

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Sonja VULETIĆ

**RAZLIKOVANJE MED PATOGENIMI IN
SAPROFITNIMI LEPTOSPIRAMI NA PODLAGI
POMNOŽEVANJA GENA *rrs***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Sonja VULETIĆ

**RAZLIKOVANJE MED PATOGENIMI IN SAPROFITNIMI
LEPTOSPIRAMI NA PODLAGI POMNOŽEVANJA GENA *rrs***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**DIFFERENTIATION OF PATHOGENIC AND SAPROPHYTIC
LEPTOSPIRES BY AMPLIFICATION OF *rrs* GENE**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2012

Vuletić S. Razlikovanje med patogenimi in saprofitnimi leptospirami na podlagi pomnoževanja gena *rrs*.
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2012

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.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Eva Ružić-Sabljić, dr. med., za recenzentko pa doc. dr. Tadeja Matos, dr. med.

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

Recenzentka: doc. dr. Tadeja Matos, dr. med.

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

Član: doc. dr. Tadeja Matos, dr. med.

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

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Sonja Vuletić

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.61.083:616.936:577.2.083(043)=163.6
KG	zoonoze/leptospiroza/patogene leptospire/saprofitne leptospire/molekularne tehnike/PCR
AV	VULETIĆ, Sonja
SA	RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva (mentorica)/MATOS, Tadeja (recenzentka)
KZ	SI – 1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2012
IN	RAZLIKOVANJE MED PATOGENIMI IN SAPROFITNIMI LEPTOSPIRAMI NA PODLAGI POMNOŽEVANJA GENA <i>rrs</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 75 str., 19 pregl., 13 sl., 2 pril., 63 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p>Leptospiroza spada med najbolj razširjene zoonoze na svetu. Povzročajo jo spirohete rodu <i>Leptospira</i>, ki poleg patogenih zajema tudi saprofitne vrste. Patogene leptospire spadajo v kompleks <i>Leptospira interrogans</i> sensu lato in pri človeku povzročajo širok spekter kliničnih slik, od asimptomatske okužbe do multiorganske odpovedi, ki se lahko konča s smrtnim izidom. Serovari saprofitnih leptospir se uvrščajo v kompleks <i>Leptospira biflexa</i> sensu lato. Najdemo jih v naravi, v kliničnih in drugih vzorcih pa so lahko prisotne kot posledica kontaminacije. Za ugotavljanje okužbe z leptospirami so na voljo številne mikrobiološke metode. Referenčna metoda za dokaz okužbe z leptospirami je mikroaglutinacijski serološki test (MAT), vedno bolj pa se uveljavljajo tudi molekularne metode, predvsem PCR. Namen diplomskega dela je bil testirati para oligonukleotidnih začetnikov Lepat1/Lepat2 in Sapro1/Sapro2, s katerima bi lahko razlikovali med patogenimi in saprofitnimi leptospirami. Uporabili smo 13 sevov, ki se rutinsko uporabljajo za serološko diagnostiko leptospiroze in 116 sevov iz zbirke Laboratorija za diagnostiko boreloz in leptospiroze. Vsem uporabljenim vzorcem smo izmerili koncentracijo DNA in jih pomnožili s tremi pari oligonukleotidnih začetnikov - LeptoA/LeptoB, Lepat1/Lepat2 in Sapro1/Sapro2. Prišli smo do zaključka, da z oligonukleotidnimi začetniki Lepat1/Lepat2 in Sapro1/Sapro2 ni možno razlikovati med patogenimi in saprofitnimi leptospirami.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 579.61.083:616.936:577.2.083(043)=163.6
 CX zoonosis/leptospirosis/pathogenic leptospires/saprophytic leptospires/molecular techniques/PCR
 AU VULETIĆ, Sonja
 AA RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva (supervisor)/MATOS, Tadeja (reviewer)
 PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
 PY 2012
 TI DIFFERENTIATION OF PATHOGENIC AND SAPROPHYTIC LEPTOSPIRES BY AMPLIFICATION OF *rrs* GENE
 DT Graduation thesis (University studies)
 NO XII, 75 p., 19 tab., 13 fig., 2 ann., 63 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Leptospirosis is considered the most common zoonosis in the world. It is caused by spirochaete from genus *Leptospira*, which contains both pathogenic and saprophytic species. Pathogenic species belong to complex *Leptospira interrogans* sensu lato. They cause a wide spectrum of clinical manifestations in human, varying from asymptomatic infection to severe disease with multiorgan failure and death. Saprophytic strains belong to complex *Leptospira biflexa* sensu lato. They are found in many types of wet or humid environments, occasionally they also appear in clinical and other samples as contaminants. There is a variety of different microbiological methods available for detection and identification of leptospires. The reference method for diagnosis of leptospirosis is microagglutination test (MAT), but recently molecular techniques have been proposed as alternative tool for detection and identification of *Leptospira*. The aim of this study was to test primer pairs Sapro1/Sapro2 and Lepat1/Lepat2 as tools for identification of saprophytic and pathogenic leptospires. We tested 13 pathogenic strains, that are routinely used in microagglutination test and 116 strains from laboratory leptospira strain collection. We measured DNA concentration in all samples and then amplify each sample with primer pairs LeptoA/LeptoB, Lepat1/Lepat2 and Sapro1/Sapro2. According to our findings we conclude, that primer pairs Sapro1/Sapro2 and Lepat1/Lepat2 cannot be used to distinguish pathogenic from saprophytic *Leptospira* species.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK.....	XI
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XIII
1 UVOD.....	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 CILJI RAZISKOVANJA.....	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 EPIDEMIOLOGIJA IN GEOGRAFSKA RAZŠIRJENOST LEPTOSPIROZE	3
2.1.1 Leptosiroza pri živalih.....	3
2.1.2 Leptosiroza pri ljudeh	4
2.1.3 Razširjenost leptosiroze v Sloveniji in po svetu	6
2.2 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI LEPTOSPIR	7
2.2.1 Taksonomija leptospir	7
2.2.2 Morfologija leptospir	8
2.2.3 Antigenske lastnosti leptospir	9
2.2.3.1 Lipopolisaharidi	9
2.2.3.2 Proteinski antigeni	10
2.2.4 Struktura genoma pri leptospirah.....	11
2.2.5 Metabolizem leptospir	11
2.2.6 Gojitev leptospir.....	12
2.3 LEPTOSPIROZA	12
2.3.1 Virulentni dejavniki in patogeneza	12
2.3.1.1 Virulentni dejavniki	12
2.3.1.2 Patogeneza	14
2.3.2 Klinična slika leptosiroze	14

