacija). Zaradi antigenske heterogenosti poznamo več kot 200 serovarov. Razvrstitev leptospir na podlagi fenotipskih lastnosti v serološke skupine in serovare je začasna, danes se vse bolj uveljavlja razvrstitev na osnovi genskih lastnosti (genotipizacija), saj lahko le z analizo molekule DNA ustrezno razvrstimo leptospire v posamezne vrste. Po najnovejši taksonomiji jih uvrščamo v 17 vrst. V rutinski diagnostiki zaenkrat še vedno prevladuje serotipizacija, predvsem zaradi pomanjkanja enostavnih in hitrih metod za molekularno identifikacijo.

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

V diplomskem delu smo želeli izolate, ki smo jih opredelili s serološkimi metodami do nivoja serološke skupine, opredeliti še do nivoja vrste. Nukleinsko kislino leptospir smo pomnoževali v napravi LightCycler in na podlagi analize temperature taljenja (T_m) opredelili vrsto. Hkrati smo želeli ovrednotiti tudi oba načina tipizacije.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavljam:

- uspešno serološko opredelitev izolatov leptospir do serološke skupine,
- uspešno pomnoževanje tarčnega odseka DNA v genomu leptospir z napravo LightCycler,
- značilno temperaturo taljenja za DNA posamezne vrste,
- da se bo serološka opredelitev leptospir ujemala z genotipsko opredelitvijo, kot je opisano v literaturi,
- da bomo izolate iste serološke skupine razvrstili med različne vrste leptospir.

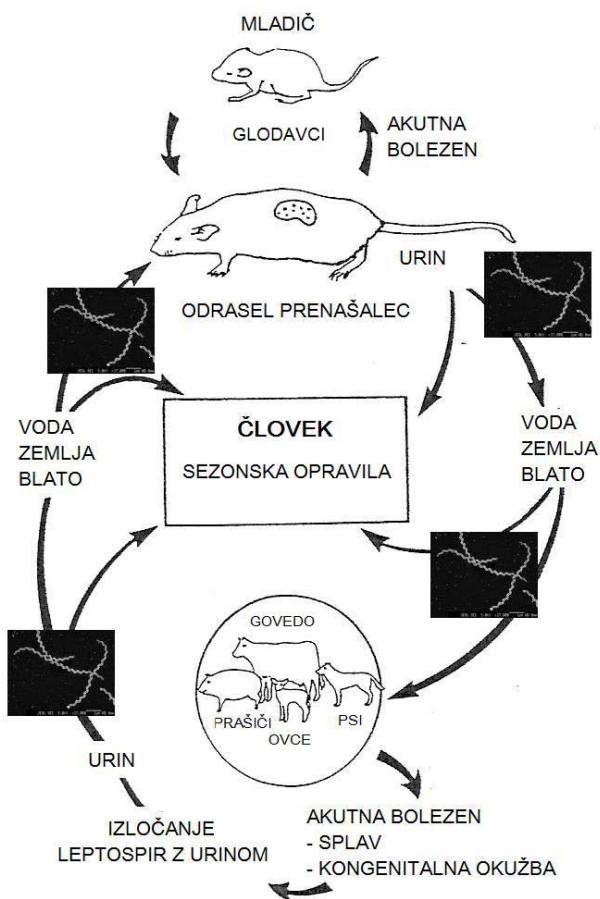
2 PREGLED OBJAV

Adolf Weil je leta 1886 v Heidelbergu prvi opisal klinično sliko ikterične leptospiroze z ledvično odpovedjo, čeprav naj bi enak sindrom opisali že nekaj let prej pri delavcih, ki so delali v kanalih (Levett, 2001; Bedernjak, 1993). Njegovo ime je še danes povezano s hudo obliko leptospiroze, ki jo po njem imenujemo Weilova bolezen (WHO, 2003). Povzročitelja bolezni sta leta 1915 prva opisala Inada in Ido, ko sta našla spirohete in specifična protitelesa v krvi japonskih rudarjev, ki so zboleli za zlatenico. Neodvisno sta leptospire opisali tudi dve skupini nemških zdravnikov, ki sta odkrili spirohete v krvi gvinejskih prašičev, ki so jih inokulirali s krvjo okuženih nemških vojakov (Levett, 2001).

Prvi primer leptospiroze v Sloveniji je bil prijavljen Centralnemu higieniskemu zavodu v Beogradu leta 1938. Šlo je za primer Weilove bolezni v občini Murska Sobota. Prve dokazane primere leptospiroze v Sloveniji pa sta opisala Žagar in Leseničar leta 1953 (Bedernjak, 1993).

2.1 EPIDEMIOLOGIJA IN GEOGRAFSKA RAZŠIRJENOST LEPTOSPIROZE

Leptospiroza je zoonoza, razširjena po vsem svetu. Incidenca bolezni je najvišja v tropskih predelih, predvsem v državah v razvoju, kjer se okužbe z leptospirami pojavljajo skozi vse leto (Radšel-Medvešček, 2002; Levett, 2007). Do izbruhotov bolezni prihaja zlasti po obilnem deževju (Plank in Dean, 2000). V zmerno toplem podnebju je bolezen sezonska z vrhoma poleti in jeseni, saj je preživetje leptospir v okolju vezano na temperaturo (Levett, 2007). Da se okužba sploh lahko pojavi so potrebni trije osnovni dejavniki: prisotnost gostitelja, ustrezno okolje za preživetje leptospir in interakcija med človekom, živaljo in okoljem (slika 1) (Sehgal, 2006).



Slika 1: Življenski cikel leptospir v naravi (Faine in sod., 1999).

2.1.1 Leptospiroza pri živalih

Najpomembnejši rezervoar in prenašalci leptospiroze so glodavci (podgane, miši, voluharji), ki lahko okužbo prenesejo tudi na divje in domače živali. Od domačih živali so z leptospiram ali okužene zlasti svinje, govedo, konji, psi in mačke. Do okužbe pride običajno že v zgodnjih letih s kontaminirano vodo ali zemljo. Po preboleli okužbi leptospire ostanejo v ledvičnih tubulih živali in se izločajo s sečem, največkrat celo življenje (Bedernjak, 1993; Ružić-Sabljić, 2002). Okužene živali izločajo z urinom ogromno število leptospir v okolico, v prvih tednih po okužbi lahko izločijo tudi do 10^5 leptospir/ml urina. Leptospire se v okolju nahajajo v stoječih ali počasi tekočih vodah, močvirjih in vlažni zemlji. Ker lahko preživijo v vodi in zemlji v ugodnih pogojih (rahlo bazičen pH, dovolj vlage in ustrezna temperatura) več tednov, lahko v kontaminiranem območju pride do visokih koncentracij leptospir (Cerar in sod., 2005; Bedernjak, 1993).

Posamezne živalske vrste so gostitelji za določene serovare, medtem ko lahko okužba z drugim serovarom povzroči težko in celo smrtno bolezen (Levett, 2007). Kronična okužba lahko pri prašičih in govedu povzroča tudi abortuse in slabšo plodnost (WHO, 2003). Čim boljša je simbioza med serovarom in gostiteljem, tem manjše so spremembe na ledvicah in tem daljše in intenzivnejše je sproščanje leptospir z urinom (leptospirurija) (Bedernjak, 1993). V preglednici 1 so prikazani nekateri najpomembnejši serovari in njihovi gostitelji pri domačih in divjih živalih. Za razumevanje epidemiologije bolezni je ključnega pomena poznavanje razširjenosti serovarov in njihovih gostiteljev na nekem področju (Levett, 2007).

Preglednica 1: Razširjenost nekaterih najpomembnejših serovarov med domačimi in divjimi živalmi (Bedernjak, 1993).

Serovar	Domače živali	Divje živali
Icterohaemorrhagiae	psi, svinje, konji, govedo	podgane, miši, lisice, nutrije, ježi, opice
Canicola	psi, svinje, govedo, mačke, konji	ježi, podgane, voluharji
Pomona	svinje, govedo, psi, mačke, konji, ovce	lisice, jeleni, ježi, miši, voluharji, volkovi, zajci
Grippotyphosa	govedo, koze, ovce, svinje, psi, mačke	voluharji, miši, podgane, ježi, podlasice, zajci, veverice
Bataviae	psi, mačke, govedo	podgane, miši, voluharji, ježi
Autumnalis	govedo, psi	podgane, miši
Australis	govedo, psi, konji	podgane, ježi, voluharji, podlasice, lisice

2.1.2 Leptospiroza pri ljudeh

Humani primeri okužb večinoma izhajajo iz posredne ali neposredne izpostavitve urinu okuženih živali. Najpogostejsi izvor človeških okužb so domače živali (govedo, ovce, koze, svinje, konji, psi in mačke). Drugi načini, kot so delo z okuženimi tkivi živali, ugrizi živali in uživanje kontaminirane hrane, so redkejši (Bedernjak, 1993). Človek je vedno končni člen v verigi okužb, prenos s človeka na človeka preko urina in s spolnimi odnosi pa je izredno redek in nima znatnega pomena (Radšel-Medvešček, 2002; Faine in sod., 1999).

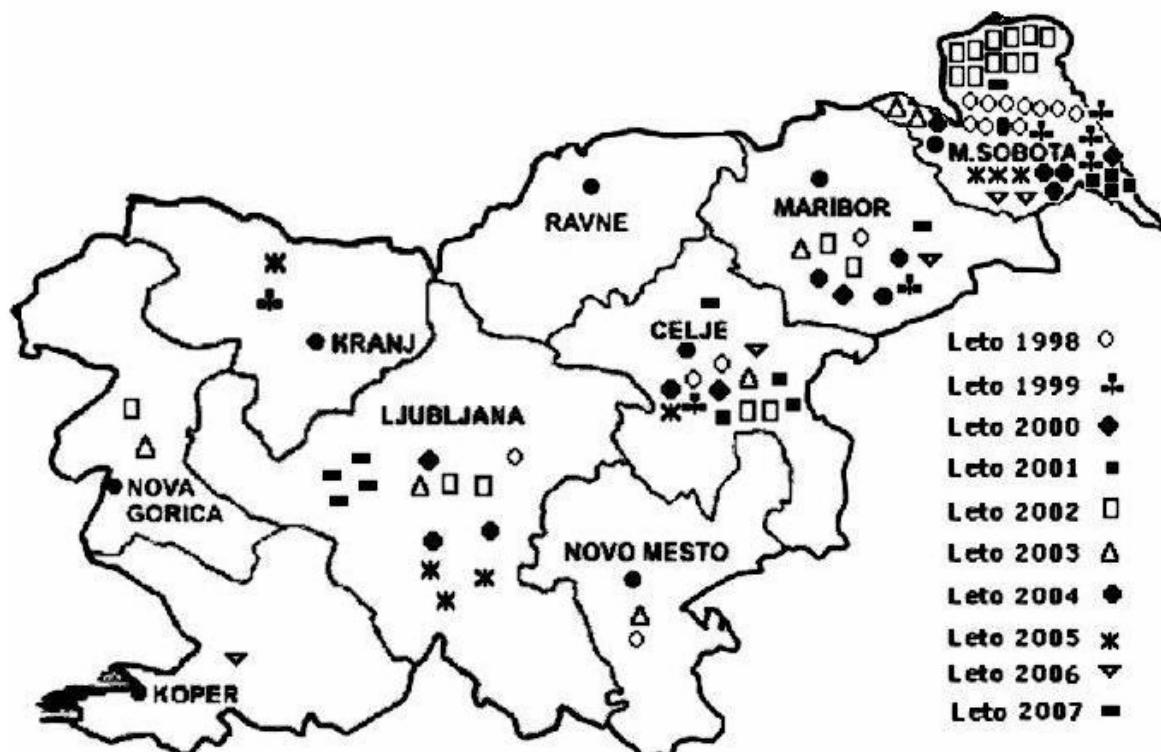
Povečini je leptospiroza poklicna bolezen oseb, ki delajo z živino, živalmi, živalskimi izdelki ali na kontaminirani zemlji in vodi (Bedernjak, 1993). Zaradi neposrednega stika z okuženimi živalmi so ogroženi predvsem kmetje, veterinarji in delavci v klavnicah,

medtem ko do posrednih okužb prihaja pri rudarjih, komunalnih delavcih, ribičih in pridelovalcih riža (Levett, 2007), obolenje pa tudi osebe, ki se kopajo v kontaminirani vodi, jezerih, kanalih in rekah (Radšel-Medvešček, 2002).

Zbolijo osebe vseh starosti. Moški zbolijo pogosteje od žensk, kar lahko pripisemo dejству, da pogosteje opravlja fizična dela v naravi (Bedernjak, 1993).

2.1.3 Leptospiroza v Sloveniji

V Sloveniji je bolezen stalno prisotna. Največ primerov je v Pomurju, ki velja za endemske območje (Cerar in sod., 2005). Od leta 1946 do leta 2001 je bilo v Sloveniji po podatkih Zavoda za zdravstveno varstvo Murska Sobota prijavljenih 756 primerov bolezni, od tega 658 (87 %) primerov prav v Pomurju (Pal in Prelog, 2003). V zadnjih desetih letih so povprečno zabeležili 9 primerov letno. Večina obolelih se je okužila pri izvajanju del doma na kmetiji (Porocilo ..., 2008). Najpogostejše so okužbe s serovaram Grippotyphosa (Ružić-Sabljić, 2002). Pojavljanje leptospiroze v Sloveniji prikazuje slika 2.

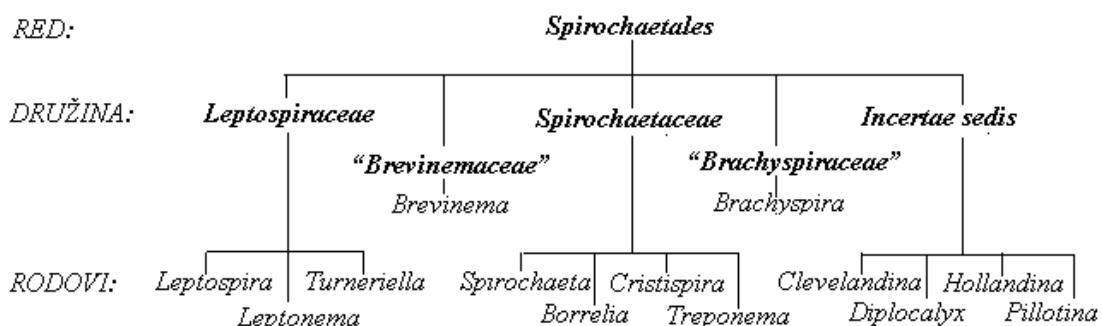


Slika 2: Regijska porazdelitev prijavljenih primerov leptospiroze v Sloveniji od leta 1997-2007 (Porocilo ..., 2008).

2.2 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI LEPTOSPIR

2.2.1 Taksonomija leptospir

Rod *Leptospira* uvrščamo skupaj z rodovoma *Leptonema* in *Turneriella* v družino *Leptospiraceae*, red *Spirochaetales*, razred *Spirochaetes* in v predlagano deblo *Spirochaetes* (Levett, 2007). V red *Spirochaetales* poleg družine *Leptospiraceae* spadajo še štiri družine, kar prikazuje slika 3. V rodovih *Clevelandina*, *Diplocalyx*, *Hollandina* in *Pillotina* najdemo simbiontske bakterije, ki jih zaradi morfologije uvrščamo v red *Spirochaetales*. Ker zaenkrat še nimamo na voljo nukleotidnega zaporedja, s katerim bi lahko določili natančen filogenetski položaj znotraj spirohet, jih trenutno uvrščamo v družino *Incertae Sedis* (Paster in Dewhirst, 2001; Bergey's ... , 2008).



Slika 3: Taksonomska razvrstitev spirohet (Bergey's ... , 2008).

V rodu *Leptospira* najdemo tako patogene kot nepatogene vrste leptospir (Radšel-Medvešček, 2002). Sprva so rod delili v vrsti *Leptospira interrogans* sensu lato (s. l. - sensu lato - v širokem pomenu) in *Leptospira biflexa* sensu lato ter naprej v številne serološke skupine in serovare. V vrsto *L. interrogans* sensu lato so uvrščali vse patogene serovare, vrsta *L. biflexa* sensu lato pa je obsegala nepatogene, večinoma saprofitske serovare izolirane iz okolja. Vrsti so razlikovali na podlagi fenotipskih lastnosti (virulencia, morfologija, rast pri 13 °C, fiziološke lastnosti, ...) (Levett, 2001; Postic in sod., 2000).

Klasična klasifikacija leptospir temelji na razvrščanju leptospir v serovare glede na njihove antigenske lastnosti. Dva seva tako pripadata različnima serovaroma, če po navzkrižni absorpciji s primernimi količinami heterolognih antigenov ostane v ponovljenih testih 10 odstotkov ali več homolognega titra v najmanj enem od dveh serumov (Ružić-Sabljić, 2002; International Committee on Systematic Bacteriology, 1987). Antigenško sorodne serovare nadalje uvrščamo v serološke skupine, ki sicer nimajo taksonomskega položaja, vendar jih še vedno uporabljamo za potrebe diagnostike in epidemiologije (Faine in sod., 1999). Leptospire so antigenško zelo heterogena skupina spirohet, predvsem zaradi raznolikosti v sestavi lipopolisaharida (LPS). Tako med patogene leptospire uvrščamo več kot 200 serovarov, ki so urejeni v 25 seroloških skupin (Zuerner in sod., 2001; WHO, 2003).

Novejši način delitve leptospir temelji na genotipskih lastnostih, kar je omogočil razvoj metod molekularne biologije. Tako so do danes z DNA hibridizacijo opredelili 17 vrst, ki vključujejo vse serovare leptospir. Znotraj nekaterih vrst dobimo tako patogene kot nepatogene serovare. Z raziskavami več sevov iz istega serovara so prikazali tudi gensko heterogenost znotraj serovara, ki je posledica horizontalnih prenosov genov, ki kodirajo površinske antogene. Tako zgolj s podatki o serovaru in serološki skupini leptospir ne moremo z gotovostjo uvrstiti v neko vrsto. Preglednica 2 prikazuje serovare leptospir, ki pripadajo različnim vrstam (Brenner in sod., 1999; Levett, 2007). Iz preglednice je razvidno, da največ serovarov pripada vrsti *L. interrogans* sensu stricto (s. s. - sensu stricto - v ozkem pomenu).

Preglednica 2: Nekateri serovari, ki pripadajo več vrstam (Levett, 2001).

Serološka skupina	Serovar	Vrsta
Bataviae	Bataviae	<i>L. interrogans</i> s. s., <i>L. santarosai</i>
Autumnalis	Bulgarica	<i>L. interrogans</i> s. s., <i>L. kirschneri</i>
Grippotyphosa	Grippotyphosa	<i>L. kirschneri</i> , <i>L. interrogans</i> s. s.
Sejroe	Hardjo	<i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. interrogans</i> s. s., <i>L. meyeri</i>
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> s. s., <i>L. indai</i>
Hebdomadis	Kremastos	<i>L. interrogans</i> s. s., <i>L. santarosai</i>
Icterohaemorrhagiae	Mwogolo	<i>L. kirschneri</i> , <i>L. interrogans</i> s. s.
Pomona	Pomona	<i>L. interrogans</i> s. s., <i>L. noguchii</i>
Pyrogenes	Pyrogenes	<i>L. interrogans</i> s. s., <i>L. santarosai</i>
Mini	Szwajzak	<i>L. interrogans</i> s. s., <i>L. santarosai</i>
Grippotyphosa	Valbuzzi	<i>L. interrogans</i> s. s., <i>L. kirschneri</i>

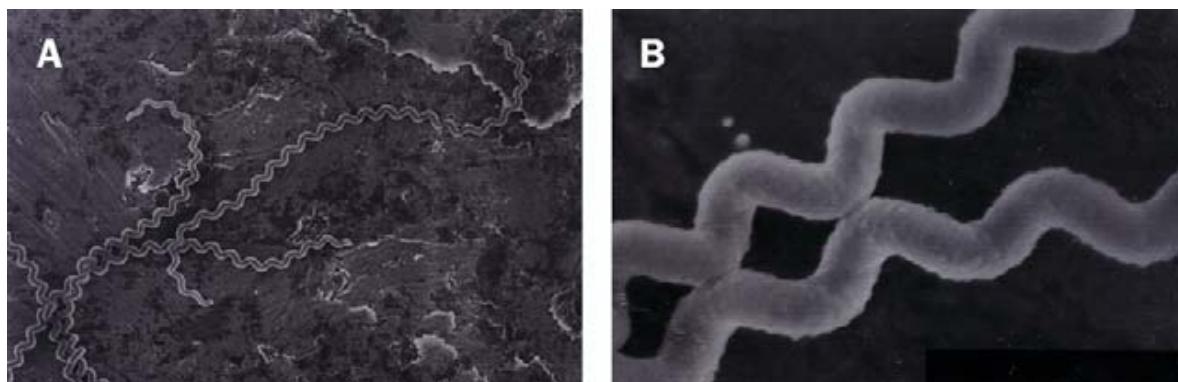
Molekularna klasifikacija leptospir zahteva identifikacijo tako vrste kot serovara za vsak izolat (Levett, 2007).

2.2.2 Struktura celice

Leptospire imajo značilno morfološko zgradbo. So tanke, gibljive, vijačno zavite aerobne bakterije (slika 4). V premeru merijo $0,1 \mu\text{m}$, njihova dolžina pa se giblje od 6 do $20 \mu\text{m}$. Konci so navadno kljukasto zakriviljeni (Cerar in sod., 2005; Levett, 2007). Sveže izolirane patogene leptospire so običajno kraje in bolj vijačno zavite, kot laboratorijski sevi po številnih pasažah (Faine in sod., 1999).

Leptospire imajo podobno strukturo celice, kot ostale spirohete. Poleg citoplazemske membrane in peptidoglikana celico ovija še zunanj ovojnica (Levett, 2001). Gibljejo se z dvema bičkoma, ki se v periplazemskem prostoru ovijata okoli bakterije (Ružić-Sabljić, 2002).

Najlažje jih opazujemo z mikroskopiranjem v temnem polju ali s fazno kontrastnim mikroskopom, saj je zanje značilno, da se slabše barvajo po Gramu (Bharti in sod., 2003).



Slika 4: Morfologija leptospir (Bharti in sod., 2003).

2.2.3 Metabolizem in gojenje leptospir

Leptospire so obligatno aerobne bakterije in za rast potrebujejo stalen vir kisika (Levett, 2007). So kemoorganotrofi in energijo pridobivajo predvsem z β -oksidacijo maščobnih kislin z dolgimi verigami. Te so hkrati tudi edini vir ogljika. Kot vir dušika uporabljajo amonijeve soli in aminokisline. Optimalno rastejo pri pH 7,2-7,6 in temperaturi 28-30 °C. Saprofitske, v naravi prostoživeče leptospire, rastejo tudi pri nižjih temperaturah (11-13 °C), medtem ko patogene vrste pri temperaturi 13 °C ne rastejo več (Faine in sod., 1999; Levett, 2007).

Za patogene leptospire je značilna počasna rast. V gojišču rastejo od 6 do 14 dni, lahko tudi več kot 4 tedne (Bedernjak, 1993). Saprofitske leptospire rastejo hitreje (Murgia in sod., 1997).

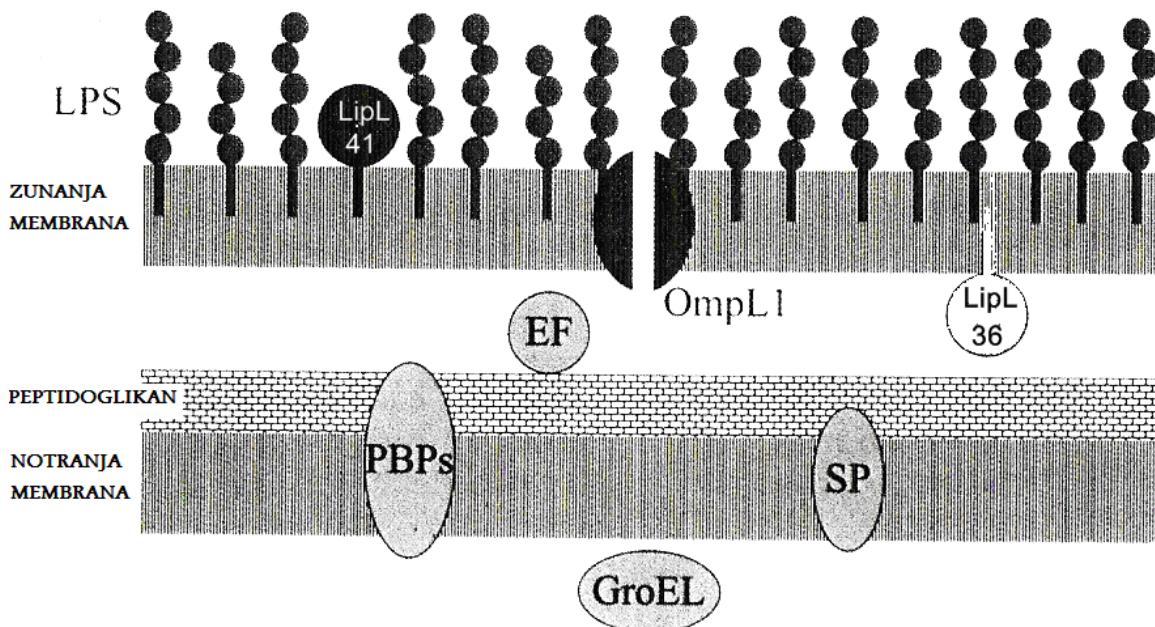
Za gojenje leptospir *in vitro* se večinoma uporablja tekoča gojišča, katerim dodajajo zajčji ali goveji serum, vitamin B₁₂, včasih tudi pufre. Taka gojišča so Krothoffovo, Fletcherevo in Stuartovo gojišče. Sedaj se največ uporablja Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) gojišče, ki vsebuje oleinsko kislino in albumine. Pri izdelavi cepiv pa se uporablja gojišča, ki ne vsebujejo proteinov, tako imajo taka cepiva manj stranskih učinkov (Bedernjak in Bedernjak Bajuk, 2003; Levett, 2001). Trda in poltekoča gojišča se uporablja bolj v raziskovalne namene. Poltekoča gojišča pripravimo tako, da tekočemu gojišču dodamo 0,1-0,3 % agarja. Leptospire rastejo kot nežen obroč ali več obročev, ki jih imenujejo Dingerjevi obroči, 10-12 mm pod površino gojišča. Rastejo tudi na trdih gojiščih, ki vsebujejo 0,8-1,0 % agarja, vendar je potrebno paziti, da ne pride do dehidracije. Taka gojišča je potrebno inkubirati 3 do 4 tedne (Faine in sod., 1999).

Za daljše shranjevanje kultur se uporablja liofilizacija pri -70 °C (Levett, 2001).

2.2.4 Antagenska sestava

Leptospire so antigensko zelo heterogena skupina bakterij. Površinska struktura leptospir se razlikuje glede na to, ali se bakterija nahaja v gostitelju ali v gojišču (Levett, 2007).

Slika 5 prikazuje model sestave celične stene leptospir.



Slika 5: Model sestave celične stene leptospir. Zunanjo membrano sestavljajo lipopolisaharidi (LPS), porin OmpL1 ter lipoproteina LipL41 in LipL36. V periplazemskem prostoru se nahajata bička (endoflagela-EF). V zunanjji membrani ležijo penicilin vezoci proteini (PBPs) in signalne peptidaze (SP), v citoplazmi pa stresne beljakovine (GroEL) (Zuerner in sod., 2001).

2.2.4.1 Lipopolisaharidi

Lipopolisaharidi (LPS) predstavljajo enega izmed glavnih antigenov, s katerimi reagirajo nastala protitelesa, ki sprožijo reakcijo aglutinacije in opsonizacije. LPS tako igra ključno vlogo pri imunosti, vendar izzove imunski odziv le za serovare, ki so antigensko sorodni. Za LPS leptospir je značilno, da je kljub strukturni, biokemični in imunološki podobnosti z lipopolisaharidi po Gramu negativnih bakterij, vsaj 10-krat manj toksičen za gostitelja. Manjšo toksičnost pripisujejo odsotnosti β -hidroksi-miristinske kisline. Zaenkrat pa natančna struktura LPS leptospir še ni poznana (Cullen in sod., 2005; Zuerner in sod., 2001).

2.2.4.2 Proteini zunanje membrane

Proteine zunanje membrane (angl. Outer Membrane Proteins – OMPs) so razporedili v tri skupine: transmembranski proteini, lipoproteini in periferni membranski proteini.

Prvi opisan transmembranski protein je bil porin OmpL1. Znano je, da OmpL1 skupaj z lipoproteinom LipL41 izzove sinergistično imunsko zaščito.

Drugo skupino predstavljajo lipoproteini, ti so z maščobnimi kislinami usidrani v zunanjo membrano. Zunanja membrana sestoji iz najmanj petih lipoproteinov (LipL31, LipL32, LipL36, LipL41, LipL48, ...). LipL41 je obrnjen proti zunanjosti, medtem ko sta LipL36 in LipL48 zasidrana v del zunanje membrane, ki meji na periplazemski prostor. Ugotovili so, da je v zunanji membrani največ zastopan lipoprotein LipL32, ki je tudi imunodominanten antigen med humano leptospirozo.

V skupino perifernih membranskih proteinov spada 31 kDa velik protein P31_{LipL45}. Ta se pod vplivom uree sprosti iz membrane (Cullen in sod., 2005; Haake in Matsunaga, 2002; Zuerner in sod., 2001).

Proteini zunanje membrane so med okužbo gostitelja različno izraženi. Barnett in sod. (1999) so proučevali ekspresijo proteinov zunanje membrane *L. kirschneri* v gostitelju in v kulturi. Ugotovili so, da se *in vivo* izražajo OmpL1, LipL32 in LipL41, ne pa tudi LipL36, čeprav je bil v kulturi ta najbolj izražen. Poznavanje proteinov, ki se med okužbo izražajo, je ključnega pomena pri razvoju cepiv (Zuerner in sod., 2001).

2.2.5 Genom

2.2.5.1 Organizacija genoma

S pulzno gelsko elektroforezo (PFGE) so odkrili, da je genom leptospir velik približno 5000 kb. Sestavljata ga dve krožni molekuli DNA oz. dva kromosoma - večji kromosom velikosti 4400-4600 kb in manjši velikosti 350 kb. Delež gvanina in citozina v molekuli DNA je odvisen od vrste leptospir in se giblje od 35 do 41 %. Znotraj vrste *L. interrogans* sensu stricto so ugotovili tudi precejšno heterogenost in variabilnost, ki se kaže kot sprememba večjih segmentov kromosoma (Faine in sod., 1999; Zuerner in sod., 2001).

Ena izmed posebnosti genoma leptospir je nenavadna razporeditev in število rRNA genov. Pri večini bakterij geni za 16S (*rrs*), 23S (*rrl*) in 5S (*rrf*) ležijo skupaj in so tako tudi istočasno prepisani. Pri leptospirah so geni rRNA razkropljeni po velikem kromosomu in

niso prisotni v enakem številu. *L. interrogans* sensu stricto ima dvojno kopijo gena *rrs* (16S) in *rrl* (23S) in le enojno kopijo *rrf* (5S), ki je zelo ohranjena. Dva gena za 5S rRNA so našli le pri *L. biflexa* sensu stricto (Zuerner in sod., 2001).

Odkrili so tudi številne ponavlajoče DNA elemente (insercijske sekvence, ...), ki so prisotni v več kopijah in so razporejeni po celotnem genomu. Insercijske sekvence, ki so jih našli pri *Leptospira* spp., spadajo v družino IS3-, IS5- in IS110. Te lahko prehajajo iz enega mesta kromosoma na drugo in tako prispevajo k spremembam genoma ter posledično k genski heterogenosti (Zuerner in sod., 2001).

2.2.5.2 Primerjava genoma *L. biflexa* sensu stricto, *L. borgpetersenii* in *L. interrogans* sensu stricto

Picardeau in sod. (2007) so določili nukleotidno zaporedje genoma dvema sevoma, ki pripadata vrsti *L. biflexa* sensu stricto ter ju primerjali z genomoma *L. borgpetersenii* in *L. interrogans* sensu stricto. Ugotovili so, da:

- Genom *L. biflexa* sensu stricto serovar Patoc sev Patoc1 sestavlja trije krožni replikoni, ki skupno kodirajo 3590 proteinov. Poleg velikega (3604 kb) in majhnega kromosoma (278 kb), ki ju najdemo tudi pri patogenih leptospirah in nosita esencialne gene, ima *L. biflexa* sensu stricto še tretji replikon velikosti 74 kb. Tretji replikon so poimenovali p74, vendar pa zaenkrat še ni znano ali ima funkcijo kromosoma ali plazmida.
- Približno 2/3 oz. 2052 genov *L. biflexa* sensu stricto ima ortologne gene pri patogenih vrstah *L. interrogans* sensu stricto in *L. borgpetersenii*. Ti geni predstavljajo jedro genoma rodu *Leptospira* in nosijo zapis za številne esencialne metabolične funkcije (angl. housekeeping functions). Predvidevajo, da je organizacija genov *L. biflexa* sensu stricto zelo sorodna predniskemu genomu leptospir.

- Čeprav sta si genoma *L.biflexa* sensu stricto in *L. borgpetersenii* po velikosti podobna, ima *L.biflexa* sensu stricto gene bolj strnjene zaradi manjšega števila insercijskih elementov.
- Transkripcija je pri nepatogenih sevih drugače regulirana kot pri patogenih sevih.

2.3 LEPTOSPIROZA

V človeško telo leptospire vdrejo običajno skozi poškodovano kožo, intaktno žrelno sluznico ali očesno veznico. Verjetno lahko prodrejo tudi skozi razmočeno kožo (Bedernjak in Bedernjak Bajuk, 2003; Ružić-Sabljić, 2002). Z endocitozo nato vstopijo v subepiteljske celice in kasneje preidejo v krvni obtok, kjer se razmnožujejo. S krvjo se raznesejo po vsem telesu in se zadržijo predvsem v jetrih, osrednjem živčevju, skeletnih in srčni mišici, očeh in ledvicah, kjer povzročajo bolezenske spremembe. Bolezenski znaki se pojavijo od 2 do 20 dni po okužbi, odvisno od števila leptospir, virulence in vstopnega mesta (Radšel-Medvešček, 2002).

Pomemben virulenten dejavnik leptospir na začetku okužbe in pri širjenju je njihova gibljivost oz. zmožnost premikanja skozi viskozen medij. Opazili so usmerjeno gibanje (kemotaksa) proti hemoglobinu. Okvaro ožilja pa verjetno povzročajo različni dejavniki: endotoksini celične stene, encimi in toksini, ki se sproščajo iz razpadlih leptospir, hemolizin ... (Bharti in sod., 2003; Ružić-Sabljić, 2002).

2.3.1 Klinični znaki bolezni

Leptosirozo bi glede na patogenezo lahko uvrstili v skupino bolezni z difuzno okvaro ožilja (Ružić-Sabljić, 2002). Klinična slika je zelo pestra. Najbolj pa je izražena nagnjenost h krvavitvam, ki so lahko lokalne ali razširjene v več organov. Krvavitve so posledica močno razširjenih okvar kapilarnega endotelja. Pri 90 % bolnikov okužba poteka kot sistemski bolezen, ki se popolnoma pozdravi spontano. Možen je tudi težji klinični potek z zlatenico, akutno ledvično odpovedjo, krvavitvami in večorgansko odpovedjo - Weilov sindrom (Pal in Prelog, 2003; Radšel-Medvešček, 2002; Ružić-Sabljić, 2002). Klinična

slika bolezni ni odvisna od serovara, ampak lahko vsak serovar povzroči tako lažji kot težji potek bolezni (Bedernjak in Bedernjak Bajuk, 2003).

Bolezen poteka v dveh fazah, akutni ali septični in imunski fazi. Septična faza bolezni traja približno teden dni, sledi ji imunska faza v kateri pride do tvorbe protiteles in izločanja leptospir z urinom (Levett, 2007).

2.3.1.1 Neikterična oblika leptospiroze

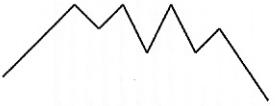
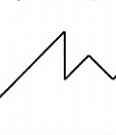
Večinoma okužba poteka subklinično kot kratkotrajno vročinsko stanje. Septično obdobje se začne nenadno, z vročino, mrzlico, glavobolom in bolečinami v mišicah in trebuhu. Ti simptomi trajajo približno 7 dni (Levett, 2001). V tem času so leptospire prisotne v krvi in likvorju. Ko se pojavijo aglutinizirajoča opsonična protitelesa IgM, leptospire izginejo iz krvi in likvorja. Začne se drugo - imunsko obdobje, ki traja od 4 do 30 dni. Humoralni imunski odziv bolnika je usmerjen na epitope stranskih verig lipopolisaharidov, ki spodbujajo tvorbo imunoglobulinov IgM in kasneje IgG (Radšel-Medvešček, 2002). V tem obdobju je prevladujoča klinična slika serozni meningitis, pojavljajo se lahko tudi konjunktivalne sufuzije s krvavitvami ali brez njih, fotofobija, otrdelost mišic, bolečine v očeh, adenopatija in hepatosplenomegalija (Radšel-Medvešček, 2002). Leptospire po pojavu protiteles sicer izginejo iz krvi in likvorja, različno dolgo pa se še lahko zadržijo v posameznih organih, zaradi česar lahko prihaja do kasnejših zapletov (Levett, 2007). Kroničnega klicenoštva pri ljudeh ni. Izločanje leptospir s sečem traja pri človeku običajno od 2 do 4 tedne, če bolnik ni bil zdravljen z antibiotiki (Bedernjak, 1993).

2.3.1.2 Ikterična oblika leptospiroze oz. Weilov sindrom

Ikterična leptospiroza je hujša oblika bolezni, pri kateri je potek zelo hiter (Levett, 2007). Pri tej obliki leptospiroze septična in imunska faza nista ločeni. Bolezen poteka zelo različno. Poleg splošnih znakov in simptomov, ki so značilni za neikterično obliko, so za Weilovo bolezen značilni še znaki jeterne odpovedi, akutne ledvične odpovedi, hemoragičnega pnevmonitisa in srčnih aritmij (Bedernjak, 1993; Radšel-Medvešček, 2002). Za človeka so lahko usodne krvavitve v možganih, nadledvični žlezi in srcu. Pri

hudih krvavitevah v pljuča ali v plevralni prostor lahko nastopi akutna dihalna stiska, ta oblika bolezni ima tudi najvišjo smrtnost. Smrt pa lahko nastopi tudi zaradi obsežnih krvavitev v drugih organih (Bedernjak in Bedernjak Bajuk, 2003). Smrtnost je 5 do 40 % (Radšel-Medvešček, 2002).

Potek bolezni pri obeh kliničnih slikah prikazuje slika 6.

LEPTOSPIROZA BREZ ZLATENICE		LEPTOSPIROZA Z ZLATENICO (Weilova bolezen)	
vročina:	1. faza 3-7 dni (sepsa) 	2. faza 0 dni-1mesec (imunska faza) 	1. faza 3-7 dni (sepsa) 
pomembni klinični znaki:	-bolečine v mišicah -glavobol -bolečine v trebuhu -bruhanje -injicirane konjunktive -vročina	-meningitis -uveitis -izpuščaj -vročina	-zlatenica -krvavitev -odpoved ledvic -miokarditis
prisotnost leptospir:	kri likvor seč	kri likvor seč	kri likvor seč

Slika 6: Potek bolezni pri okužbi z leptospirami (Ružić Sabljić, 2002).

2.4 DIAGNOZA LEPTOSPIROZE

Pri diagnostiki leptosiroze velikokrat pomaga epidemiološka anamneza: poznavanje razširjenosti leptospir in možnost izpostavitve bolnika okužbi (Ružić-Sabljić, 2002).

Diagnozo potrdimo z osamitvijo leptospir, s serokonverzijo, štirikratnim porastom titra specifičnih protiteles ali z dokazom molekule DNA leptospir (Pal in Prelog, 2003).

2.4.1 Osamitev in identifikacija

Vzorce za osamitev leptospir je vedno potrebno odvzeti pred antibiotičnim zdravljenjem (Postic in sod., 2000). Leptospire lahko izoliramo iz bolnikove krvi in likvorja v prvi fazi

bolezni (1. teden), iz bolnikovega seča pa v drugi fazi bolezni (od 2. do 4. tedna). Osnovno gojišče za izolacijo je EMJH (Ružić-Sabljić, 2002; Wuthiekanun in sod., 2007).

Pomanjkljivost te metode je zahtevnost, nizka občutljivost in časovna zamudnost, zaradi počasne rasti leptospir. Vzorce je potrebno pregledovati tedensko z mikroskopiranjem v temnem polju vsaj 6 do 8 tednov (Bharti in sod., 2003; Ahmad in sod., 2005).

Zaradi naštetih pomanjkljivosti se osamitev leptospir redko uporablja v klinični diagnostiki, ta metoda je zlasti pomembna pri epidemioloških študijah. Osamljeni sevi leptospir iz kliničnih vzorcev pa so ključni pri proučevanju patogeneze (Wuthiekanun in sod., 2007).

2.4.2 Serološko dokazovanje

V vsakdanji klinični praksi se za dokaz leptospiroze običajno uporablajo serološke metode. Za serološko diagnostiko pošljejo v laboratorij nativno kri ali serum. Protitelesa v krvi se pričnejo pojavljati šele 5. do 7. dan po pojavu simptomov, zato je za serološko potrditev priporočen odvzem parnih serumov v razmiku od 10 do 14 dni. Na ta način lahko potrdimo diagnozo in ovržemo možnost, da so dokazana specifična protitelesa posledica stare okužbe (Levett, 2007; Pal in Prelog, 2003).

Protitelesa, ki nastanejo po okužbi, so specifična za serovar leptospir, ki je okužbo povzročil. Zato je potrebno poznati najpomembnejše serovare na nekem področju in jih vključiti v test (Ružić-Sabljić, 2002).

Referenčna metoda za serološko diagnozo je mikroaglutinacijski test (MAT) z živimi leptospirami. Z njim določamo prisotnost skupnih specifičnih protiteles razreda IgM in IgG (Levett, 2007). Test je zahteven, predvsem zaradi izvedbe in interpretacije. V testu služijo kot antigeni žive kulture leptospir, ki jih je potrebno gojiti, delo s patogenimi organizmi pa predstavlja tveganje za okužbo. Hkrati pa gojenje *in vitro* ne sme vplivati na njihove aglutinacijske lastnosti. V akutni fazi bolezni je občutljivost testa nizka, pogosto prihaja tudi do navzkrižne aglutinacije med različnimi serološkimi skupinami (Ahmad in sod., 2005; Levett, 2007). S testom ne moremo identificirati serovara, ki je okužbo povzročil, dobimo pa splošen vtis katere serološke skupine prevladujejo v populaciji (Levett, 2003).

Alternativo testu MAT predstavljajo encimsko imunski testi (ELISA), s katerimi detektiramo protitelesa razreda IgM. Ti testi so občutljivejši od MAT v zgodnji akutni fazi bolezni, saj lahko z njimi zaznavamo protitelesa že v prvem tednu bolezni (McBride in sod., 2007; Levett, 2007). Na voljo so še številne druge metode za detekcijo protiteles: indirektna hemaglutinacija, makroaglutinacija, leteks test, imunofluorescenca, ... (Levett, 2001).