2.3.2.1 Leptospiroza brez zlatenice.....	15
2.3.2.2 Leptospiroza z zlatenico – Weilov sindrom.....	15
2.4 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA LEPTOSPIROZE	16
2.4.1 Odvzem vzorca, transport in skladiščenje.....	16
2.4.2 Ugotavljanje prisotnosti leptospir z mikroskopiranjem	17
2.4.3 Izolacija leptospir.....	18
2.4.4 Serološke metode.....	19
2.4.4.1 Mikroaglutinacijski test	19
2.4.4.2 Referenčni sevi leptospir	20
2.4.5 Molekularne metode za dokaz okužbe in identifikacijo leptospir.....	21
2.4.5.1 Molekularne metode za dokaz okužbe.....	21
2.4.5.2 Molekularne metode za identifikacijo leptospir	23
2.4.6 Metode za razlikovanje med patogenimi in saprofitnimi leptospirami	25
2.4.6.1 Klasične metode za razlikovanje med patogenimi in saprofitnimi leptospirami	25
2.4.6.2 Molekularne metode za razlikovanje med patogenimi in saprofitnimi leptospirami	25
2.5 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE.....	28
2.5.1 Zdravljenje leptospiroze.....	28
2.5.2 Preprečevanje leptospiroze	29
2.5.2.1 Cepljenje	29
3 MATERIALI IN METODE.....	30
3.1 MATERIALI	30
3.1.1 Sevi leptospir, ki se uporabljajo za mikroaglutinacijski test (MAT)	30
3.1.2 Sevi leptospir iz zbirke laboratorija.....	31
3.2 METODE	32
3.2.1 Priprava gojišča EMJH.....	33
3.2.2 Gojenje leptospir.....	34
3.2.3 Identifikacija leptospir z imunskimi serumi	34
3.2.4 Izolacija DNA	35
3.2.4.1 Izolacija DNA iz bakterijske kulture	35
3.2.4.2 Izolacija DNA iz bakterijske kulture za pripravo agaroznih kockic.....	36