2.4.3 Dokaz molekule DNA

Molekulo DNA najpogosteje dokazujemo z verižno reakcijo s polimerazo (angl. polymerase chain reaction, PCR). PCR ima pomembno vlogo zlasti pri zgodnjem odkrivanju leptospiroze, pred pojavom protiteles (Ooteman in sod., 2006). Hitra diagnoza je izrednega pomena, saj je zdravljenje z antibiotiki v začetku bolezni uspešnejše (Levett, 2007). Številne študije so to metodo označile kot visoko občutljivo in specifično. DNA leptospir so uspešno pomnožili iz različnih vzorcev: serum, urin, likvor, tkiva. Razvili so tudi že več metod za pomnoževanja DNA leptospir v realnem času, ki pa jih morajo še ovrednotiti z večjimi kliničnimi študijami (Levett in sod., 2005; Smythe in sod., 2002).

Slabost večine PCR metod je nezmožnost identifikacije serovara, ki je povzročil okužbo. Ta metoda je tudi zahtevna in draga ter slabo dostopna v številnih državah, kjer je leptospiroza endemska (Levett, 2007; Plank in Dean, 2000).

2.4.4 Druge metode dokazovanja leptospir

Poleg zgoraj naštetih metod se za dokazovanje leptospiroze uporabljamjo še: direktna preiskava v temnem polju z imunofluoresenco ali s svetlobnim mikroskopom po ustreznem barvanju (Levett, 2007). Leptospirozo lahko dokažemo z biološkim poižkusom na budrah (Bedernjak in Bedernjak Bajuk, 2003). Saengjaruk in sod. (2002) so razvili tudi test za detekcijo antiga leptospir v urinu s pomočjo protiteles.

2.5 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE

Leptospire so občutljive za številne antibiotike (Levett, 2007). Antibiotik izbire je kristalni penicilin, na katerega doslej leptospire še niso razvile odpornosti (Bedernjak in Bedernjak Bajuk, 2003). Zadnje raziskave so pokazale, da je zdravljenje z intravenskim penicilinom učinkovito tudi pri hudih in poznih oblikah bolezni. Srednje hude in lahke oblike bolezni zdravijo tudi z amoksicilinom, tetraciklini ali doksiciklinom (Radšel-Medvešček, 2002). Zdravljenje traja od 5 do 7 dni in je najbolj uspešno, kadar se začne v prvih štirih dneh bolezni. Zelo pomembno je tudi podporno zdravljenje, to je nadomeščanje tekočine in elektrolitov, po potrebi peritonealna dializa ali hemodializa ter ustrezno zdravljenje hipotenzije in večjih krvavitev (Bedernjak, 1993; Radšel-Medvešček, 2002).

Preprečevanje leptospiroze pri človeku je zelo težko, ker ni mogoče izkoreniniti velikega živalskega rezervoarja okužbe. Potrebno je zmanjšati neposredni in posredni stik z okuženimi živalmi in njihovimi izločki (Radšel-Medvešček, 2002). Pomembne so redne deratizacije, dober veterinarski nadzor nad domačimi živalmi in uporaba zaščitnih sredstev (rokavice, gumjasti škornji, ...). Izogibati se je potrebno tudi kopanju v kontaminiranih vodah (Bedernjak in Bedernjak Bajuk, 2003). Preprečevanje okužbe je možno tudi s kemoprofilaksjo, kar pa je primerno le za kratkotrajno bivanje v območju, kjer je tveganje za okužbo veliko (Radšel-Medvešček, 2002).

2.5.1 Razvoj cepiv

Pri preprečevanju leptospiroze je pomembna tudi aktivna imunizacija izpostavljenih ljudi in živali (Bedernjak in Bedernjak Bajuk, 2003). Cepljenje domačih živali je znatno zmanjšalo število obolelih in ga zato v endemskih področjih priporočajo (Radšel-Medvešček, 2002). Živalska cepiva so običajno polivalentna in vsebujejo serovare, ki se pojavljajo pri določeni živalski vrsti in v določenem prostoru. Taka cepiva pri ljudeh ne bi bila učinkovita, saj so ti zaradi dela in potovanj izpostavljeni različnim serovarom (Plank in Dean, 2000).

V serumu bolnikov, ki so zboleli za leptospirozo, so našli protitelesa tako proti proteinom zunanje membrane kot periplazemskega prostora, kakor tudi za serovar specifičnim

lipopolisaharidom. Zato so zdajšnji napori raziskovalcev usmerjeni na odkritje cepiva, ki bi omogočalo daljšo zaščito proti širšemu naboru leptospir (Bharti in sod., 2003).

Velik preboj pri razvoju cepiva je omogočila genska tehnologija, ki dovoljuje ekspresijo genov leptospir v heterolognih organizmih in tako produkcijo rekombinantnih cepiv. Čeprav že obstaja nekaj cepiv, so ta relativno neuspešna v klinični rabi (Wang in sod., 2007).

2.6 TIPIZACIJSKE METODE

Čeprav je s kliničnega stališča za bolnika dovolj potrditev leptospirose, iz perspektive javnega zdravstva tipizacija lahko nakazuje vzrok okužbe in rezervoar ter omogoča določitev metode za preprečevanje in nadzor (WHO, 2003).

Uspešen tipizacijski načrt mora imeti številne pomembne lastnosti: metodologija mora biti standardizirana, občutljiva, specifična, objektivna ter kritično ocenjena. Kriteriji za vrednotenje tipizacijskih metod so še: sposobnost dobiti nedvoumen rezultat za vsak izolat, ponovljivost metode, sposobnost razlikovanja (angl. discriminatory power), cena in zahtevnost izvedbe ter interpretacije (Singh in sod., 2006).

Za opredelitev leptospir je na voljo več metod, tako fenotipskih kot genotipskih. Vsak referenčni laboratorij lahko tako uporablja različne kombinacije testov, odvisno od razpoložljivosti reagentov ter izkušenj s posamezno metodo. Običajno se kombinirajo serološke in molekularne metode (Faine in sod., 1999).

2.6.1 Fenotipske tipizacijske metode

Prve metode, ki so jih uporabljali za identifikacijo in tipizacijo organizmov, so temeljile na fenotipskih lastnostih (Singh in sod., 2006). Sprva so patogene in nepatogene leptospire, ki so sicer morfološko enake, ločevali na osnovi virulence in gojitvenih pogojev. Vendar pa morfologija, gojenje in biokemijske značilnosti ne zadostujejo za natančno identifikacijo (Johnson in Harris, 1967; Postic in sod., 2000).

2.6.1.1 Serotipizacija

Serotipizacija je široko uporabljena fenotipska metoda, pri kateri s serijo protiteles detektiramo antigene na površini bakterij (Singh in sod., 2006). Sem uvrščamo metodo navzkrižne aglutinacije-absorbcijske reakcije z monoklonskimi protitelesi.

- Navzkrižna aglutinacija-absorbacija

Osnovna taksonomska enota pri klasifikaciji leptospir je serovar. Tega najpogosteje določamo z metodo navzkrižne aglutinacije-absorbcijske reakcije s kunčjimi antiserumi.

V prvi fazi neznan sev titriramo z naborom kunčjih antiserumov, ki predstavljajo vse znane serološke skupine. Na ta način neznan sev uvrstimo v serološko skupino. Šele v drugi fazi s primerjavo navzkrižne aglutinacije med sevi, ki pripadajo določeni serološki skupini, opredelimo neznani sev do serovara (WHO, 2003).

Ta metoda identifikacije je zapletena, časovno zamudna in zahteva zbirkovo vseh referenčnih sevov in njihovih antiserumov, zato jo izvajajo le v referenčnih laboratorijih (WHO, 2003; Postic in sod., 2000).

- Monoklonska protitelesa

Leptospire aglutinirajo tudi z mišjimi monoklonskimi protitelesi. Serovar določimo na osnovi značilnega vzorca aglutinacije. Čeprav je priprava monoklonskih protiteles zahtevna in časovno zamudna, je serotipizacija z njimi enostavna in omogoča hitre rezultate. Zaenkrat so na voljo monoklonska protitelesa za približno polovico do sedaj znanih in najbolj razširjenih serovarov (WHO, 2003; Collares-Pereira in sod., 2000).

2.6.1.2 Denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS-PAGE)

Galayanee in sod. (2007) so razvili alternativno metodo za razlikovanje leptospir, ki pripadajo različnim serološkim skupinam. Lizate leptospir so najprej ločili s poliakrilamidno elektroforezo v denaturirajočih pogojih, temu pa je sledil imunski prenos (angl. immunoblotting) ter dokaz ločenih proteinov s hiperimunskimi serumi. Dokazali so,

da je na podlagi vzorca imunoreaktivnih pasov mogoče razlikovati med različnimi serološkimi skupinami leptospir.

2.6.2 Genotipske tipizacijske metode

Zaradi težav, ki so povezane s serološko identifikacijo leptospir, se je povečalo zanimanje za molekularne tipizacijske metode, s katerimi odkrivamo različnost na nivoju bakterijskega genoma (Levett, 2007). Metode temeljijo na:

- analizi genomske DNA po razrezu z restriktionskimi encimi,
- pomnožitvi specifičnih odsekov genoma z verižno reakcijo s polimerazo,
- določitvi in analizi nukleotidnega zaporedja izbranih odsekov DNA,
- kombinaciji različnih metod (van Belkum in sod., 2007).

2.6.2.1 Hibridizacija

Hibridizacija je metoda, ki temelji na parjenju dveh enoverižnih nukleinskih kislin po principu komplementarnosti. Obstajajo številne tehnične različice postopka. Običajno nukleinske kisline vežemo na trden nosilec, hibridizacijo pa izvedemo z označenimi sondami. Trdnost povezave med označeno sondijo in tarčno nukleinsko kislino je odvisna od skladnosti njunih baznih parov in okoliščin hibridizacije (Herzog-Velikonja in Gruden, 2000; Poljak, 2002).

Referenčna metoda za primerjavo sorodnosti DNA leptospir je kvantitativna DNA-DNA hibridizacija (WHO, 2003). Po filogenetski definiciji isti vrsti pripadajo sevi pri katerih je sorodnost 70 ali več odstotna (International Committee on Systematic Bacteriology, 1992). Tako so do sedaj razvrstili okoli 300 sevov v 17 genskih skupin (Brenner in sod., 1999). Pomanjkljivost te metode je, da je preveč zapletena, da bi bila primerna za rutinsko uporabo (WHO, 2003).

2.6.2.2 Polimorfizem restrikcijskih fragmentov celotne DNA (angl. restriction endonuclease analysis, REA)

REA je občutljiva in objektivna metoda za ločevanje med serovari leptospir ter za identifikacijo izolatov. Metodo so standardizirali Marshall in sod. (1981). Restrikcijska encima izbere sta *EcoRI* in *HhaI*, zaradi popolne razgradnje in dobre ločljivosti večjih fragmentov. Prav tako dobre rezultate so dobili z encimom *HaeIII* (Venkatesha in Ramadass, 2001).

Metoda temelji na razrezu genomske DNA z restrikcijskim encimom, ki pogosto reže. Tako dobimo veliko število fragmentov različnih velikosti, ki po ločitvi z gelsko elektroforezo tvorijo značilen profil. Sorodnost med sevi lahko ugotovimo s primerjavo profilov REA neznanih sevov s profili REA znanih referenčnih sevov.

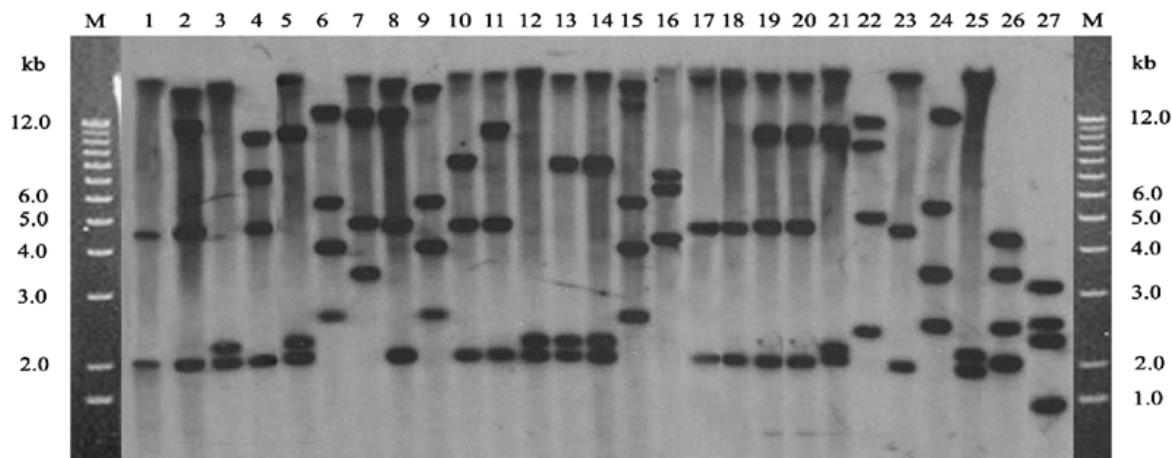
REA je sicer hitra tipizacijska metoda z visoko sposobnostjo razlikovanja, vendar je, zaradi velikega števila fragmentov, interpretacija zelo zahtevna (van Belkum in sod., 2007; WHO, 2003).

Za lažjo interpretacijo rezultatov lahko po elektroforezi sledi še prenos po Southernu in hibridizacija (van Belkum in sod., 2007). Za razlikovanje med izolati *L. interrogans* sensu stricto sta Zuerner in Bolin (1997) uporabila sonde, ki so komplementarne insercijski sekvenci IS1500. Ta je prisotna na polimorfnih fragmentih, zato sta lahko na podlagi vzorca pasov identificirala serovare.

2.6.2.3 Ribotipizacija

Ribotipizacija je metoda, ki združuje encimski razrez genoma in hibridizacijo. Za razrez DNA uporabimo restrikcijsko endonukleazo, ki pogosto reže in ima prepoznavno zaporedje dolgo 4 bp. Hibridizacijo pa izvedemo s sondami, ki so komplementarne rDNA (van Belkum in sod., 2007).

Kositanont in sod. (2007) so za ločevanje med serovari uporabili metodo ribotipizacije s prenosom po Southernu. Po encimskem razrezu DNA z encimoma *EcoRV* in *HindIII* so identificirali fragmente rDNA s sondama za 16S in 23S rDNA (slika 7). Metoda se je izkazala kot hitra in uspešna molekularna tehnika za tipizacijo, ki ima velik potencial pri epidemioloških študijah.



Slika 7: Hibridizacija po Southernu s sondou za 16S rDNA po razrezu DNA z encimom *EcoRV* (Kositanont in sod., 2007).

2.6.2.4 Pulzna gelska elektroforeza (angl. pulsed field gel electrophoresis, PFGE)

Pri tej metodi celotno genomsko DNA režemo z encimom, ki redko reže. Nastali fragmenti (velikosti od 20 do 600 kbp) so preveliki, da bi jih lahko ločili z navadno agarozno elektroforezo. Zato za ločevanje uporabimo pulzno gelsko elektroforezo, ki temelji na periodičnem spremjanju smeri električnega toka (van Belkum in sod., 2007; Singh in sod., 2006).

PFGE se je izkazala kot uspešna metoda za identifikacijo serovara leptospir (Levett, 2001). Pri razgradnji DNA z encimom *NotI* pri večini sevov dobimo profil, ki je značilen za pripadajoč serovar (Postic in sod., 2000). Genom leptospir je na nivoju serovara zelo ohranjen, saj je profil današnjih izolatov enak profilu referenčnih sevov istega serovara, čeprav so ti sevi vzdrževani v kulturah že več let. Prav tako so enaki profili izolatov iz različnih predelov sveta, ki pripadajo istim serovarom (Herrmann in sod., 1991).

Prednosti te metode sta dobra ponovljivost in sposobnost razlikovanja. Slabost pa draga oprema in daljši čas, ki je potreben, da dobimo rezultate (van Belkum in sod., 2007). Kljub temu je PFGE priporočena metoda za opredelitev novih in že obstoječih serovarov (Postic in sod., 2000).

2.6.3 Tipizacijske metode, ki temeljijo na pomnoževanju DNA

Glavna slabost večine metod, ki temeljijo na analizi kromosomske DNA je, da potrebujemo velike količine očiščenega dednega materiala (Levett, 2001). Na drugi strani pa za metode, ki temeljijo na pomnoževanju DNA, potrebujemo manj dednega materiala, kar je zelo pomembno pri proučevanju počasi rastočih bakterij, kot so leptospire (Perolat in sod., 1994).

2.6.3.1 Verižna reakcija s polimerazo s poljubnim začetnim oligonukleotidom (angl. arbitrarily primed polymerase chain reaction, AP-PCR)

AP-PCR je enostavna in hitra metoda za tipizacijo leptospir, pri kateri s poljubno izbranim začetnim oligonukleotidom pomnožimo naključne dele genoma. Ključno je, da poteka naleganje začetnih oligonukleotidov v prvih dveh ciklih pri nižji temperaturi, da lahko pride do nepopolne hibridizacije med začetnimi oligonukleotidi in matrično DNA na več naključnih delih kromosoma. Po gelski elektroforezi pridelkov PCR dobimo vzorec pomnoženih fragmentov različnih velikosti in jakosti (Postic in sod., 2000; Singh in sod., 2006; Ramadass in sod., 2002). Vzorec pomnoženih fragmentov je odvisen od začetnih oligonukleotidov, kvalitete in količine matrične DNA in pogojev elektroforeze, zato je skoraj nemogoče primerjati rezultate študij. Prav tako je težko doseči ponovljivost, če eksperimentalni postopek ni standardiziran (Postic in sod., 2000; Corney in sod., 1997; Levett, 2001).

2.6.3.2 Polimorfizem dolžin pomnoženih delov (amplified fragment length polymorphism, AFLP)

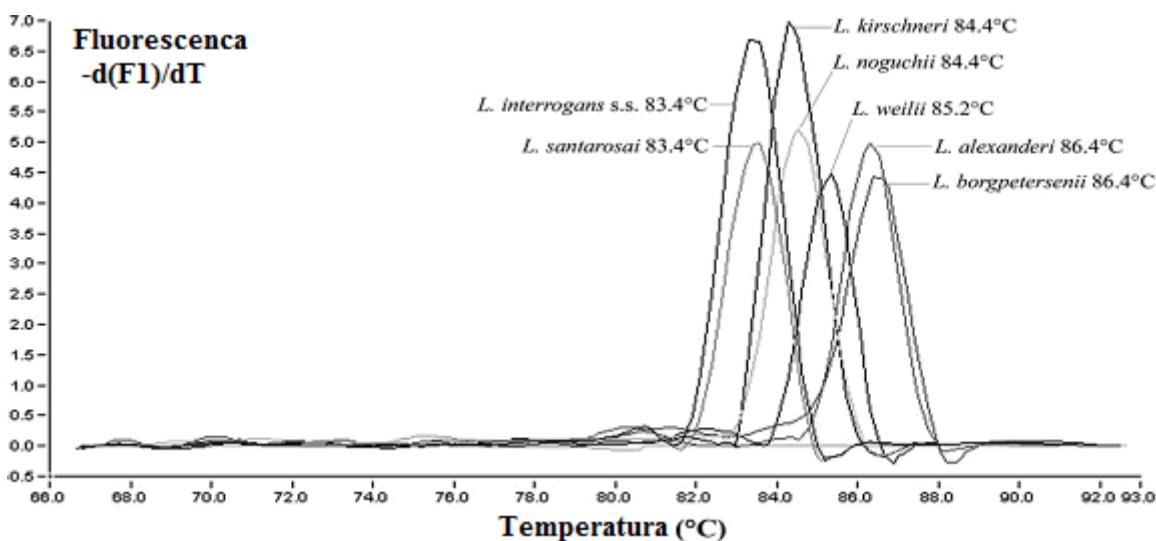
Metoda temelji na selektivnem pomnoževanju delov genomske DNA, ki jih predhodno razrežemo z enim ali dvema restriktijskima encimoma, od katerih eden običajno reže pogosteje kot drugi. Sledi ligacija dvoverižnih oligonukleotidnih adapterjev in selektivno pomnoževanje restriktijskih fragmentov. Pomnožene fragmente lahko ločimo na agaroznem gelu, velikokrat pa je eden od začetnih oligonukleotidov označen in tako lahko za ločevanje fragmentov uporabimo avtomatsko sekvenčno napravo (van Belkum in sod.,

2007; Olive in Bean, 1999). Za genotipizacijo leptospir so Vijayachari in sod. (2004) uporabili fluorescentno označene začetne oligonukleotide.

2.6.3.3 PCR v realnem času z analizo temperature taljenja

Izraz PCR v realnem času označuje metodo, pri kateri poteka pomnoževanje tarčnega odseka in analiza nastalega produkta sočasno v zaprtem homogenem sistemu. Za detekcijo pomnožkov lahko uporabimo nespecifična barvila (SYBR Green I, etidijev bromid,...) ali s fluorescentnimi barvili označene sonde specifične za zaporedje (npr. hibridizacijske in hidrolizacijske sonde) (Mackay, 2004).

Najenostavnejše PCR pomožke zaznamo z uporabo fluorescentnega barvila. Danes se največ uporablja SYBR Green I (Wittwer in Kusukawa, 2004; Nolte in Caliendo, 2007). Ta se veže na vsako dvovijačno DNA, kar je prednost in hkrati tudi slabost, saj se veže tudi na nespecifične PCR-pridelke in dimere oligonukleotidnih začetnikov (Mackay, 2004). Specifičnost detekcije oz. razlikovanje med pomnožki lahko dosežemo z analizo krivulj temperature taljenja, ki se razlikujejo glede na dolžino, vsebnost GC in sekvenco pomnožka (Ririe in sod., 1997). Specifični pomnožki imajo značilne vrhove pri napovedljivi temperaturi taljenja (T_m), medtem ko imajo dimeri oligonukleotidnih začetnikov in nespecifični produkti drugačne T_m ali širše vrhove (Nolte in Caliendo, 2007). Levett in sod. (2005) so za detekcijo patogenih leptospir in razlikovanje teh od nepatogenih uporabili začetne oligonukleotide, s katerimi so pomnoževali gen za zunanji membranski protein LipL32. Temperature taljenja so bile med 82,5 in 86 °C, odvisno od vrste. Hiter in občutljiv test za molekularno detekcijo in identifikacijo patogenih leptospir v kliničnih vzorcih pa so razvili Merien in sod. (2005). Ti so na podlagi analize T_m pomnožkov lahko razlikovali med različnimi vrstami patogenih leptospir (slika 8).



Slika 8: Analiza temperature taljenja za patogene leptospire (Merien in sod., 2005).

PCR v realnem času je hitra in občutljiva metoda, pri kateri je zaradi zaprtega sistema možnost kontaminacije majhna. Glavna pomanjkljivost te tehnike pa so visoki začetni stroški in nezmožnost določevanja velikosti pomnožkov (Mackay, 2004).

2.6.4 Tipizacijske metode, ki temeljijo na določanju nukleotidnega zaporedja

Sekveniranje ali metoda določevanja nukleotidnega zaporedja je učinkovita metoda za identifikacijo bakterij. Metoda je postala cenejša in posledično tudi zanimivejša z uvedbo avtomatiziranih postopkov. Univerzalno tarčno zaporedje za identifikacijo bakterij je gen za 16S rRNA (Barken in sod., 2007). Analiza tega se je izkazala tudi pri identifikaciji izolatov leptospir. V GenBank so tako na voljo številne sekvene 16S rRNA različnih serovarov leptospir (Morey in sod., 2006), ker pa so te sekvene med vrstami leptospir zelo homologne, moramo za natančno opredelitev vrste sekvenirati večino gena za 16S rRNA. Alternativno tarčno zaporedje za opredelitev vrste leptospir je gen za podenoto B DNA giraze (*gyrB*) (Slack in sod., 2006).

2.6.4.1 Tipizacija zaporedij multiplih lokusov (angl. multilocus sequence typing, MLST)

Pri tej metodi primerjamo sekvene notranjih odsekov številnih t. i. hišnih genov (angl. housekeeping genes), katere najdemo pri vseh izolatih posamezne vrste. Hišni geni se skozi evolucijo počasi spreminjačo, zato so označeni kot visoko robustni markerji za

ugotavljanje daljnih in bližnjih prednikov (Singh in sod., 2006; Ahmed in sod., 2006). Ahmed in sod. (2006) so to metodo uporabili za opredelitev in genotipsko klasifikacijo patogenih leptospir. Za MLST analizo so izbrali šest genov: *adk* (adenilat kinaza), *icdA* (izocitrat dehidrogenaza), *LipL32* (zunanji membranski lipoprotein LipL32), *rrs2* (16S rRNA), *secY* (pred-protein translokaze, protein SecY), in *LipL41* (zunanji membranski lipoprotein LipL41). Ugotovili so, da je metoda enostavna in jo je ob uporabi avtomatskega sekvenatorja lahko standardizirati. Dobljene sekvence pa so nedvoumne, specifične in jih lahko brez težav primerjamo med laboratoriji ter jih shranjujemo v centralno bazo podatkov. Pomanjkljivost te metode je le, da je primerna predvsem za evolucijske študije, za kratkoročne študije pa bi bilo potrebno v analizo vključiti tudi gene, ki so pod večjim selekcijskim pritiskom kot hišni geni (npr. gene, ki nosijo zapis za virulenčne dejavnike) (Singh in sod., 2006).

3. MATERIALI IN METODE

V diplomski nalogi smo uporabili 42 izolatov leptospir namenjenih laboratorijskemu delu in 27 izolatov osamljenih iz humanih vzorcev, skupaj 69 izolatov. Vsakemu posameznemu izolatu smo določili vrsto in ga opredelili z imunskimi serumi.

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kulture leptospir, ki jih uporabljam za mikroaglutinacijski test (MAT)

V raziskavo smo vključili 42 kultur leptospir, ki jih na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani v Laboratoriju za diagnostiko boreloz in leptospiroze uporablja v diagnostične namene. Pridobili so jih iz Inštituta Pasteur (Pariz), Royal Tropical Institute (Amsterdam) in Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarske fakultete Sveučilišta v Zagrebu. Vse kulture leptospir v omenjenih laboratorijih uporablajo za rutinsko delo.

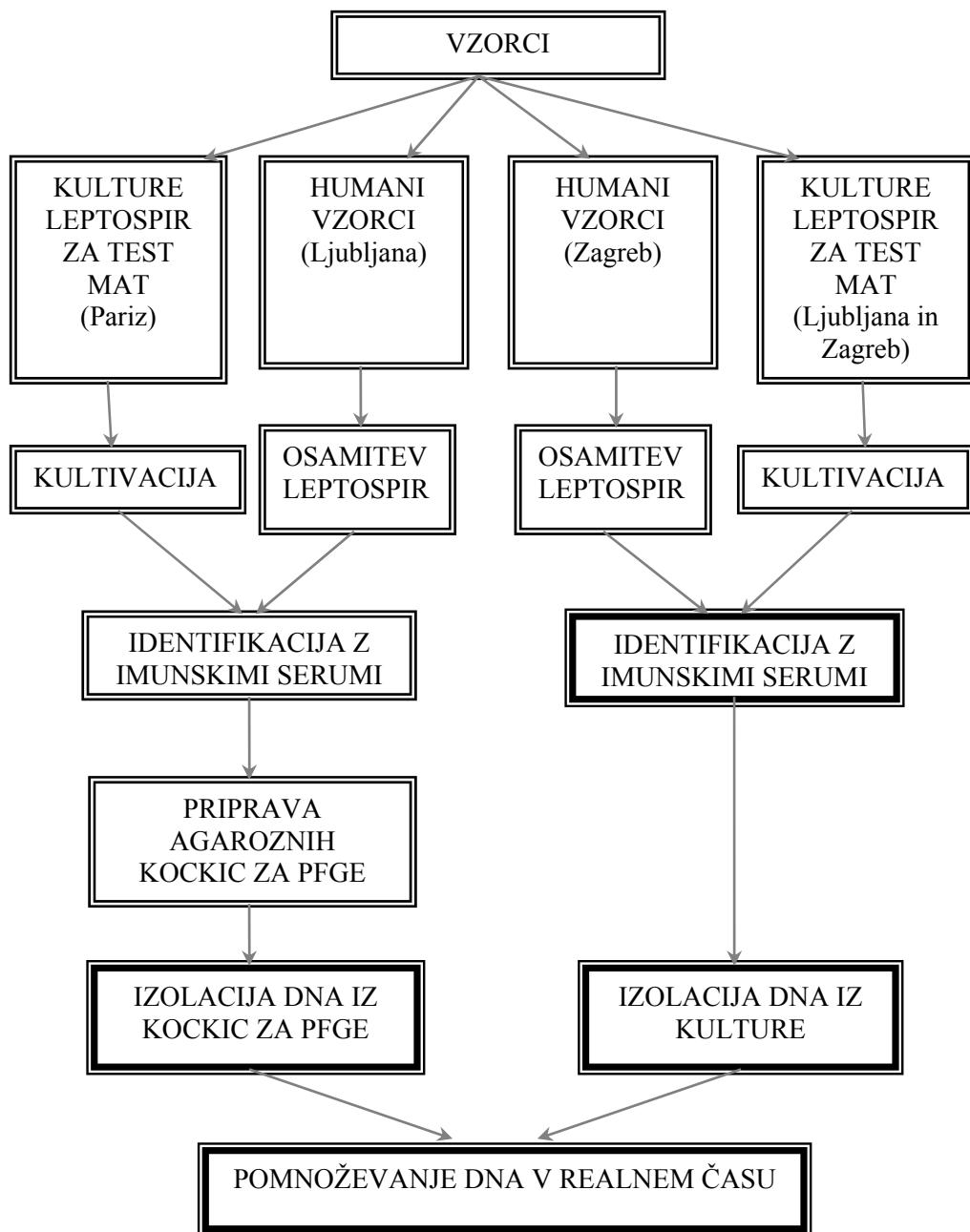
Pri delu smo uporabili sveže kulture leptospir iz Amsterdama in Zagreba nacepljene v gojišču EMJH, ki so bile tedensko precepljene. Kromosomska DNA leptospir iz Pariza, ki smo jo uporabili v raziskavi, pa je bila shranjena v agaroznih kockicah v hladilniku na + 4 °C.

3.1.2 Kulture leptospir izolirane iz humanih vzorcev

V nalogu smo vključili tudi 27 leptospir, ki so bile izolirane iz humanih vzorcev. Od teh so 9 izolatov osamili iz krvi bolnikov na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarske fakultete Sveučilišta v Zagrebu, v Laboratoriju za leptospire in 18 izolatov iz kliničnih vzorcev na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, v Laboratoriju za diagnostiko boreloz in leptospiroze od leta 2001 do 2006. Vzorce kužnine, ki so jo ob bolniku nacepili v gojišče, so poslali iz Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja Kliničnega centra v Ljubljani, Splošne bolnišnice v Celju ter iz Splošne bolnišnice Murska Sobota.

3.2 METODE

Slika 9 ponazarja potek raziskovalnega dela. Določeni koraki so bili narejeni že pred mojim prihodom, zato je moje neposredno delo na shemi poudarjeno. Natančneje so metode, ki smo jih med delom uporabili, predstavljene v spodnjih podpoglavljih.



Slika 9: Shema poteka dela.

3.2.1 Priprava gojišča EMJH

Gojišče EMJH (Ellinghausen McCullough modificirano po Johnson in Harris) smo pripravili tako, da smo 2,3 g Difco™ Leptospira Medium Base EMJH (preglednica 3) raztopili v 900 ml deionizirane vode. Raztopino smo nato avtoklavirali 15 min pri 121 °C. Po končanem avtoklaviranju smo gojišče ohladili na sobno temperaturo in mu aseptično dodali še 100 ml Difco™ Leptospira Enrichment EMJH, ki vsebuje albumin, polisorbat 80 in dodatne rastne faktorje za leptospire. Po 5 ml tako pripravljenega gojišče smo razdelili v epruvete preko filtra s premerom por 0,22 µm. Epruvete z gojiščem smo nato še inaktivirali s 30 min segrevanjem pri 56 °C. Sterilnost gojišča smo preverili tako, da smo gojišča inkubirali na 37 °C 24 ur.

Preglednica 3: Sestava gojišča Ellinghausen McCullough modificirano po Johnson in Harris (EMJH).

Kemikalija	Količina (g/l)
Na ₂ HPO ₄	1
KH ₂ PO ₄	0,3
NaCl	1
NH ₄ Cl	0,25
Tiamin	0,005

3.2.2 Osamitev leptospir iz kužnine bolnikov

Leptospire so bile osamljene iz krvi bolnikov, ki je bila odvzeta v prvem tednu bolezni pred uvedbo antibiotičnega zdravljenja. Medicinsko osebje je bolniku sterilno odvzelo kri in takoj cepilo 1 do 2 kapljici v 5 ml gojišča. Isto kužnino so nasadili v vsaj 5 gojiščnih epruvet in vzorce poslali v mikrobiološki laboratorij. V laboratoriju so vzorce inkubirali pri temperaturi 28 °C in jih pregledovali vsakih 5 do 7 dni z mikroskopiranjem v temnem polju.

3.2.3 Gojenje leptospir

Leptospire smo gojili v gojišču EMJH pri temperaturi 28 °C približno pet dni. Gostoto bakterij smo preverjali z mikroskopiranjem kapljice kulture v temnem polju. Opazovali smo gibljivost in preverili morebitno kontaminacijo kulture z drugimi bakterijami ali glivami. Ko je bila rast leptospir zadostna, smo epruvete shranili na sobni temperaturi. Kulture leptospir smo uporabili za opredelitev serološke skupine in izolacijo DNA za molekularno identifikacijo.

3.2.4 Identifikacija leptospir z imunskimi serumi

Neznane kulture leptospir, ki so bile izolirane iz kliničnih vzorcev, smo opredelili s pomočjo aglutinacije z imunskimi serumi ter jih nato na podlagi podatkov iz literature (Genomospecies serovar by serogroup, 2008) uvrstili še v genske skupine. Izolate smo identificirali tako, da smo vsako neznano kulturo testirali z vsemi imunskimi serumi iz zbirke Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo. Kultura leptospir je pripadala tisti serološki skupini, katere imunski serum je dosegel najvišji titer aglutinacije s testirano leptospiro.

Identifikacijo smo izvedli v dveh korakih. V prvem koraku smo naredili presejalno opredelitev z vsemi imunskimi serumi pri razredčini 1:400. Najprej smo pripravili razredčino imunskega serumov v razmerju 1:200 tako, da smo v epruveto odpipetirali 1990 µl fiziološke raztopine in 10 µl imunskega serumata in dobro premešali. Kulturo leptospir smo redčili s fiziološko raztopino v razmerju 1:1 (1 ml kulture leptospir + 1 ml fiziološke raztopine). V nadaljevanju smo v luknjici mikrotitrirne plošče zmešali 25 µl seruma razredčine 1:200 in 25 µl redčene kulture leptospir ter inkubirali 45 min do 1 h pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo 10 µl vsebine iz vsake luknjice nakapljali na objektno stekelce in reakcijo odčitali v temnem polju pri 160x povečavi. Vse imunske serume, pri katerih je prišlo do aglutinacije leptospir, smo redčili naprej.

V drugem koraku smo na mikrotitrirni ploščici označili po osem luknjic za vsak posamezen imunski serum. V vsako luknjico smo odpipetirali po 25 µl fiziološke raztopine. V prvo luknjico smo nato dali 25 µl seruma redčine 1:200, premešali in prenesli 25 µl v naslednjo in tako redčili do konca vrste. Na koncu smo v posamezne luknjice

dodali še 25 µl redčene kulture leptospir. Razredčine seruma so bile tako naslednje: luknja A 1:800, B 1:1600, C 1:3200, D 1:6400, E 1:12800, F 1:25600, G 1:51200 in H 1:102400. Mikrotitrirno ploščico smo inkubirali 45 min do 1 h pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo na objektno stekelce ponovno nakapljali 10 µl tekočine iz vsake vdolbinice mikrotitrirne plošče in mikroskopirali v temnem polju. Najvišji titer aglutinacije smo opredelili pri redčitvi, kjer je bilo 50 % zlepljenih in 50 % prostih leptospir.

Z imunskimi serumi smo preverili tudi aglutinacijske lastnosti že identificiranih leptospir, ki smo jih uporabili v nalogi.

3.2.5 Izolacija DNA v agaroznih kockicah

Za pripravo agaroznih kockic s kromosomske DNA leptospir so potrebovali vsaj 10 epruvet z leptospirami, ki so jih gojili v gojišču EMJH. Preden so vzorce združili, so vsako epruveto preverili v temnem polju zaradi morebitne kontaminacije. Kontaminirane vzorce so zavrgli. Združene vzorce so centrifugirali pri 10.000 obratih/min 10 min. Po končanem centrifugiranju so supernatant odlili, usedlino pa trikrat sprali s pufrom TN (preglednica 4). Koncentracijo leptospir so določili s spektrofotometrom.

Agarozne kockice so pripravili tako, da so 2% agarovi LMP (angl. low melting point, GIBCO) dodali pufer TN in jo raztopili s segrevanjem v mikrovalovni pečici. Raztopljeni agarovi so primešali enako količino vzorca in inkubirali pri 50 °C. Mešanico celic in agarove so nato nalili v modelčke in pustili v hladilniku 30 min, da se je agarova strdila. Strjene kockice agarove z leptospirami so potopili v pufer za lizo leptospir (preglednica 4) in inkubirali 24 ur pri 37 °C v stresalniku pri 80-100 obratih/min. Po enem dnevu so odstranili pufer za lizo in kockice sprali s pufrom TE (preglednica 4). Kasneje so kockice potopili še v pufer za digestijo (preglednica 4) in vse skupaj inkubirali na stresalniku 72 ur pri 50 °C. Sledilo je 5-kratno spiranje po eno uro s pufrom TE. Tako pripravljene kockice z izolirano čisto DNA leptospir so v pufru TE shranili v hladilniku pri + 4 °C za dalj časa.

Preglednica 4: Sestava uporabljenih pufrov.

Pufer	Sestavine
pufer TN	10 mM Tris/HCl (pH 7,6); 1 M NaCl
pufer za lizo leptospir	1 M NaCl; 20mM Tris/HCl (pH 8,0); 0,1 M EDTA; 0,5 % Brij58; 0,2 % Deoxycholate; 0,5 % N-laurylsarcosine; RNA-za 10 µg/ml; lizocim 1 mg/ml
pufer TE	10 mM Tris (pH 8,0); 10 mM EDTA
pufer za digestijo leptospir	20 mM Tris/HCl (pH 8,5); 466 mM EDTA, 1 % N-laurylsarcosine; proteinaza K 0,5 mg/ml

3.2.6 Izolacija DNA iz agaroznih kockic

Iz kockic, v katerih je bila že ekstrahirana DNA, smo ponovno izolirali nukleinsko kislino za nadaljnje delo. Kockico agaroze smo prerezali na pol, jo prenesli v mikrocentrifugirko in dodali 500 ml deionizirane vode. Vse skupaj smo inkubirali na rahlo stresajočem termomikserju 15 min pri 95 °C. Po inkubaciji smo vzorec dobro premešali in mikrocentrifugirko shranili v zmrzovalnik na - 20 °C.

3.2.7 Izolacija DNA iz kulture

Iz epruvete, v kateri smo gojili leptospire, smo prenesli 0,5-2 ml kulture v mikrocentrifugirko. Sledilo je centrifugiranje pri 14.000 obratih/min za 15 min. Po centrifugiranju smo odlili supernatant, usedlini pa dodali 500 µl vode. Vse skupaj smo dobro premešali in inkubirali v rahlo stresajočem termomikserju 15 min pri 99 °C. Po 15 min inkubaciji smo vzorce ponovno dobro premešali in jih shranili v zmrzovalnik na - 20 °C vsaj za eno uro.

3.2.8 Pomnoževanje DNA leptospir v realnem času

Za pomnoževanje DNA leptospir smo uporabili napravo LightCycler® 2,0 (Roche Applied Science, Mannheim, Nemčija), ki nam je omogočala sprotno analizo pomnožkov. Celotni postopek smo izvedli po nekoliko spremenjeni metodi, ki so jo razvili Merien in sod., (2005).

Pomnoževali smo 331-bp dolg fragment z oligonukleotidnima začetnikoma LEB1-F in LEB1-R (preglednica 5). Začetna oligonukleotida so nam po naročilu sintetizirali Tib Molbiol (Berlin, Nemčija).

Preglednica 5: Oligonukleotidni začetniki za pomnoževanje DNA leptospir.

Oznaka oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje
LEB1-F	5'- CATTGATTTCGAATCATTCAAA-3'
LEB1-R	5'-GGCCCAAGTTCTTCTAAAAG-3'

Za pripravo reakcijske mešanice smo uporabili komercialen komplet že pripravljenih reagentov LightCycler ® FastStart DNA Master SYBR Green I. Skupno reakcijsko zmes brez vzorca smo zmešali v sterilni mikrocentrifugirki v vrstnem redu, kot prikazuje preglednica 6.

Preglednica 6: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (za en vzorec).

Reagent	Začetna koncentracija	Končna koncentracija	Volumen [µl]
voda			5,8
MgCl ₂	25 mM	5 mM	3,2
začetni oligonukleotid LEB1-F	5 µM	0,5 µM	2
začetni oligonukleotid LEB1-R	5 µM	0,5 µM	2
LightCycler ® FastStart DNA Master SYBR Green I *	10x	1x	2
DNA vzorca	/	/	5
SKUPAJ			20

* LightCycler ® FastStart DNA Master SYBR Green I vsebuje: 1 mM MgCl₂, barvilo SYBR Green I, FastStart Taq DNA polimerazo, mešanica dNTP v kateri je dTTP zamenjan z dUTP.

Po 15 µl mešanice smo nato razdelili v steklene kapilare, ki smo jih predhodno postavili v hladilni blok, ki je ohranjal nizko temperaturo (+ 4 °C) in tako preprečil prehitro reakcijo med reagenti. Kapilaram z reakcijsko mešanicou smo v drugem prostoru dodali še 5 µl izolirane DNA, ki smo jo predhodno odtajali in temeljito premešali. Vsako kapilaro smo takoj po dodatku matrične DNA zaprli s pokrovčkom.

Za kontrolo kontaminacije smo pri vsakem eksperimentu vključili vsaj 3 negativne kontrole. Prvo kapilaro smo vedno zaprli takoj po dodatku reakcijske mešanice in nam je

služila kot kontrola mešanice. V sredinsko kapilaro smo dodali 5 µl prečiščene vode (kontrola reakcijske mešanice in vode), v zadnjo kapilaro pa smo dodali prečiščeno vodo v prostoru, kjer smo dodajali vzorce. Za preprečevanje kontaminacije smo ves čas sledili zapovedim dobre laboratorijske prakse (Poljak in sod., 1994).

Kapilare z vzorci smo iz hladilnega bloka prenesli v rotor in jih centrifugirali 15 s v LightCycler ® Carousel Centrifuge pri 3000 obratih/s. Nosilec s kapilarami smo nato vstavili v LightCycler (LC) in na računalniku potrdili izbran program. Pogoji, pri katerih je potekal PCR, so predstavljeni v preglednici 7.

Preglednica 7: Program za pomnoževanja in analizo pomnožkov

Stopnja		Temperatura	Čas	Število ciklov
začetna denaturacija		95 °C	10 min	1
pomnoževanje	denaturacija	95 °C	8 s	
	prileganje	60 °C	5 s	55
	podaljševanje	72 °C	12 s	
analiza temperatura taljenja		48-95 °C; 0,1 °C/s		1
ohlajanje		40 °C	30 s	1

Za vsak vzorec smo naredili več ponovitev.

3.2.8.1 Način detekcije

Količino nastalega produkta smo spremljali z meritvijo fluorescence pri valovni dolžini 530 nm. Za detekcijo pomožkov smo uporabili barvilo SYBR Green, ki se v fazi podaljševanja vgradi v dvovijačno DNA. Barvilo je ob dražljaju s svetlobo valovne dolžine 470 nm prešlo iz osnovnega v vzbujeno stanje in močno fluoresciralо. Količina fluorescence je bila prenosorazmerna količini nastale dvooverižne DNA, tako je z nastajanjem produktov naraščal tudi fluorescentni signal. LightCycler je meril povečanje fluorescence na koncu vsakega cikla pomnoževanja.