3.2.5 Pridobivanje DNA iz agaroznih kockic	37
3.2.6 Priprava redčitev DNA.....	37
3.2.7 Merjenje koncentracije DNA z aparaturo NanoDrop.....	37
3.2.8 Pomnoževanje DNA leptospir	38
3.2.8.1 »Nested« PCR z oligonukleotidnimi začetniki L3/L4 in L4/LPato2	39
3.2.8.1.1 PCR z oligonukleotidnima začetnikoma L3/L4.....	39
3.2.8.1.2 PCR z oligonukleotidnima začetnikoma L4/LPato2	40
3.2.8.2 PCR z oligonukleotidnima začetnikoma LeptoA/LeptoB	41
3.2.8.3 PCR z oligonukleotidnima začetnikoma Lepat1/Lepat2	42
3.2.8.4 PCR z oligonukleotidnima začetnikoma Sapro1/Sapro2	44
3.2.8.5 Ponovitve reakcij	45
3.2.9 Priprava agaroznega gela.....	46
3.2.10 Agarozna gelska elektroforeza.....	46
3.2.11 Kontrola kontaminacije	46
4 REZULTATI.....	47
4.1 REZULTATI »NESTED« PCR Z L3/L4 IN L4/LPato2	47
4.2 REZULTATI POMNOŽEVANJA DNA Z OLIGONUKLEOTIDNIMA ZAČETNIKOMA LeptoA/LeptoB	48
4.2.1 Pomnoževanje DNA sevov za MAT in njihovih redčitev z LeptoA/LeptoB.....	48
4.2.2 Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir z LeptoA/LeptoB	50
4.3 REZULTATI POMNOŽEVANJA DNA Z OLIGONUKLEOTIDNIMA ZAČETNIKOMA Lepat1/Lepat2	50
4.3.1 Pomnoževanje DNA sevov za MAT in njihovih redčitev z Lepat1/Lepat2	50
4.3.2 Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir z Lepat1/Lepat2	51
4.4 REZULTATI POMNOŽEVANJA DNA Z OLIGONUKLEOTIDNIMA ZAČETNIKOMA Sapro1/Sapro2	53
4.4.1 Pomnoževanje DNA sevov za MAT in njihovih redčitev s Sapro1/Sapro2	53
4.4.2 Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir s Sapro1/Sapro2	53
4.5 PONOVITVE PCR REAKCIJ S SAPROFITNIMI SEVI	56
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	58
5.1 RAZPRAVA	58

5.2 SKLEPI.....	65
6 POVZETEK	66
7 VIRI.....	68
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sevi leptospir za mikroaglutinacijski test	30
Preglednica 2: Število sevov leptospir ter vzorcev DNA, uporabljenih pri raziskavi	32
Preglednica 3: Sestava osnovnega gojišča Ellinghousen McCullough modificirano po Johnson in Harris	34
Preglednica 4: Oligonukleotidni začetniki, specifični za pomnoževanje bodisi patogenih ali saprofitnih leptospir	38
Preglednica 5: Sestava reakcijske mešanice za polimerazno verižno reakcijo z oligonukleotidnima začetnikoma L3/L4	39
Preglednica 6: Pogoji za polimerazno verižno reakcijo pri uporabi oligonukleotidnih začetnikov L3/L4	40
Preglednica 7: Sestava reakcijske mešanice za polimerazno verižno reakcijo z oligonukleotidnima začetnikoma L4/LPato2	40
Preglednica 8: Pogoji za polimerazno verižno reakcijo pri uporabi oligonukleotidnih začetnikov L4/LPato2	41
Preglednica 9: Nukleotidni zaporedji oligonukleotidnih začetnikov LeptoA/LeptoB	41
Preglednica 10: Sestava reakcijske mešanice za polimerazno verižno reakcijo z oligonukleotidnima začetnikoma LeptoA/LeptoB	42
Preglednica 11: Pogoji za polimerazno verižno reakcijo pri uporabi oligonukleotidnih začetnikov LeptoA/LeptoB	42
Preglednica 12: Nukleotidni zaporedji oligonukleotidnih začetnikov Lepat1/Lepat2	43
Preglednica 13: Sestava reakcijske mešanice za polimerazno verižno reakcijo z oligonukleotidnima začetnikoma Lepat1/Lepat2	43
Preglednica 14: Pogoji za polimerazno verižno reakcijo pri uporabi oligonukleotidnih začetnikov Lepat1/Lepat2	43
Preglednica 15: Nukleotidni zaporedji oligonukleotidnih začetnikov Sapro1/Sapro2	44
Preglednica 16: Sestava reakcijske mešanice za polimerazno verižno reakcijo z oligonukleotidnima začetnikoma Sapro1/Sapro2	44
Preglednica 17: Pogoji za polimerazno verižno reakcijo pri uporabi oligonukleotidnih začetnikov Sapro1/Sapro2	45
Preglednica 18: Interpretacija rezultatov pomnoževanja DNA	47