Po končanem pomnoževanju je takoj sledila še analiza temperature taljenja tako, da je LightCycler nepretrgoma meril fluorescenco med postopnim dviganjem temperature za 0,1

°C/s. Z višanjem temperature se je fluorescenza vzorca zmanjševala, zaradi sproščanja barvila SYBR Green I.

3.2.8.2 Analiza rezultatov

LightCycler nam je med pomnoževanjem sprotno meril signal fluorescence. Po zaključenem pomnoževanju smo dobljene rezultate analizirali s pomočjo programa LightCycler 4,05. Program nam je omogočil absolutno kvantifikacijo rezultatov ter analizo temperature taljenja. V okviru absolutne kvantifikacije nam je računalnik izrisal graf krivulje pomnoževanja, na katerem je bilo število ciklov nanešeno na os x in fluorescensa na osi y. Poleg vzorcev pa izpisal vrednost CP točk (angl. crossing point), ki so nam povedale, v katerem ciklu se je fluorescenza vzorca povzpela nad fluorescenco ozadja. Specifičnost pomnoženega produkta smo preverjali z analizo temperature taljenja (angl. melting temperature - Tm), tako smo lahko ločili dimere oligonukleotidnih začetnikov in morebitne kontaminacije od želenih produktov. Tm je opredeljen kot temperatura, pri kateri je polovica pomnožene DNA v enoverižni in polovica DNA v dvooverižni obliki. Odvisen je od dolžine sekvene in zaporedja nukleotidov.

Program je za vsak vzorec izrisal graf in določil Tm, na podlagi katerega smo potem ovrednotili vrsto leptospire v vzorcu po Merien in sod., (2005). Dva vzorca smo uvrstili v isto gensko skupino, če sta se krivulji temperature taljenja prekrivale. Za vsak sev smo naredili več ponovitev in izračunali povprečni Tm.

3.2.8.3 Redčenje kultur leptospir

Če po pomnoževanju DNA in analizi temperature taljenja nismo dobili specifičnih in ponovljivih rezultatov, smo izhodno kulturo leptospir redčili, tako da smo v novo gojišče odpipetirali 10 µl kulture leptospir, dobro premešali in razdelili 5-krat po 10 µl v nova gojišča. Po 4 tedenski inkubaciji oz. ko smo opazili rast leptospir, smo izolirali DNA iz vseh petih gojišč in ponovno pomnožili nukleinsko kislino v LC, kulture pa testirali z imunskimi serumi.

4 REZULTATI

Leptospire osamljene iz humanih vzorcev ali gojene v kulturi za potrebe diagnostike smo najprej opredelili serotipsko z imunskimi serumi. Z napravo LC smo nato pomnožili tarčno zaporedje DNA leptospir ter vzorce še na podlagi temperature taljenja uvrstili v genske skupine. Serotipsko in genotipsko opredelitev smo potem primerjali in ugotavljali ujemanje.

4.1 SEROTIPSKA OPREDELITEV

Z imunskimi serumi smo testirali vseh 69 vzorcev. Od tega smo 65/69 vzorcev (94,2 %) lahko opredelili do serološke skupine, ostale 4 vzorce pa smo zaradi nejasnih rezultatov označili kot neopredeljeni sevi (preglednica 8). Največ vzorcev (16/69) smo uvrstili v serološko skupino Icterohaemorrhagiae.

Preglednica 8: Rezultati serotipizacije z imunskimi serumi

	Serološka skupina, serovar	Št. kultur za test MAT	Št. sevov izolirani iz humanih vzorcev	Št. vseh vzorcev
Z IMUNSKIMI SERUMI OPREDELJENI SEVI	Canicola, Canicola	3		3
	Pomona, Pomona	3	2	5
	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni	2		2
	Icterohaemorrhagiae, Icterohaemorrhagiae	1	13	14
	Australis, Australis	3	1	4
	Autumnalis, Autumnalis	2		2
	Pyrogenes, Pyrogenes	2		2
	Bataviae, Bataviae	3	1	4
	Sejroe, Hardjo	1		1
	Sejroe, Sejroe	2	3	5
	Tarassovi, Tarassovi	1		1
	Ballum, Castellonis	1		1
	Ballum, Ballum	1		1
	Javanica, Javanica	1		1
	Javanica, Poi	1		1
	Grippotyphosa, Grippotyphosa	3	4	7
	Cynopteri, Cynopteri	2		2
	Panama, Panama	1		1
	Javanica, Sofia		2	2
	Semaranga, Patoc	6		6
Z IMUNSKIMI SERUMI NEOPREDELJENI SEVI		3	1	4
Skupaj		42	27	69

4.2 GENOTIPSKA OPREDELITEV

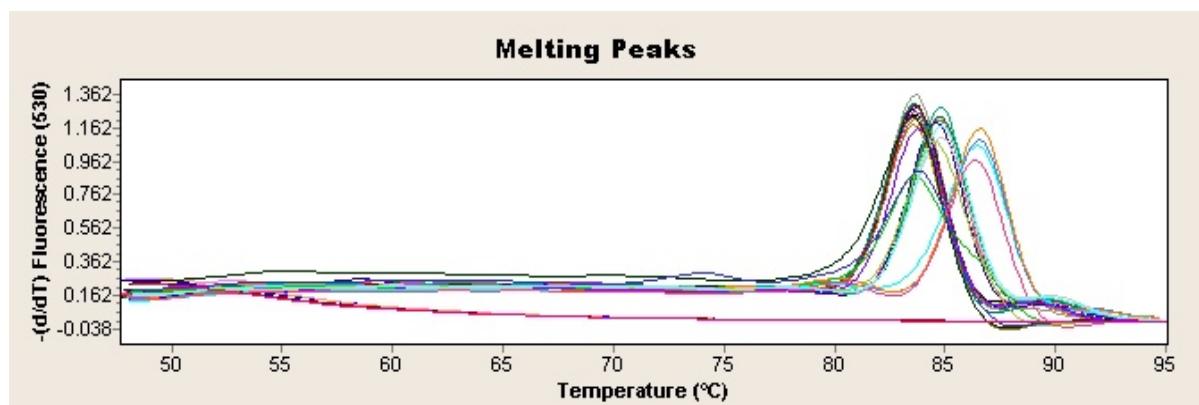
Po pomnoževanju vzorcev v napravi LightCycler 2.0 smo glede na temperaturo taljenja (T_m) opredelili 63/69 (91,3 %) vzorcev, ki smo jih razporedili v 6 genskih skupin. Zaradi neznačilnih temperatur taljena pa nismo mogli opredeliti 6 (8,7 %) sevov leptospir (preglednica 9).

Preglednica 9: Rezultati genotipizacije in povprečne temperature taljenja pomnožkov za posamezno gensko skupino.

	Genska skupina	Št. kultur za test MAT	Št. sevov izolirani iz humanih vzorcev	Št. vseh vzorcev	Povprečna temperatura taljenja (T_m)
OPREDELJENI SEVI	<i>L. interrogans</i> sensu stricto	21	16	37	$83,78 \pm 0,33$ °C
	<i>L. borgpetersenii</i>	8	3	11	$86,49 \pm 0,21$ °C
	<i>L. kirshneri</i>	5	6	11	$84,62 \pm 0,2$ °C
	<i>L. noguchi</i>	1	/	1	$84,99 \pm 0,07$ °C
	<i>L. meyeri</i>	/	2	2	$86,33 \pm 0,14$ °C
	<i>L. biflexa</i>	1	/	1	$83,98 \pm 0,31$ °C
NEOPREDELJENI SEVI		6	/	6	
Skupaj		42	27	69	

Pri patogenih leptospirah so bile temperature taljenja v območju od 82,02 °C do 86,90 °C. Najnižji povprečni T_m so imele leptospire iz vrste *L. interrogans* sensu stricto (83,76 °C), najvišji pa smo opazili pri izolatih, ki smo jih opredelili kot *L. borgpetersenii* (86,54 °C). Z oligonukleotidnimi začetniki LEB1-F in LEB1-R se nam je pomnožila tudi DNA nepatogenih leptospir iz vrste *L. biflexa* s T_m 83,98 °C. Slika 10 prikazuje značilne krivulje temperature taljenja za tri različne vrste.

Naši rezultati pomnoževanja in temperature taljenja za posamezne vrste so primerljivi z objavljenimi rezultati Merien in sod. (2005) z izjemo *L. biflexa*, ki se z uporabljenimi oligonukleotidnimi začetniki ne bi smela pomnoževati.



Slika 10: Analiza temperature taljenja pomnožkov za patogene leptospire iz vrst (od leve proti desni) *L. interrogans* sensu stricto ($T_m = 83,8\text{ }^{\circ}\text{C}$), *L. kirshneri* ($T_m = 84,6\text{ }^{\circ}\text{C}$) in *L. borgpetersenii* ($T_m = 86,5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

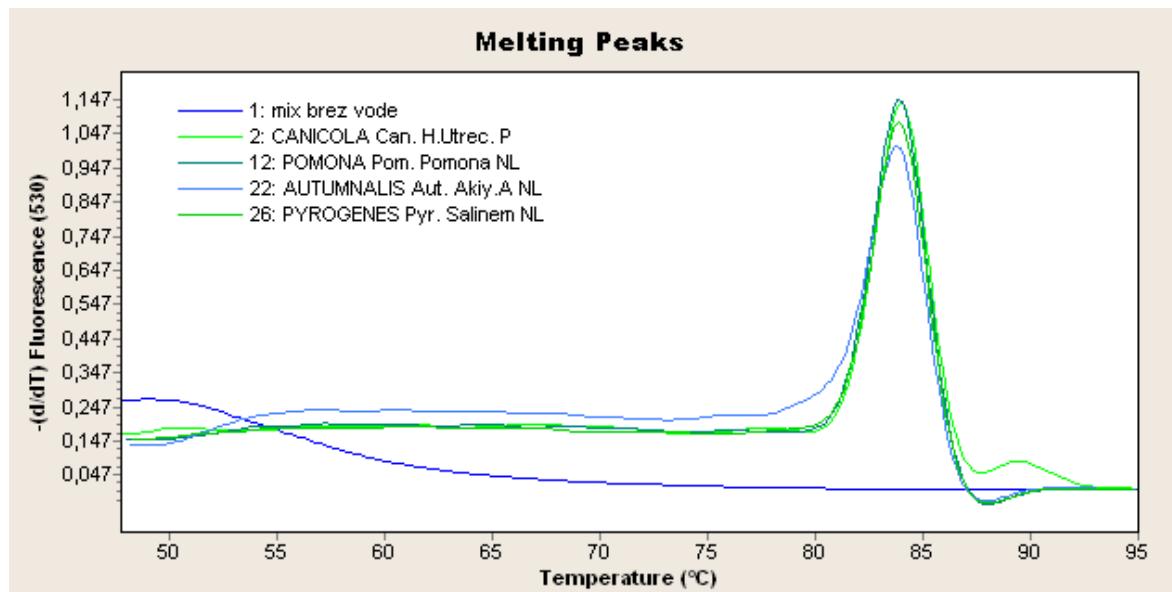
4.3 PRIMERJAVA SEROTIPSKE IN GENOTIPSKE OPREDELITVE

Primerjava serotipske in genotipske opredelitve, kot je to opisano v literaturi (Genomospecies serovar by serogroup, 2008), je pokazala ujemanje pri 58 od 69 vzorcih (84,1 %). Pri 11/69 (15,9 %) vzorcih pa se serotipska opredelitev ni ujemala z genotipsko določeno vrsto, zato bi morali te vzorce še dodatno analizirati.

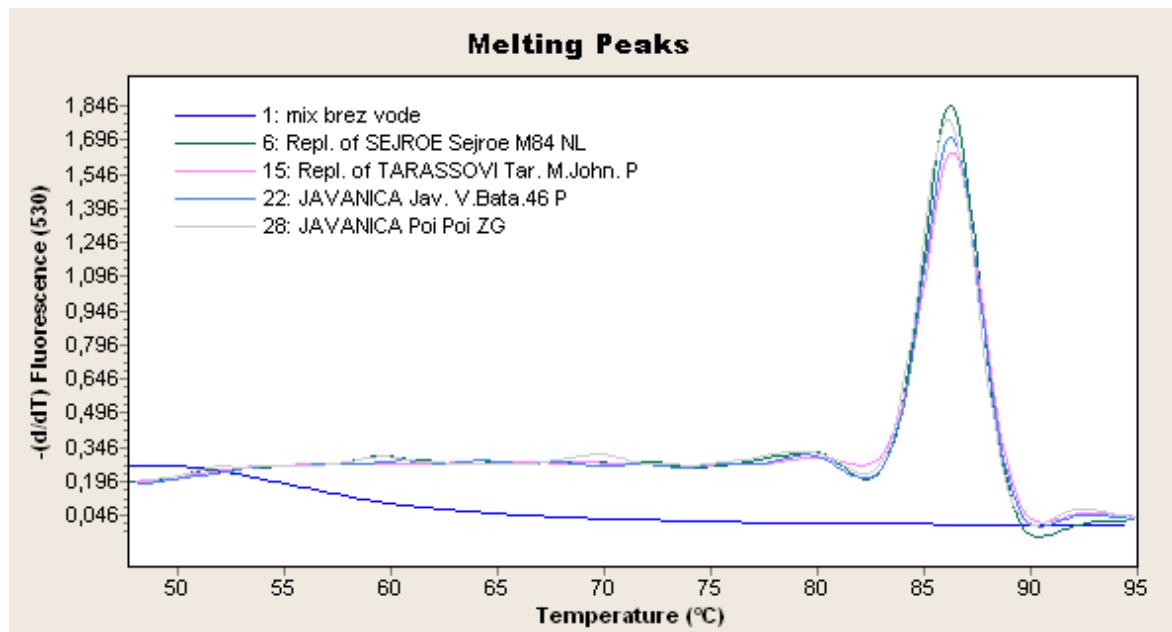
4.3.1 Opredeljeni vzorci

Rezultate vseh 58 izolatov, pri katerih se je serotipizacija in genotipizacija skladala, smo zbrali v preglednicah po genskih skupinah (priloga A-C). Večina leptospir [35/58 (60,3 %)] je pripadala vrsti *L. interrogans* sensu stricto; sem smo uvrstili tudi največ izolatov iz kliničnih vzorcev [16/25 (64 %)]. Vrsto *L. borgpetersenii* smo določili v 10 (17,2 %) vzorcih, od tega so bili 3 humani izolati in *L. kirshneri* v 9 vzorcih (4 humani izolati). Po eden vzorec je pripadala *L. noguchi* in *L. biflexa*. V *L. meyeri* pa smo uvrstili samo dva humana izolata.

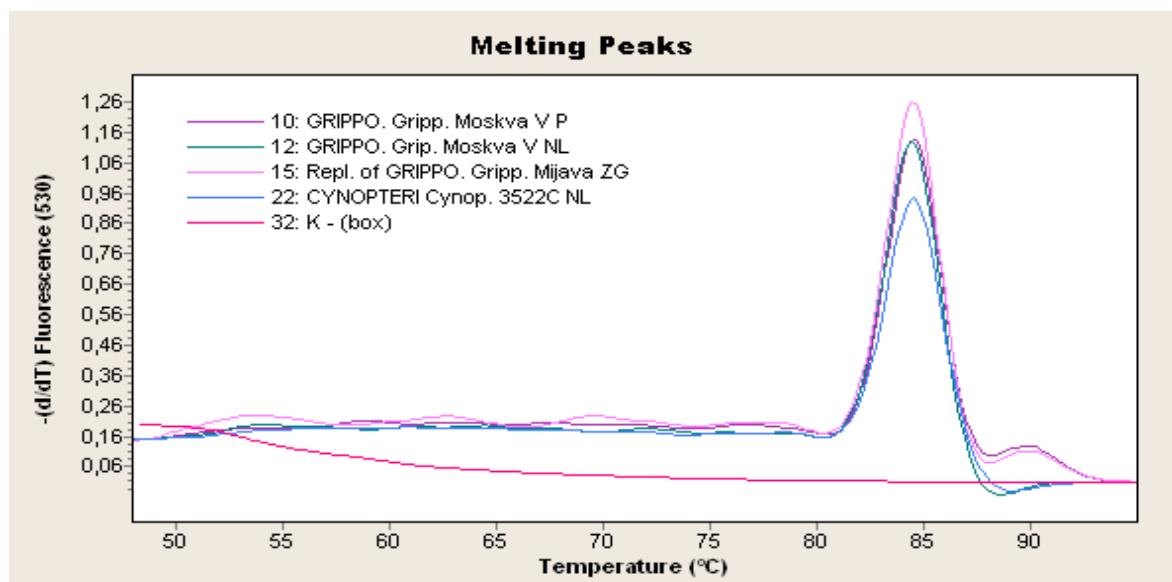
Slike 11-14 prikazujejo ujemanje krivulj temperatur taljenja za vzorce, ki spadajo v isto gensko skupino, čeprav pripadajo različnim serološkim skupinam.



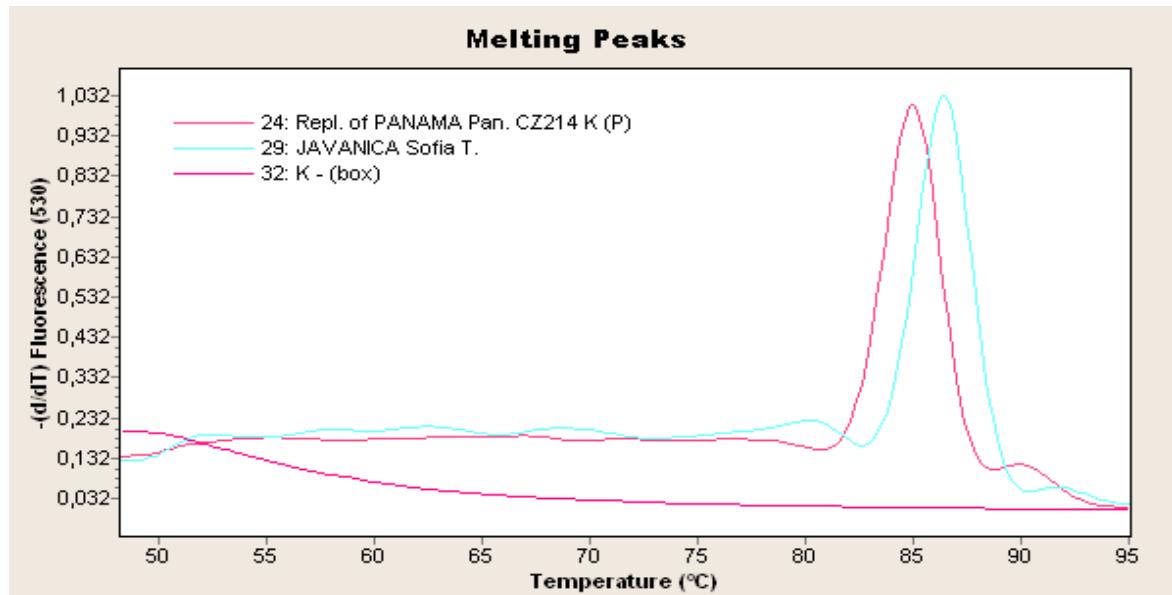
Slika 11: Analiza temperature taljenja pomnožkov za patogene leptospire iz vrste *L. interrogans* sensu stricto ($T_m = 83,8 \text{ } ^{\circ}\text{C}$). Vzorci: 1 - negativna kontrola; 2 – Canicola, Canicola, Hond Utrecht IV (Pariz); 12 – Pomona, Pomona, Pomona (Nizozemska); 22 – Autumnalis, Autumnalis, Akiyami A (Nizozemska); 26 – Pyrogenes, Pyrogenes, Salinem (Nizozemska); št. 1, 2, 12, 22, 26 označujejo mesta v rotorju, na katerih so bile kapilare s PCR mešanico.



Slika 12: Analiza temperature taljenja pomnožkov za patogene leptospire iz vrste *L. borgpetersenii* ($T_m = 86,5 \text{ } ^{\circ}\text{C}$). Vzorci: 1 – Sejroe, Sejroe, M84 (Nizozemska); 15 – Tarassovi, Tarassovi, Mitis Johnson (Pariz); 22 – Javanica, Javanica, Veldart Batavia 46 (Pariz); 28 – Javanica, Poi, Poi (Zagreb); št. 1, 6, 15, 22, 28 označujejo mesta v rotorju, na katerih so bile kapilare s PCR mešanico.



Slika 13: Analiza temperature taljenja pomnožkov za patogene leptospire iz vrste *L. kirshneri* ($T_m = 84,6$ °C). Vzorci: 10 – Grippotyphosa, Grippotyphosa, Moskva V (Pariz); 12 – Grippotyphosa, Grippotyphosa, Moskva V (Nizozemska); 15 – Grippotyphosa, Grippotyphosa, Mijava (Zagreb); 22 – Cynopteri, Cynopteri, 3522C (Nizozemska); 32 – negativna kontrola; št. 10, 12, 15, 22, 32 označujejo mesta v rotorju, na katerih so bile kapilare s PCR mešanico.



Slika 14: Analiza temperature taljenja pomnožkov za vrsto *L. noguchi* ($T_m = 85$ °C) in *L. biflexa* ($T_m = 84$ °C). Vzorci: 24 - *L. noguchi* – Panama, Panama, CZ214K (Pariz); 29 - *L. biflexa* – Javanica, Sofia, T (T je začetnica priimka bolnika); 32 – negativna kontrola; št. 24, 29, 32 označujejo mesta v rotorju, na katerih so bile kapilare s PCR mešanico.

4.3.2 Neopredeljeni vzorci

Pri 11 vzorcih leptospir se ime seva, serotipska in genotipska opredelitev niso ujemale, zato smo te izolate aglutinirali z vsemi imunskimi serumi iz zbirke in jih večkrat genotipsko opredelili.

4.3.2.1 Vzorci, ki jih je potrebno dodatno opredeliti

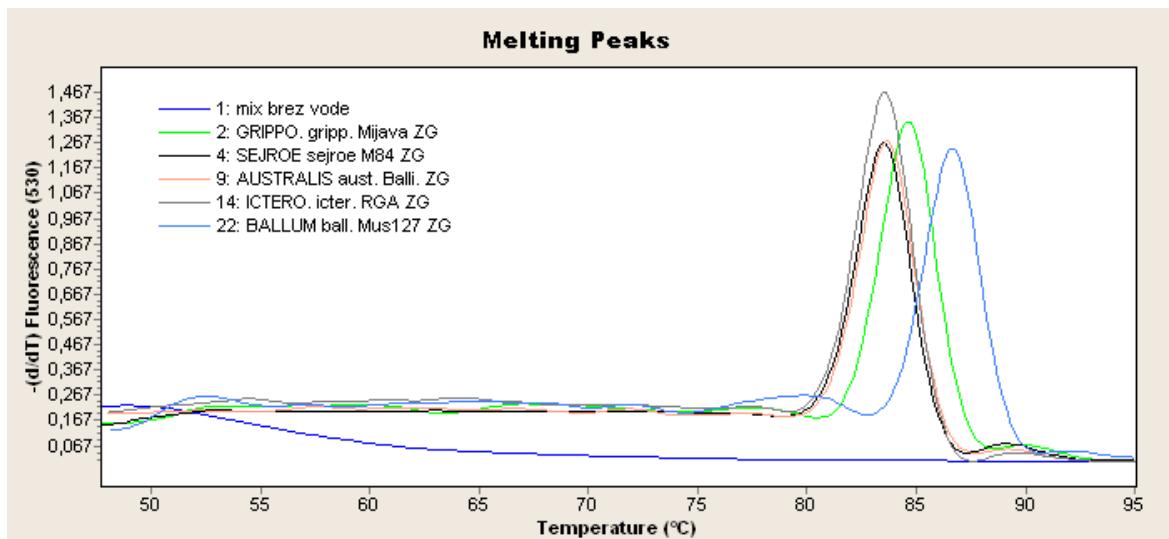
Pri 3 leptospirah iz Zagreba se oznaka seva in temu pripadajoča vrsta iz literature (Genomospecies serovar by serogroup, 2008) ni ujemala z vrsto, ki smo jo določili s pomočjo LC. Te seve smo zato aglutinirali z vsemi imunskimi serumi, ki smo jih imeli v zbirki. Serotipska in genotipska opredelitev se je razlikovala tudi pri humanem izolatu ŠŽ 242/02. Pri sevu KB 185/02 pa identifikacija z imunskimi serumi ni bila mogoča zaradi slabe rasti leptospir v kulturi. Oba izolata smo uvrstili v vrsto le na podlagi analize temperature taljenja. Rezultati so podani v nadaljevanju.

Vzorec 1: kulturo z oznako Sejroe, Sejroe, M84 smo na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo (IMI) dobili iz Veterinarske fakultete v Zagrebu.

Opredelitev z imunskimi serumi: sev ni aglutiniral z nobenim imunskim serumom iz zbirke IMI.

Opredelitev po LC: *L. interrogans* sensu stricto.

Glede na oznako Sejroe, Sejroe, M84 bi moral ta sev pripadati vrsti *L. borgpetersenii* s Tm 86,5 °C, vendar je bil Tm seva 83,5 °C, kar ni značilno za to vrsto. Iz slike 15 je razvidno, da sev res ne pripada *L. borgpetersenii* ampak *L. interrogans* sensu stricto. Ker smo želeli izključiti morebitno pomoto pri označevanju sevov, smo ponovno zaprosili Veterinarsko fakulteto v Zagrebu za kulturo. Ponovno smo dobili sev z imenom Sejroe, Sejroe, M84. Rezulati so bili enaki kot pri primarni analizi. Za nadaljnjo identifikacijo bi morali razširiti paleto imunskih serumov in sev serološko opredeliti.



Slika 15: Analiza temperature taljenja pomnožkov za sev Sejroe, Sejroe, M84 (Zagreb), vrsto *L. interrogans* sensu stricto [seva Australis, Australis, Ballico (Zagreb) in Icterohaemorrhagiae, Icterohaemorrhagiae, RGA (Zagreb)], *L. borgpetersenii* [sev Ballum, Ballum, Mus 127 (Zagreb)] in *L. kirshneri* [sev Grippotyphosa Grippotyphosa, Mijava (Zagreb)]. Št. 1, 2, 4, 9, 14, 22 označujejo mesta v rotorju, na katerih so bile kapilare s PCR mešanico.

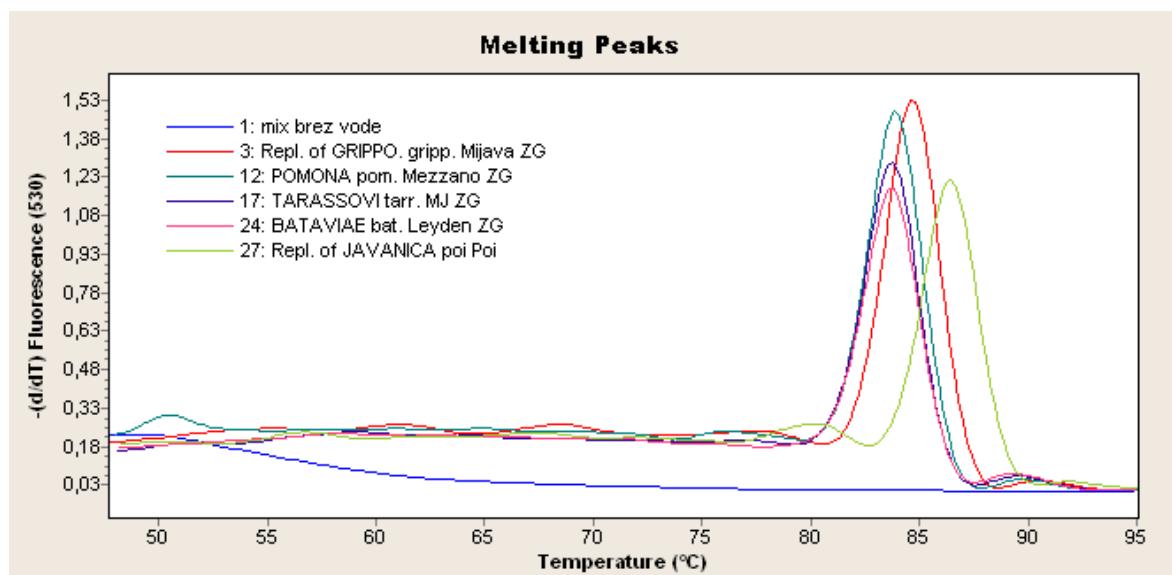
Vzorec 2: kulturo z oznako Tarassovi, Tarassovi, Mitis Johnson smo na IMI dobili iz Veterinarske fakultete v Zagrebu.

Opredelitev z imunskimi serumi: sev ni aglutiniral z nobenim imunskim serumom iz zbirke IMI.

Opredelitev po LC: *L. interrogans* sensu stricto.

Tudi ta sev bi moral glede na oznako pripadati vrsti *L. borgpetersenii* ($T_m = 86,5 \text{ } ^\circ\text{C}$), kar pa se ni ujemalo s T_m seva, ki je bil $83,7 \text{ } ^\circ\text{C}$. Z LC smo tako vzorec 2 opredelili kot *L. interrogans* sensu stricto, ker se je krivulja temperature taljenja najbolj skladala s krivuljama sevov Pomona, Pomona, Mezzano (Zagreb) in Bataviae, Bataviae, Lyden (Zagreb). Ta dva seva pa pripadata vrsti *L. interrogans* sensu stricto (slika 16).

Tudi v tem primeru smo hoteli izključiti napako pri označitvi seva in smo zato ponovno zaprosili Veterinarsko fakulteto v Zagrebu za nov vzorec. Dobili smo sev z enakim imenom, tudi ta sev je po genotipski opredelitvi pripadal vrsti *L. interrogans* sensu stricto. Vzorec 2 bi bilo zato potrebno dodatno serološko opredeliti znotraj vrste *L. interrogans* sensu stricto z večimi imunskimi serumi.



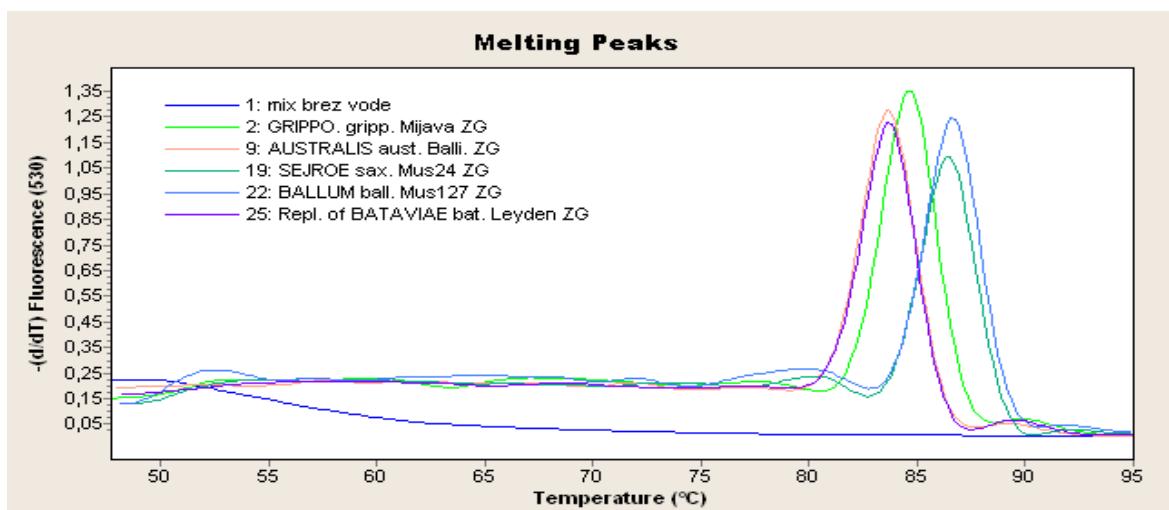
Slika 16: Analiza temperature taljenja pomnožkov za sev Tarassovi, Tarassovi, Mitis Johnson (Zagreb), vrsto *L. interrogans* sensu stricto [seva Pomona, Pomona, Mezzano (Zagreb) in Bataviae, Bataviae, Leyden (Zagreb)], *L. borgpetersenii* [sev Javanica, Poi, Poi (Zagreb)] in *L. kirshneri* [sev Grippotyphosa, Grippotyphosa, Mijava (Zagreb)]. Št. 1, 3, 12, 17, 24, 27 označujejo mesta v rotorju, na katerih so bile kapilare s PCR mešanico.

Vzorec 3: kulturo z oznako Sejroe, Saxkoebing, Mus24 smo na IMI dobili iz Veterinarske fakultete v Zagrebu.

Opredelitev z imunskimi serumi: sev je aglutiniral z imunskim serumom za Sejroe, Saxkoebing, Mus24 in Sejroe, Sejroe, M84.

Opredelitev po LC: *L. borgpetersenii*.

Glede na oznako bi moral vzorec 3 pripadati vrsti *L. interrogans* sensu stricto s Tm 83,8 °C, vendar je imel ta sev povprečni Tm 86,4 °C. Iz slike 17 je razvidno, da vzorec 3 pripada *L. borgpetersenii* in ne *L. interrogans* sensu stricto, kot smo sprva pričakovali. Tudi pri tem vzorcu smo izključili možnost napake pri označitvi seva. Menimo, da bi bilo potrebno sev analizirati s širšo paleto imunskih serumov preden bi vrsti *L. borgpetersenii* prišeli tudi serološko identificiran sev Sejroe, Saxkoebing, Mus24, ki po podatkih iz literature sploh ne pripada tej vrsti.

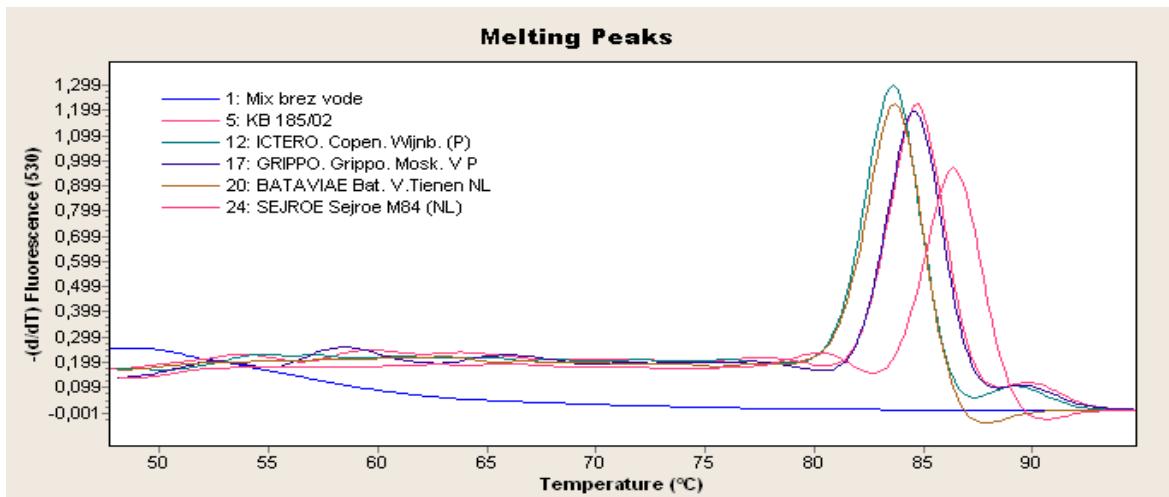


Slika 17: Analiza temperature taljenja pomnožkov za sev Sejroe, Saxkoebing, Mus24 (Zagreb), vrsto *L. borgpetersenii* [sev Ballum, Ballum, Mus127 (Zagreb)], *L. interrogans* sensu stricto [seva Australis, Australis, Ballico (Zagreb) in Bataviae, Bataviae, Leyden (Zagreb)] in *L. kirshneri* [sev Grippotyphosa, Grippotyphosa, Mijava (Zagreb)]. Št. 1, 2, 9, 19, 22, 25 označujejo mesta v rotorju, na katerih so bile kapilare s PCR mešanico.

Vzorec 4: KB 185/02 so osamili iz humanega vzorca na IMI.

Opredelitev z imunskimi serumi: ni bila mogoča zaradi slabe rasti kulture.

Opredelitev po LC: *L. kirshneri*.



Slika 18: Analiza temperature taljenja pomnožkov za izolat KB 185/02, vrsto *L. kirshneri* [sev Grippotyphosa, Grippotyphosa, Moskva V (Pariz)], *L. borgpetersenii* [sev Sejroe, Sejroe, M84 (Nizozemska)] in *L. interrogans* sensu stricto [seva Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Wijnberg (Pariz) in Bataviae, Bataviae, Van Tienen (Nizozemska)]. Št. 1, 5, 12, 17, 20, 24 označujejo mesta v rotorju, na katerih so bile kapilare s PCR mešanico.

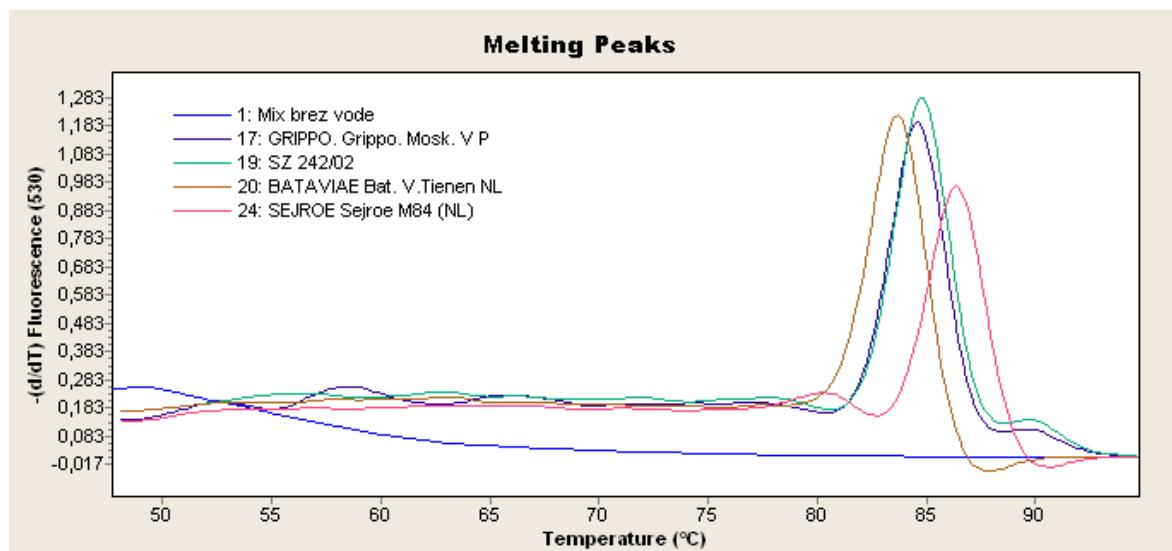
Vzorec 4 smo lahko opredelili samo z molekularnimi metodami. Njegov povprečni Tm je bil 84,8 °C. Ker se je njegova krivulja temperature taljenja prekrivala s krivuljo leptospir iz vrste *L. kirshneri*, smo izolat umestili v *L. kirshneri* (slika 18). Za natančnejšo identifikacijo bi bilo potrebno ta izolat naprej kultivirati in ga še serološko opredeliti, ker imamo znotraj vrste *L. kirshneri* več serološko različnih leptospir.

Vzorec 5: ŠŽ 242/02 so osamili iz bolnikove krvi na IMI.

Opredelitev z imunskimi serumi: izolat je aglutiniral z imunskim serumom Bataviae, Bataviae, Van Tienen.

Opredelitev po LC: *L. kirshneri*.

Na podlagi serološke opredelitve bi moral ta izolat pripadati vrsti *L. interrogans* sensu stricto, ki ima povprečni Tm 83,8 °C. Ker pa je bil Tm izolata 84,8 °C, smo ga na podlagi njegove krivulje temperature taljenja uvrstili v *L. kirshneri* in ne *L. interrogans* sensu stricto, kot smo sprva pričakovali (slika 19). Zaradi neskladja med serotipizacijo in genotipizacijo menimo, da je potrebno izolat dodatno analizirati s širšo paleto imunskeih serumov in ga tako natančno opredeliti do serološke skupine.



Slika 19: Analiza temperature taljenja pomnožkov za izolat ŠŽ 242/02, vrsto *L. kirshneri* [sev Grippotyphosa, Grippotyphosa, Moskva V (Pariz)], *L. borgpetersenii* [sev Sejroe, Sejroe, M84 (Nizozemska)] in *L. interrogans* sensu stricto [sev Bataviae, Bataviae, Van Tienen (Nizozemska)]. Št. 3, 6, 7, 23 označujejo mesta v rotorju, na katerih so bile kapilare s PCR mešanico.

4.3.2.2 Vzorci, ki niso imeli specifičnih temperatur taljenja

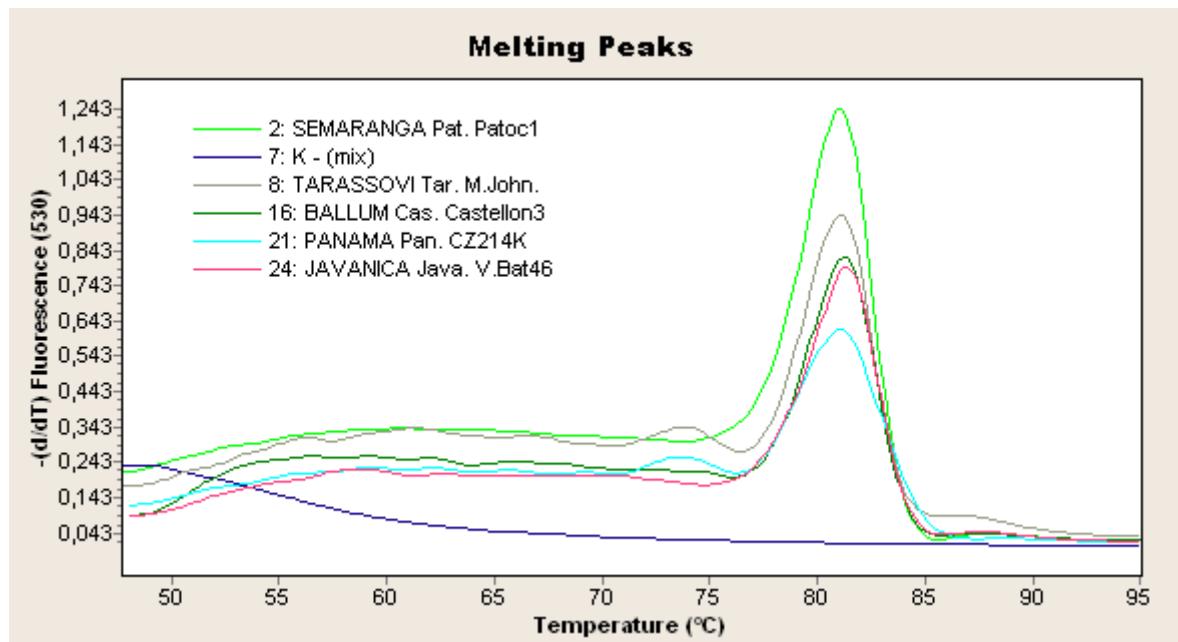
Pri 6 vzorcih (preglednica 10) po pomnoževanju DNA v LC in po analizi temperature taljenja nismo dobili ponavljajočih se rezultatov, ampak so temperature taljenja pri vseh varirale od 81 do 86 °C. Sklepali smo, da kulture niso čiste, zato smo jih redčili, kot je opisano v materialih in metodah.

Kot je prikazano v preglednici 10, smo dobili čisto kulturo le pri enem vzorcu, in sicer Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Wijnberg (Nizozemska). Pomnožki so po dodelavi imeli značilno krivuljo temperature taljenja z vrhom pri 83,47 °C, zato smo vzorec uvrstili v *L. interrogans* sensu stricto.