Preglednica 19: Rezultati ponovitev reakcij pomnoževanja DNA saprofitnih leptospir....57

KAZALO SLIK

Slika 1: Življenjski cikel leptospir v naravi (Faine in sod., 1999).....	5
Slika 2: Filogenetsko drevo družine <i>Leptospiraceae</i> , ki temelji na nukleotidnem zaporedju 16S rRNA (Levett in Haake, 2009)	8
Slika 3: Morfologija leptospir (Bharti in sod., 2003).	9
Slika 4: Časovni potek leptospiroze in diagnostični postopki za potrditev okužbe (Levett, 2001)	17
Slika 5: Shema raziskovalnega dela.....	33
Slika 6: Gelska elektroforeza produktov polimerazne verižne reakcije z oligonukleotidnima začetnikoma L3/L4.	47
Slika 7: Gelska elektroforeza produktov polimerazne verižne reakcije z oligonukleotidnima začetnikoma L4/LPato2.	48
Slika 8: Gelska elektroforeza produktov polimerazne verižne reakcije z oligonukleotidnima začetnikoma LeptoA/LeptoB	49
Slika 9: Gelska elektroforeza produktov pomnoževanja DNA patogenih leptospir z oligonukleotidnima začetnikoma Lepat1/Lepat2.....	52
Slika 10: Gelska elektroforeza produktov pomnoževanja DNA saprofitnih leptospir z oligonukleotidnima začetnikoma Lepat1/ Lepat2.....	52
Slika 11: Gelska elektroforeza produktov pomnoževanja DNA saprofitnih leptospir z oligonukleotidnima začetnikoma Sapro1/Sapro2.	54
Slika 12: Gelska elektroforeza produktov pomnoževanja DNA patogenih leptospir z oligonukleotidnima začetnikoma Sapro1/Sapro2.	55
Slika 13: Gelska elektroforeza produktov pomnoževanja DNA patogenih leptospir z oligonukleotidnima začetnikoma Sapro1/Sapro2 – prikaz lažno pozitivnih rezultatov.	55

KAZALO PRILOG

Priloga A: Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir, ki se uporablajo za mikroaglutinacijski test in njihovih redčitev

Priloga B: Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir iz zbirke laboratorija

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AP PCR	verižna reakcija s polimerazo s poljubnimi oligonukleotidnimi začetniki (angl. Arbitrarily primed polymerase chain reaction)
bp	bazni par
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
ELISA	encimsko-imunski test (angl. Enzyme-linked immunosorbent assay)
EMJH	gojišče za kultivacijo leptospir (Ellinghausen McCullough modificirano po Johnson in Harris)
kb	kilobaza
LPS	lipopolisaharid
MAT	mikroaglutinacijski test
MLST	tipizacija zaporednih 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)
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. Restriction fragment length polymorphism)
tRNA	transportna ribonukleinska kislina
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina
++	močno pozitiven rezultat
+	pozitiven rezultat
+/-	šibko pozitiven/ mejni rezultat
-	negativen rezultat
/	testiranje ni bilo izvedeno

1 UVOD

Leptosiroza je ena izmed najbolj razširjenih zoonoz na svetu in zaradi naraščajoče incidence predstavlja pomemben problem javnega zdravstva (Levett, 2001). Gre za akutno bakterijsko okužbo, ki jo povzročajo patogene spirohete rodu *Leptospira* (Levett in Haake, 2009). Glavni rezervoar predstavlja mali glodavci, ki leptospire izločajo v okolje z urinom (Bedernjak, 1993). Simptomi pri človeku so lahko različni - od subkliničnih okužb do odpovedi več organov, ki se lahko konča s smrtno (Levett in Haake, 2009). Poleg patogenih, rod *Leptospira* zajema tudi saprofitne bakterije. Te so ubikvitarni v okolju in pri človeku ne povzročajo bolezni. Občasno se pojavi v kliničnih vzorcih, kot posledica kontaminacije (WHO, 2003).