Pri ostalih 5 vzorcih so imeli pomožki zelo nizke temperature taljenja (okoli 81 °C), ki niso značilne za patogene leptospire (slika 20). Kulture smo testirali tudi z vsemi petnajstimi imunskimi serumi, ki smo jih imeli v zbirkni IMI. Vse leptospire so aglutinirale samo z imunskim serumom za Semeranga, Patoc (preglednica 10). Iz rezultatov genotipizacije in serotipizacije smo zaključili, da so v teh vzorcih nepatogene leptospire.

Preglednica 10: Rezultati genotipizacije in serotipizacije pred in po redčitvah izhodnih kultur.

Ime seva	pred redčitvijo		po redčitvi	
	Tm [°C]	Tm [°C]	Aglutinacija z imunskim serumom	Vrsta
ICTERO., Copenhageni, Wijnberg (Nizozemska)	82,01 - 86,73	83,47	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni	<i>L. interrogans</i> sensu stricto
TARASSOVI, Tarassovi, Mitis Johnson (Nizozemska)	81,85 - 86,76	81,37	Semaranga, Patoc	/
BALLUM, Castellonis, Castellon 3 (Nizozemska)	80,45 – 84,5	81,45	Semaranga, Patoc	/
JAVANICA, Javanica, Veldart Batavia 46 (Nizozemska)	81,46 - 86,64	81,25	Semaranga, Patoc	/
PANAMA, Panama, CZ214 K (Nizozemska)	83,66 - 84,95	81,48	Semaranga, Patoc	/
SEMARANGA, Patoc, Patoc 1 (Nizozemska)	81,1 – 86,75	81,38	Semaranga, Patoc	/



Slika 20: Analiza temperature taljenja pomnožkov po redčitvi kultur. Vzorci: 2 - Semaranga, Patoc, Patoc 1 (Nizozemska), 8 – Tarassovi, Tarassovi, Mitis Johnson (Nizozemska), 16 - Ballum, Castellonis, Castellon 3 (Nizozemska), 21 - Panama, Panama, CZ214 K (Nizozemska), 24 – Javanica, Javanica, Veldart Batavia 46 (Nizozemska) in 7 – negativna kontrola.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Fenotipsko klasifikacijo leptospir, pri kateri je osnovna enota serovar, danes zamenjuje genotipska, ki leptospire deli na vrste. Tako danes 17 vrst leptospir zajema vse serovare. Molekularna klasifikacija velikokrat predstavlja problem za zdravnike, saj je nezdružljiva s sistemom seroloških skupin in serovarov, ki je medicini dobro služil veliko let. Prav tako prihaja do zmešnjave v nomenklaturi (Levett, 2001).

Opisanih je bilo že veliko tipizacijskih metod za opredelitev leptospir, vendar so v večini primerov te metode zahtevne, časovno zamudne in predrage, da bi se jih lahko posluževala večina rutinskih laboratoriјev (Ružić-Sabljić, 2005). V tej diplomski nalogi smo primerjali dve metodi za opredelitev leptospir, fenotipsko in genotipsko. Fenotipsko smo leptospire opredelili na podlagi antigenske sestave z metodo aglutinacije z imunskimi serumi, s katero smo lahko seve uvrstili v serološke skupine (serotipizacija). Molekularno pa smo seve opredelili do vrste z metodo PCR v realnem času, pri kateri smo pomnožke na koncu analizirali s pomočjo krivulje temperature taljenja.

Zanimalo nas je, katera od uporabljenih metoda je boljša in bolj uporabna pri vsakdanjem delu, ter ali se serotipska in genotipska opredelitev med seboj ujemata, kot je to opisano v literaturi (Genomospecies serovar by serogroup, 2008). Predvsem smo želeli ovrednotiti pomen PCR v realnem času z analizo krivulj temperature taljenja v primerjavi s tradicionalno serološko opredelitvijo. Metoda PCR v realnem času z uporabo tehnologije SYBR Green I namreč velja za enostavno, specifično in hitro (Merien in sod., 2005). Glaven predpogoj za uspešno pomnoževanje je predhodno dobro poznavanje nukleotidnega zaporedja vsaj enega dela bakterijskega genoma, kar nam omogoča pravilno izbiro tarčne sekvene in oligonukleotidnih začetnikov. Poleg tega moramo poskrbeti, da reakcija pomnoževanja poteka v optimalnih pogojih, ki jih zagotovimo z ustrezno količino reagentov v reakcijski mešanici, avtomatsko nastavljivo optimalnih temperatur znotraj enega cikla in z ustreznim številom ciklov (Poljak in sod., 1994).

Serotipsko in genotipsko metodo smo testirali na 69 izolatih leptospir, od teh se 42 izolatov uporablja v diagnostične namene, 27 izolatov leptospir pa je bilo osamljenih iz humanih vzorcev.

5.1.1 Serotipska opredelitev

Najprej smo vse zbrane vzorce leptospir opredelili serotipsko z imunski serumi (preglednica 8), ki smo jih imeli v zbirki na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo. Vzorec je pripadal tisti serološki skupini, pri kateri je imunski serum dosegel najvišji titer aglutinacije s testirano leptospiro. Na ta način smo lahko opredelili večino vzorcev (65/69 oz. 94,2 %). Zastopanost posameznih seroloških skupin prikazuje preglednica 8. Največ vzorcev (16/69) smo uvrstili v serološko skupino Icterohaemorrhagiae. Od teh je bilo 13 humanih izolatov. Pri humanih izolatih serološki skupini Icerohaemorrhagiae po številu vzorev sledita Grippotyphosa in Sejroe.

Serološko neopredeljeni so ostali 4 vzorci, 1 humani izolat in 3 vzorci za test MAT (preglednica 8). Pri dveh sevih [kulturi z imenom Tarassovi, Tarassovi, Mitis Johnson (Zagreb) in Sejroe, Sejroe, M84 (Zagreb)] nabor imunskeih serumov, ki smo ga imeli na razpolago, ni bil dovolj velik, saj leptospire niso aglutinirale z nobenim imunskim serumom. V teh dveh primerih bi morali razširiti paleto imunskeih serumov in ponoviti test aglutinacije. Pri humanem izolatu KB 185/02 opredelitev ni bila mogoča zaradi slabe rasti kulture. Za izvedbo serološke opredelitve pa potrebujemo približno 2×10^8 leptospir na ml (International Committee on Systematic Bacteriology, 1984), zato bi morali nadaljevati kultiviranje do želene gostote. Razlogi slabe rasti leptospir so različni, leptospire se mogoče niso prilagodile na rast v umetnem mediju ali pa je bil bolnik pred odvzemom vzorca že na antibiotični terapiji.

Pri sevu z oznako Sejroe, Saxkoebing, Mus24 smo opazili, da je aglutiniral tako z imunskim serumom za Sejroe, Saxkoebing, Mus24, kot tudi Sejroe, Sejroe, M84, kar kaže na navzkrižno reaktivnost med serumoma. Vzrok temu je, da imajo serovari iz iste serološke skupine, v tem primeru Sejroe, podobno antigensko sestavo. Leptospire so tako reagirale z imunskim serumom proti serovaru Saxkoebing, kot tudi proti serovaru Sejroe. Da bi lahko ta sev opredelili do serovara Sejroe ali Saxkoebing, bi morali izvesti test navzkrižne aglutinacije-absorbcije (International Committee on Systematic Bacteriology,

1984) ali uporabiti katero drugo metodo. Metoda navzkrižne aglutinacije-absorbcijske je namreč zelo zapletena, časovno zamudna in zahteva zbirko vseh referenčnih sevov in njihovih antiserumov. Tako bi bilo potrebno sev testirati z vsemi imunskimi serumi znotraj serološke skupine Sejroe (sem prištevamo serovare Sejroe, Saxkoebing, Hardjo, Haemolytica, Wolffi, ...) ter ugotoviti pri katerem imunskemu serumu dosežemo najvišji titer. V izogib temu bi lahko za opredelitev serovara izbrali metodo PFGE, ki je tudi priporočena metoda za identifikacijo leptospir do nivoja serovara (Postic in sod., 2000). Serotipska opredelitev se veliko uporablja pri rutinskem delu za opredelitev novih izolatov leptospir ter potrditev aglutinacijskih lastnosti leptospir, ki jih gojijo za potrebe diagnostike. Metoda je namreč hitra, rezultati so ponovljivi, na voljo pa je tudi veliko število imunskih serumov, ki jih pridelajo referenčni laboratoriji.

5.1.2 Genotipska opredelitev

Genotipsko smo leptospire opredelili do vrste na podlagi temperature taljenja pomnožkov, kot so to že opisali Merien in sod. (2005). Vzorce, pri katerih so se krivulje temperature taljenja prekrivale, smo uvrstili v isto gensko skupino oz. vrsto, kot to prikazuje slika 10. Za vsak izolat smo naredili več ponovitev in izračunali povprečno temperaturo taljenja (preglednica 9). S to metodo smo opredelili 63/69 (91,3 %) vzorcev in jih razporedili v 6 genskih skupin. Za detekcijo pomnožkov in analizo Tm smo uporabili nespecifično flourescentno barvilo SYBR Green I, za katerega je značilno, da se veže na vsako dvovijačno DNA. Glavna pomanjkljivost takega zaznavanja produktov je, da se barvilo veže tudi na nespecifične produkte in dimere začetnih oligonukleotidov in s tem zmanjša specifičnost testa (Mackay, 2004). Vendar smo opazili, da imajo nespecifični pomnožki in dimeri začetnih oligonukleotidov nižje Tm in jih zato lahko brez težav ločimo od želenih produktov. Za patogene leptospire je bila opažena temperatura taljenja med 82,02 °C in 86,90 °C (preglednica 9 in slika 10). Krivulje, ki niso bile v tem območju smo označili kot nespecifične. Večino izolatov (59/69 oz. 85,5 %) smo razvrstili med vrste *L. interrogans* sensu stricto, *L. borgpetersenii* in *L. kirshneri* (preglednica 9). Te tri vrste so razširjene po vsem svetu (Merien in sod., 2005) in kaže, da prevladujejo tudi v Sloveniji. Z uporabo oligonukleotidnih začetnikov LEB1-F in LEB1-R in analizo Tm smo lahko jasno razlikovali med njimi (slika 10), kar je pri identifikaciji zelo pomembno. Največ vzorcev

(37/63) je pripadalo vrsti *L. interrogans* sensu stricto s povprečnim Tm 83,76 °C. Sem smo uvrstili tudi največ humanih izolatov (16/27). Najvišji povprečni Tm je bil 86,54 °C in je bil značilen za vrsto *L. borgpetersenii*. Tej vrsti je pripadalo 11 izolatov. Enako število izolatov smo opredelili tudi kot *L. kirshneri* s Tm 84,62 °C. Samo en vzorec smo uvrstili v vrsto *L. noguchi*. To vrsto večinoma najdemo v Južni Ameriki (Merien in sod., 2005). Presenetilo nas je, da se nam je z izbranima začetnima oligonukleotidoma pomnožila tudi DNA nepatogenih leptospir iz vrste *L. biflexa*. Ta se namreč z uporabljenimi začetniki ne bi smel pomnoževati. Ugotovili smo, da so naši rezultati pomnoževanja v LC ponovljivi in z izjemo *L. biflexa* tudi primerljivi z rezultati Merien in sod. (2005).

Pri 6 vzorcih (preglednica 9) po pomnoževanju nismo dobili ponovljivih rezultatov, temperature taljenja pa niso bile značilne za patogene leptospire. Te vzorce smo zato še nadalje analizirali, kot je opisano v materialih in metodah, vendar smo lahko do vrste opredelili le en vzorec (preglednica 10). Glede na Tm smo zaključili, da gre za nepatogene leptospire, kljub dejству, da smo jih pridobili iz referenčnega laboratorija. Menimo, da kulture leptospir niso bile čiste in so določeno kulturo prerasle nepatogene leptospire.

5.1.3 Primerjava serotipske in genotipske opredelitve

Šele razvoj metod molekularne biologije je omogočil novejši način delitve leptospir na vrste. Tako sedaj sevi, ki jih uvrščamo v isto serološko skupino, pripadajo različnim vrstam in obratno, sevi iz različnih seroloških skupin pripadajo isti vrsti (Postic in sod., 2000). To smo pokazali tudi v tej diplomski nalogi. Slike 11-14 prikazujejo ujemanje krivulj temperatur taljenja za vzorce, ki spadajo v isto gensko skupino, čeprav pripadajo različnim serološkim skupinam.

V literaturi lahko dobimo podatke, katere serološke skupine in serovari pripadajo določeni vrsti (Genomospecies serovar by serogroup, 2008). Te podatke smo primerjali z našimi rezultati. Pri 58/69 (84,1 %) izolatih se je serotipska in genotipska opredelitev ujemala, te izolate smo tako zbrali v preglednice po vrstah (priloga A-C). Pri 11 izolatih leptospir pa se serotipska in genotipska opredelitev nista skladali.

Iz Zagreba smo dobili 3 seve, pri katerih se oznaka seva in temu pripadajoča vrsta iz literature ni ujemala z vrsto, ki smo jo določili z LC. Kulti z oznako Sejroe, Sejroe, M84 in Tarassovi, Tarassovi, Mitis Johnson žal nismo mogli serološko opredeliti, ker leptospire

niso aglutinirale z nobenim imunskim serumom iz zbirke IMI, lahko pa smo jima določili vrsto z LC. Ti dve kulti bi zato morali aglutinirati s širšim naborom imunskih serumov iz vrst, ki jim po LC pripadajo (slika 15 in 16). Sev z oznako Sejroe, Saxkoebing, Mus 24 bi moral po oznaki pripadati vrsti *L. interrogans* sensu stricto, vendar smo z LC sev uvrstili v *L. borgpetersenii* (slika 17). Sev je aglutiniral tako z imunskim serumom Sejroe, Saxkoebing, kot tudi Sejroe, Sejroe. Menimo, da sev najverjetneje pripada serološki skupini Sejroe, Sejroe, saj je ta po literaturi umeščena v vrsto *L. borgpetersenii*, kot smo sev tudi sami opredelili. Za dokončno opredelitev pa bi morali ta vzorec še dodatno analizirati.

Težave smo imeli tudi pri humanem izolatu KB 185/02, ki ga zaradi slabe rasti leptospir nismo mogli serološko opredeliti, lahko pa smo ga opredelili genotipsko z LC (slika 16). V primerih, ko izolati leptospir ne rastejo dobro v kulti, imajo molekularne metode veliko prednost pred imunskimi, pri tem se ne bi omejili le na tipizacijo izoliranih leptospir, ampak tudi na uporabo molekularnih metod pri diagnosticiranju okužbe.

Do neskladja med serotipizacijo in genotipizacijo je prišlo tudi pri humanem izolatu ŠŽ 242/02, ki je aglutiniral z imunskim serumom Bataviae, Bataviae, Van Tienen. Genotipsko smo sev opredelili kot *L. kirshneri*. Referenčni sev Bataviae, Bataviae, Van Tienen sicer po literaturi pripada vrsti *L. interrogans* sensu stricto, vendar seve serološke skupine Batavia, uvrščamo tudi v druge vrste. Tako je možno, da sev pripada serološki skupini Bataviae, vendar ne gre za serovar Bataviae, ampak mogoče za serovara Djatzi ali Bafani. Za ta dva serovar je namreč znano, da pripada vrsti *L. kirshneri*. V tem primeru bi morali izolat dodatno analizirati z večjim številom imunskih serumov znotraj serološke skupine Bataviae ali uporabiti kako drugo metodo, s katero bi lahko določili serološko skupino in serovar (npr. PFGE).

Pri 6 vzorcih (preglednica 11) po pomnoževanju DNA v LC in po analizi temperature taljenja nismo dobili ponavljajočih se rezultatov, ampak so se temperature taljenja gibale od 81 do 86 °C. Pri analizi temperature taljenja pa smo velikokrat opazili tudi dvojne vrhove. Sklepali smo, da kulture niso čiste, zato smo jih redčili, kot je to opisano v materialih in metodah. Čisto kulturo smo po redčenju dobili le pri sevu Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Wijnberg, ki smo ga kasneje lahko tudi opredelili serotipsko in genotipsko (preglednica 11). Pri ostalih vzorcih so imeli pomnožki temperature taljenja okoli 81 °C, tako nizke temperature pa niso značilne za patogene

leptospire. Opazili smo tudi, da se je DNA slabše pomnoževala, ker je računalnik zaznal pomnoževanje šele v kasnejših ciklih. Z imunskimi serumi smo te kulture uvrstili v serološko skupino Semeranga.

Zaključili smo, da izvorne kulture niso bile čiste oz. so bile kontaminirane z nepatogenimi leptospirami. Nepatogene leptospire so verjetno po redčitvi prerasle patogene, saj je znano, da saprofitske leptospire v kulturi rastejo hitreje kot patogene (Murgia in sod., 1997).

Čeprav smo z imunskimi serumi uspešno opredelili večino vzorcev, ima ta metoda identifikacije številne pomanjkljivosti. Metoda je precej subjektivna, saj za titer aglutinacije izberemo tisto redčitev, pri kateri ocenimo, da je 50 % zlepljenih in 50 % prostih leptospir. Poleg tega je interpretacija rezultatov težja zaradi navzkrižne aglutinacije. Delo z živimi leptospirami pa predstavlja določeno tveganje za osebo, ki test izvaja. Kot enostavna, hitra, ponovljiva in bolj specifična se je izkazala metoda PCR v realnem času z analizo temperature taljenja. S pomočjo te smo lahko vzorce leptospir enostavno opredelili do vrste, hkrati pa lahko tudi ločili specifične pomnožke od nespecifičnih. S to metodo smo lahko opredeli tudi leptospire, ki v kulturi slabše rastejo in jih zato ne moremo serološko identificirati. Poleg tega se je genotipska opredelitev ujemala s serotipsko, kot je to opisano v literaturi.

Merien in sod. (2005) so mnenja, da lahko z metode PCR v realnem času in tehnologijo SYBR Green I dokažemo in hkrati tudi opredelimo leptospire direktno iz kliničnih vzorcev, brez predhodne kultivacije. Ta metoda bi lahko imela velik potencial v rutinski diagnostiki. Do sedaj se namreč s klasično metodo PCR ni dalo identificirati vrste leptospir, ki je povzročila okužbo. Tako bi se bilo potrebno v nadalnjih raziskavah osredotočiti na prenos te metode v rutinsko diagnostiko in na izobraževanje zdravnikov, da bi se odločali za ta način dokazovanja in opredelitve leptospir.

5.2 SKLEPI

- Z izbranim protokolom za napravo LightCycler smo uspešno pomnoževali DNA leptospir, analiza temperature taljenja pa je bila značilna za vrsto.
- Metoda PCR v realnem času z analizo temperature taljenja je enostavna, hitra, ponovljiva in specifična metoda za opredelitev leptospir in zato primerna za uporabo v rutinskem delu.
- Serotipska opredelitev z imunskimi serumi je v primerjavi z genotipizacijo sicer cenejša, vendar delovno zahtevnejša in težja za interpretacijo.
- Serotipska in genotipska opredelitev se ujemata v večini primerov.
- Obe metodi, serotipizacija z imunskimi serumi in genotipizacija z napravo LightCycler, sta primerni za tipizacijo leptospir.

6 POVZETEK

Leptospire so vijačno zavite spirohete, ki imajo značilno kljukasto zakriviljene konce. V rod *Leptospira* uvrščamo tako nepatogene kot patogene vrste. Slednje povzročajo bolezen imenovano leptosiroza, ki prizadene živali in ljudi. Leptosiroza je ena od najbolj razširjenih zoonoz na svetu. V Sloveniji je bolezen endemična v Pomurju. Spekter oblik bolezni je pri ljudeh zelo pester, od subkliničnih okužb do skrajno hudih potekov, ki se velikokrat končajo s smrtnim izidom. Najpomembnejši rezervoar in prenašalci leptosiroze so glodavci, okužijo pa se lahko tudi številne divje in domače živali ter posledično človek. Posamezne živalske vrste so običajno gostitelji za določene serovare leptospir. Tako lahko z opredelitvijo serovara pogosto predvidimo tudi možen vir okužbe in s tem omogočimo nadzor nad širjenjem bolezni. Za opredelitev leptospir je na voljo več fenotipskih in genotipskih metod. Fenotipsko leptospire uvrščamo na podlagi antigenske sorodnosti v serovare in serološke skupine (serotipizacija). Do sedaj je priznanih več kot 200 serovarov, ki so razdeljeni v 25 seroloških skupin. Danes serotipizacijo vse bolj nadomešča genotipizacija s katero vse znane serovare uvrščamo v 17 vrst. Kljub temu, da imamo za identifikacijo vrst na voljo veliko metod, so te v večini primerov zahtevne, časovno zamudne in predrage, da bi se jih lahko posluževala večina rutinskih laboratorijev.

Namen diplomske naloge je bila primerjava med serotipsko in genotipsko opredelitvijo leptospir. Uporabili smo 69 izolatov leptospir, od tega 42 izolatov uporabljajo pri rutinskem testu mikroaglutinacije, 27 izolatov pa je bilo izoliranih iz humanih vzorcev. Serotipsko smo izolate opredelili na podlagi aglutinacije z imunskimi serumi, za genotipsko opredelitev pa smo uporabili PCR v realnem času. DNA leptospir smo pomnoževali v napravi LightCycler, analiza temperature taljenja (T_m) pomnožkov pa nam je omogočila razlikovanje med patogenimi leptospirami, vsaka vrsta ima namreč značilen T_m . Z obema metodama smo opredelili 58 izolatov, ki smo jih uvrstili v 15 seroloških skupin in v 6 vrst. Serotipska opredelitev se je tudi ujemala z genotipsko, skladno z rezultati predhodnih raziskav. Zaključili smo, da sta obe metodi primerni za tipizacijo leptospir. Zelo se je izkazala metoda PCR v realnem času z analizo temperature taljenja, metoda je namreč specifična, enostavna, hitra in ponovljiva.

7 VIRI

Ahmad S. N., Shah S., H Ahmad F. M. 2005. Laboratory diagnosis of leptospirosis. Journal of Postgraduate Medicine, 51, 3: 195-200

Ahmed N., Devi S. M., Valverde M. A., Vijayachari P., Machang'u R. S., Ellis W. A., Hartskeerl R. A. 2006. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 5, art. n. 28: doi 10.1186/1476-0711-5-28 [10 str.]

Barken K. B., Haagensen J. A. J., Tolker-Nielsen T. 2007. Advances in nucleic acid-based diagnostic of bacterial infections. Clinica Chimica Acta, 384: 1-11

Barnett J. K., Barnett D., Bolin C. A., Summers T. A., Wagar E. A., Cheville N. F., Hartskeerl R. A., Haake D. A. 1999. Expression and distribution of *Leptospira* outer membrane components during renal infection of hamsters. Infection and Immunity, 67, 2: 853-861

Bedernjak J. 1993. Leptospiroze pri nas in v svetu. Murska Sobota, Pomurska založba: 136 str.

Bedernjak J., Bedernjak Bajuk N. 2003. Leptospiroze. V: Infektočni simpozij 2003. Čižman M., Strle F. (ur.). Ljubljana, Medicinski Razgledi: 131-139
(Medicinski razgledi, 42, Suppl. 1: 131-139)

Bergey's taxonomic outlines. 2008. Athens, Bergey's Manual Trust (30. april 2008) http://www.bergeys.org/outlines/Bergeys_Vol_4_Outline.pdf (29. avg. 2008): 16 str.

Bharti A. R., Nally J. E., Ricardi J. N., Matthias M. A., Diaz M. M., Lovett M. A., Levett P. N., Gilmann R. H., Willing M. R., Gotuzzo E., Vinetz J. M. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infectious Diseases, 3, 12: 757-771

Brenner D. J., Kaufmann A. F., Sulzer K. R., Steigerwalt A. G., Rogers F. C., Weyant R. S. 1999. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. International Journal of Systematic Bacteriology, 49, 2: 839-858

Cerar T., Pengov A., Ružić-Sabljić E., Lindtner-Knific R. 2005. Leptospiroza pri govedu. Veterinarske novice, 31: 337-342

Collares-Pereira M., Korver H., Cao Thi V., Santos-Reis M., Bellenger E., Baranton G., Terpstra W. J. 2000. Analysis of *Leptospira* isolates from mainland Portugal and Azores islands. FEMS Microbiology Letters, 185, 2: 181-187

Corney B. G., Colley J., Graham G.C. 1997. Simplified analysis of pathogenic leptospiral serovars by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. Journal of Medical Microbiology, 46: 927-932.

Cullen P. A., Xu X., Matsunaga J., Sanchez Y., Ko A. I., Haake D. A., Adler B. 2005. Surfaceome of *Leptospira* spp. Infection and Immunity, 73, 8: 4853-4863

Faine S., Adler B., Bolin C., Perolat P. 1999. *Leptospira* and leptospirosis. 2nd ed. Melbourne, MedSci: 257 str.

Galayanee D., Sirawaraporn W., Icksang-Ko A., Kongtim S., Naigowit P., Thongboonkerd V. 2007. Use of immunoblotting as an alternative method for serogrouping *Leptospira*. Journal of Medical Microbiology, 56, 5: 587-592

Genomospecies serovar by serogroup. 2008. Paris, Institut Pasteur (23. jun. 2006)
<http://www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/serovars.html> (30. avg. 2008): 18 str.

Haake D. A., Matsunaga J. 2002. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infection and Immunity*, 70, 9: 4936-4945

Herrmann J. L., Baril C., Bellenger E., Perolat P., Baranton G., Saint Girons I. 1991. Genome conservation in isolates of *Leptospira interrogans*. *Journal of Bacteriology*, 173, 23: 7582-7588

Herzog-Velikonja B., Gruden K. 2000. Praktikum iz molekularne biologije-teoretičen del. Ljubljana, Študentska založba: 74-88

International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira*. 1984. Minutes of the meeting, 6 to 10 August, 1982, Boston, Massachusetts. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34, 2: 258-259

International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira*. 1987. Minutes of the meeting, 5 to 6 September, 1986, Manchester, England. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34: 472-473

International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira*. 1992. Minutes of the meeting, 13 to 15 September, 1990, Osaka, Japan. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 2: 330-334

Johnson R. C., Harris V. G. 1967. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. I. Growth at low temperatures. *Journal of Bacteriology*, 94, 1: 27-31

Kositant U., Chotinantakul K., Phulsuksombati D., Tribuddharat C. 2007. Assessment of southern blot ribotyping for differentiation of *Leptospira* strains isolated from field rats. *Journal of Microbiological Methods*, 69, 2: 288-297

Levett P. N. 2001. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 2: 296-326

Levett P. N. 2007. Leptospira. V: Manual of clinical microbiology. 9th ed. Murry P. R., Baron J. E., Jorgensen J.H. (eds.). Washington, D.C., ASM Press: 963-970

Levett P. N. 2003. Usefulness of serologic analysis as predictor of infecting serovar in patients with severe leptospirosis. Clinical Infectious Diseases, 36, 4: 447-452

Levett P. N., Morey R. E., Galloway R. L., Turner D. E., Steigerwalt A. G., Mayer L. W. 2005. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. Journal of Medical Microbiology, 54, 1: 45-49

Mackay I. M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical Microbiology and Infection, 10: 190-212

Marshall R. B., Wilton B. E., Robinson A. J. 1981. Identification of *Leptospira* serovars by restriction-endonuclease analysis. Journal of Medical Microbiology, 14, 1: 163-166

McBride A. J. A., Santos B. L., Queiroz A., Santos A. C., Hartskeerl R. A., Reis M. G., Ko A. I. 2007. Evaluation of four whole-cell *Leptospira*- based serological tests for diagnosis of urban leptospirosis. Clinical and Vaccine Immunology, 14, 9: 1245-1248

Merien F., Portnoi D., Bourhy P., Charavay F., Berlioz A., Baranton G. 2005. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. FEMS Microbiology Letters, 249, 1: 139-147

Morey R. E., Galloway R. L., Bragg S. L., Steigerwalt A. G., Mayer L. W., Levett P. N. 2006. Species-specific identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA gene sequencing. Journal of Clinical Microbiology, 44, 10: 3510-3516

Murgia R., Riquelme N., Baranton G., Cinco M. 1997. Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic leptospira occurring in water. FEMS Microbiology Letters, 148: 27-34

Nolte F. S., Caliendo A. M. 2007. Molecular detection and identification of microorganisms. V: Manual of clinical microbiology. 9th ed. Murry P. R., Baron J. E., Jorgensen J.H. (eds.). Washington, D.C., ASM Press: 218-244

Olive D. M., Bean P. 1999. Principles and applications of methods for DNA – based typing of microbial organisms. Journal of Clinical Microbiology, 37, 6: 1661-1669

Ooteman M. C., Vago A. R., Koury M. C. 2006. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. Journal of Microbiological Methods, 65, 2: 247-257

Pal E., Prelog I. 2003. Prikaz bolnikov z leptospirozo, zdravljenih na oddelku za infekcijske bolezni in vročinska stanja Splošne bolnišnice Murska Sobota v letu 2002 – pomen hemokultur pri njeni diagnostiki. Zdravniški Vestnik, 72: 275-277

Paster B. J., Dewhirst F. E. 2001. Phylogenetic foundation of spirochetes. V: The spirochetes: molecular and cellular biology. Saier M. H., Garcia-Lara J. (eds.). Wymondham, Horizon Scientific Press: 5-9

Perolat P., Merien F., Ellis W. A., Baranton G. 1994. Characterization of *Leptospira* isolates from serovar Hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR, and mapped restriction site polymorphisms. Journal of Clinical Microbiology, 32, 8: 1949-1957

Picardeau M., Bulach D. M., Bouchier C., Zuerner R. L., Zidane N., Wilson P. J., Creno S., Kuczak E. S., Bommezzadri S., Davis J. C., McGrath A., Johnson M. J., Boursaux-Eude C., Seemann T., Rouy Z., Coppel R. L., Rood J. I., Lajus A., Davies J. K., Medigue C., Adler B. 2007. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. Plos One, 3, 2, art. n. 1607: doi 10.1371/journal.pone.0001607 [9 str.]

Plank R., Dean D. 2000. Overview of epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. Microbes and Infection, 2,10: 1265-1276

Poljak M., Avšič-Županc T., Seme K. 1994. Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. Medicinski razgledi, 33: 379-400

Poljak M. 2002. Molekularno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 129-142

Poročilo o spremeljanju nalezljivih bolezni 2007. 2008. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije. (3. oktober 2008)

http://www.ivz.si/javne_datoteke/datoteke/798-Epidemiolosko_spremljanje_NB_2007.pdf
(28. nov. 2008): 106 str.

Postic D., Merien F., Perolat P., Baranton G. 2000. Diagnostic biologique leptospirose - borreliose de Lyme. 2nd ed. Paris, Institute Pasteur: 138-193

Radšel-Medvešček A. 2002. Leptosiroza. V: Infekcijske bolezni. Marolt-Gomišček M., Radšel-Medvešček A. (ur.). Ljubljana, Tangram: 213-218

Ramadass P., Latha D., Senthilkumar A., Srinivasan P., Saranya N. 2002. Arbitrarily primed PCR – A rapid and simple method for typing of leptospiral serovars. Indian Journal of Medical Microbiology, 20, 1: 25-28

Ririe K. M., Rasmussen R. P., Wittwer C. T. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Analytical Biochemistry, 245: 154-160

Ružić-Sabljić E. 2002. Leptospire. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 303-307

Ružić-Sabljić E. 2005. Molekularna diagnostika spiralnih bakterij. V: Molekularna diagnostika v medicini: zbornik predavanj. 15. spominsko srečanje akademika Janeza Milčinskega, 36. memorialni sestanek profesorja Janeza Plečnika, 1. srečanje Slovenskega društva za humano genetiko z mednarodno udeležbo in Letno srečanje Sekcije za klinično

mikrobiologijo in hospitalne infekcije slovenskega zdravniškega društva, Ljubljana, 30. november – 2. december 2005. Luzar B., Poljak M., Glavač D., Balažic J. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 417-424

Saengjaruk P., Chaicumpa W., Watt G., Bunyaraksyotin G., Wuthiekanun V., Tapchaisri P., Sittinont C., Panaphut T., Tomanakan K., Sakolvaree Y., Chongsa-Nguan M., Mahakunkijcharoen Y., Kalambaheti T., Naigowit P., Wambangco M. A. L., Kurazono H., Hayashi H. 2002. Diagnosis of human leptospirosis by monoclonal antibody-based antigen detection in urine. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 2: 480-489

Sehgal S. C. 2006. Epidemiological patterns of leptospirosis. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24, 4: 310-311

Singh A., Goering R. V., Simjee S., Foley S. L., Zervos M. J. 2006. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 3: 512-530

Slack A. T., Symonds M. L., Dohnt M. F., Smythe L. D. 2006. Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiology*, 6, art. n. 95: doi 10.1186/1471-2180-6-95 [10 str.]

Smythe L. D., Smith I. L., Smith G. A., Dohnt M. F., Symonds M. L., Barnett L. J., McKay D. B. 2002. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infectious Diseases* 2, art. n. 13: doi 10.1186/1471-2334-2-13 [7 str.]

van Belkum A., Tassios P. T., Dijkshoorn L., Haeggman S., Cookson B., Fry N. K., Fussing V., Green J., Feil E., Gerner-Smidt P., Brisse S., Struelens M. 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13, 3: 1-46

Venkatesha M. D., Ramadass P. 2001. Identification of leptospiral isolates by bacterial restriction endonuclease analysis (BRENDA). Indian Journal of Medical Microbiology, 19, 2: 83-86

Vijayachari P., Ahmed N., Sugunan A. P., Ghousunnissa S., Rajender Rao K., Hasnain S. E., Sehgal S. C. 2004. Use of fluorescent amplified fragment length polymorphism for molecular epidemiology of leptospirosis in India. Journal of Clinical Microbiology, 42, 8: 3575-3580

Zuerner R., Haake D., Adler B., Segers R. 2001. Technological advances in the molecular biology of *Leptospira*. V: The spirochetes: molecular and cellular biology. Saier M. H., Garcia-Lara J. (eds.). Wymondham, Horizon Scientific Press: 137-145

Zuerner R. L., Bolin C. A. 1997. Differentiation of *Leptospira interrogans* isolates by IS1500 hybridization and PCR assays. Journal of Clinical Microbiology, 35, 10: 2612-2617

Wang Z., Jin L., Wegrzyn A. 2007. Leptospirosis vaccines. Microbial Cell Factories, 6, art. n. 39: doi 10.1186/1475-2859-6-39 [10 str.]

WHO. 2003. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva, World Health Organization: 109 str.

Wittwer C. T., Kusukawa N. 2004. Real-time PCR. V: Molecular microbiology: diagnostic principles and practice. Presing D. H., Tenover F. C., Versalovic J., Tang Y., Unger E. R., Relman D. A., White T. J. (eds.). Washington, D.C., ASM Press: 71-84

Wuthiekanun V., Chierakul W., Limmathurotsakul D., Smythe L., Symonds M. L., Dohnt M. F., Slack A. T., Limpaiboon R., Suputtamongkol Y., White N. J., Day N. P. J., Peacock S. J. 2007. Optimization of culture of *Leptospira* from humans with leptospirosis. Journal of Clinical Microbiology, 45, 4: 1363-1365

ZAHVALA

Posebna zahvala je namenjena moji mentorici, prof. dr. Evi Ružič-Sabljič, za vodenje in strokovno pomoč ter vse vzpodbudne besede. Hvala za potrpežljivost in dobro voljo, ki me je navdajala s pozitivno energijo.

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Katji Seme za skrben pregled diplomske naloge.

Hvala tudi vsem iz Laboratorija za diagnostiko borelioze in leptospiroze za pomoč, prijaznost in prijetno vzdušje s polno smeha. Velika zahvala je namenjena zlasti Jasmini Zlotrg, ki je z budnim očesom spremljala potek eksperimentalnega dela, me vzpodbjala in mi velikokrat priskočila na pomoč. Zaradi vseh vas je bilo raziskovalno delo še zanimivejše.

Iskrena hvala tudi vsem, ki ste mi kakorkoli pomagali pri nastanku te diplomske naloge in skozi leta študija, pa vas nisem posebej omenila.

PRILOGE

Priloga A: Temperatura taljenja pomnožkov za *L. interrogans* sensu stricto.

Serološka identifikacija	Število meritev	Povprečje meritev	Mejne vrednosti	Povprečje (serološka skupina)
CANICOLA, Canicola, Hond Utrecht IV (Pariz)	13	83.92	83.53 - 84.12	83.91
CANICOLA, Canicola, Hond Utrecht IV (NL)	9	83.90	83.8 - 83.95	
CANICOLA, Canicola, Hond Utrecht IV (ZG)	11	83.92	83.79 - 83.99	
POMONA, Pomona, Pomona (Pariz)	7	84.03	83.73 - 84.19	
POMONA, Pomona, Pomona (NL)	10	83.97	83.83 - 84.1	83.84
POMONA, Pomona, Mezzano (ZG)	11	83.87	83.67 - 84.18	
POMONA, Pomona, S.	10	83.72	83.22 - 84.01	
POMONA, Pomona, H.	8	83.60	83.23 - 84.15	
ICTEROHAEMORRHAGIAE, Copenhageni Wijnberg (Pariz)	15	83.52	83.06 - 83.78	
ICTEROHAEMORRHAGIAE, Ictero., RGA (ZG)	12	83.53	83.45 - 83.8	
ICTEROHAEMORRHAGIAE, Ictero., Š.	10	83.19	82.88 - 83.7	
ICTEROHAEMORRHAGIAE, Ictero., P.	11	83.50	82.39 - 84.56	83.50
ICTEROHAEMORRHAGIAE, Ictero., M.	9	83.36	82.7 - 83.77	
ICTEROHAEMORRHAGIAE, Ictero., G.	8	83.53	83.06 - 84.00	
ICTEROHAEMORRHAGIAE, Ictero., Ša.	2	83.70	83.66 - 83.73	
ICTEROHAEMORRHAGIAE, Ictero., MB.	2	83.67	83.65 - 83.69	
ICTEROHAEMORRHAGIAE, Ictero., MŠ.	2	83.70	83.69 - 83.71	
ICTEROHAEMORRHAGIAE, Ictero., Č.	2	83.76	83.75 - 83.77	
ICTEROHAEMORRHAGIAE, Ictero., Mi.	2	83.68	83.63 - 83.73	
ICTEROHAEMORRHAGIAE, Ictero., L.	2	83.71	83.64 - 83.77	
ICTEROHAEMORRHAGIAE, Ictero., K.	2	83.71	83.65 - 83.76	
ICTEROHAEMORRHAGIAE, Ictero., S.	2	83.72	83.68 - 83.75	
ICTEROHAEMORRHAGIAE, Ictero., Ma.	2	83.72	83.75 - 83.68	

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Temperatura taljenja pomnožkov za *L. interrogans* sensu stricto.

Serološka identifikacija	Temperatura taljenja pomnožkov [°C]			
	Število meritev	Povprečje meritev	Mejne vrednosti	Povprečje (serološka skupina)
AUSTRALIS, Australis, Ballico (Pariz)	13	83.84	83.52 - 84.17	
AUSTRALIS, Australis, Ballico (NL)	11	84.09	83.68 - 84.47	83.90
AUSTRALIS, Australis, Ballico (ZG)	11	83.79	83.61 - 84.13	
AUSTRALIS, Australis, F.	2	83.90	83.89 - 83.91	
AUTUMNALIS, Autumnalis, Akiyami A (Pariz)	1	83.77		84.39
AUTUMNALIS, Autumnalis, Akiyami A (NL)	8	83.77	83.49 - 83.97	
PYROGENES, Pyrogenes, Salinem (P)	7	84.18	84.11 - 84.26	84.09
PYROGENES, Pyrogenes, Salinem (NL)	13	84.04	83.96 - 84.17	
BATAVIAE, Bataviae, Van Tienen (Pariz)	9	83.93	83.69 - 84.04	
BATAVIAE, Bataviae, Van Tienen (NL)	13	83.85	83.73 - 83.95	85.11
BATAVIAE, Bataviae, Leyden (ZG)	9	83.77	83.67 - 83.88	
SEJROE, Hardjo, Hardjoprajitno (ZG)	9	83.72	83.46 - 84.05	83.72

Priloga B: Temperatura taljenja pomnožkov za *L. borgpetersenii* in *L. kirshneri*.*L. borgpetersenii*

Serološka identifikacija	Število meritev	Temperatura taljenja pomnožkov [°C]		
		Povprečje meritev	Mejne vrednosti	Povprečje (serološka skupina)
SEJROE, Sejroe, M84 (Pariz)	20	86.39	85.88 – 86.67	
SEJROE, Sejroe, M84 (NL)	11	86.32	86.20 - 86.60	86.41
SEJROE, Sejroe, L.	2	86.53	86.5 – 86.56	
SEJROE, Sejroe, K.	2	86.62	86.59 - 86.65	
SEJROE, Sejroe, J.	2	86.67	86.64 - 86.69	
TARASSOVI, Tarassovi, Mitis Johnson (Pariz)	9	86.66	86.47 - 86.63	86.66
BALLUM, Castellonis, Castellon 3 (Pariz)	14	86.62	86.45 - 86.89	86.61
BALLUM, Ballum, Mus 127 (ZG)	10	86.59	86.11 - 86.77	
JAVANICA, Javanica, Veldart Batavia 46 (Pariz)	9	86.60	86.42 - 86.69	86.45
JAVANICA, Poi, Poi (ZG)	18	86.38	86.13 - 86.90	

L. kirshneri

Serološka identifikacija	Število meritev	Temperatura taljenja pomnožkov [°C]		
		Povprečje meritev	Mejne vrednosti	Povprečje (serološka skupina)
GRIPPOTYPHOSA, Grippo., Moskva V (Pariz)	15	84.54	84.07 - 84.77	
GRIPPOTYPHOSA, Grippo., Moskva V (NL)	16	84.59	84.63 - 84.83	
GRIPPOTYPHOSA, Grippo., Mijava (ZG)	13	84.60	84.26 - 84.83	
GRIPPOTYPHOSA, Grippo., Đ.	11	84.57	84.18 - 84.92	84.60
GRIPPOTYPHOSA, Grippo., V.	2	84.84	84.81 - 84.86	
GRIPPOTYPHOSA, Grippo., F.	2	84.83	84.8 – 84.85	
GRIPPOTYPHOSA, Grippo., P.	2	84.84	84.8 – 84.87	
CYNOPTERI, Cynopteri, 3522C (Pariz)	9	84.69	84.33 - 85.01	
CYNOPTERI, Cynopteri, 3522 (NL)	12	84.67	84.42 - 84.86	84.68

Priloga C: Temperatura taljenja pomnožkov za *L. noguchi*, *L. meyeri* in *L. biflexa*.

L. noguchi

Temperatura taljenja pomnožkov [°C]				
Serološka identifikacija	Število meritev	Povprečje meritev	Mejne vrednosti	Povprečje (serološka skupina)
PANAMA, Panama, CZ214 K (Pariz)	12	84.99	84.88 - 85.12	84.99

L. meyeri

Temperatura taljenja pomnožkov [°C]				
Serološka identifikacija	Število meritev	Povprečje meritev	Mejne vrednosti	Povprečje (serološka skupina)
JAVANICA, Sofia T.	8	86.39	86.02 - 86.83	86.33
JAVANICA, Sofia Ž.	9	86.28	85.70 - 86.66	

L. biflexa

Temperatura taljenja pomnožkov [°C]				
Serološka identifikacija	Število meritev	Povprečje meritev	Mejne vrednosti	Povprečje (serološka skupina)
SEMARANGA, Patoc, Patoc 1 (Pariz)	6	83.98	83.85 - 84.23	83.98