Zgodnja postavitev diagnoze je pri leptosirozi ključnega pomena, saj je antibiotična terapija najučinkovitejša, če jo začnemo zgodaj v poteku bolezni. Laboratorijska diagnostika leptosiroze temelji na izolaciji, seroloških in molekularnih metodah (Levett, 2001; WHO, 2003).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Referenčna metoda za dokaz okužbe z leptospirami je mikroaglutinacijski test (MAT), s katerim dokazujemo specifična protitelesa v krvi bolnikov s sumom na leptosirozo. Test je v zgodnjih fazah bolezni neuporaben, saj pride do pojava protiteles približno 7 do 10 dni po okužbi. Prav tako negativni rezultat mikroaglutinacijskega testa še ne izključuje možnosti okužbe z leptospirami. Izvajamo ga namreč samo z določenimi serovari leptospir, zato v primeru, da bolnikovega serumu ne testiramo z ustreznou kulturo leptospir, dobimo lažno negativen rezultat (Levett, 2001).

Molekularne metode so v primerjavi s serološkimi bolj občutljive in hitrejše v zgodnji fazi okužbe, saj za postavitev diagnoze ni potrebno čakati na pojav protiteles. Glavni problem pa predstavlja tehnična zahtevnost in visoki stroški, zaradi česar v večini primerov niso primerne za uporabo v rutinskih laboratorijih (Levett in Haake, 2009).

1.2 CILJI RAZISKOVANJA

V diplomskem delu smo želeli ugotoviti, ali lahko na podlagi pomnoževanja gena *rrs* s paroma oligonukleotidnih začetnikov Lepat1/Lepat2 in Sapro1/Sapro2, ugotovimo bodisi patogene ali saprofitne leptospire. Omenjeni oligonukleotidni začetniki so bili zasnovani za razlikovanje med patogenimi in saprofitnimi leptospirami v vodi, mi pa smo želeli preizkusiti uspešnost metode na sevih leptospir. V ta namen smo z obema paroma oligonukleotidnih začetnikov pomnoževali DNA leptospir. Pridobili smo jo iz sevov, ki se rutinsko uporabljajo pri mikroaglutinacijskem testu ter sevov iz zbirke Laboratorija za diagnostiko boreloz in leptospiroze, ki deluje v okviru Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo (IMI). Želeli smo ugotoviti, ali bi omenjena metoda lahko nadomestila obstoječ »nested« PCR, ki se trenutno uporablja v Laboratoriju za diagnostiko boreloz in leptospiroze za ugotavljanje prisotnosti patogenih leptospir v kliničnih vzorcih.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavljamo:

- da bomo lahko s parom oligonukleotidnih začetnikov Lepat1/Lepat2 pomnožili DNA patogenih leptospir,
- da bomo lahko s parom oligonukleotidnih začetnikov Sapro1/Sapro2 pomnožili DNA saprofitnih leptospir,
- da se bodo rezultati pomnoževanja s posameznim parom oligonukleotidnih začetnikov med seboj izključevali.

2 PREGLED OBJAV

Leptospiroza je svetovno razširjena zoonoza, ki jo povzročajo patogene spirohete vrste *Leptospira interrogans* sensu lato. Drobne spirohete z ukrivljenimi konci je leta 1907 prvi opazil ameriški znanstvenik Arthur Stimson, pri mikroskopiranju ledvičnega tkiva bolnika, ki naj bi umrl zaradi rumene mrzlice. Oblika bakterij ga je spominjala na vprašaj, zato je vrsto poimenoval *Spirochaeta interrogans* (gr. *interrogans* = vprašaj). Rod se je leta 1917 preimenoval v *Leptospira* (gr. *leptos* = nežen, vitek) (Levett, 2001).

Klinično sliko leptospiroze z zlatenico in ledvično odpovedjo je prvi opisal nemški zdravnik Adolf Weil leta 1986. Po njem še danes imenujemo težko obliko leptospiroze - Weilov sindrom (Bedernjak, 1993; Levett, 2001).

Etiologijo bolezni sta v začetku 20. stoletja proučevala japonska strokovnjaka Inada in Ido. Leta 1915 jima je uspelo izolirati leptospire in specifična protitelesa iz krvi japonskih rudarjev, ki so imeli zlatenico. Neodvisno sta leptospire opisali tudi dve skupini nemških zdravnikov, ki sta jih uspeli izolirati iz krvi gvinejskih prašičkov, inokuliranih z krvjo okuženih nemških vojakov (Levett, 2001).

Prvi primer leptospiroze v Sloveniji je bil odkrit leta 1938 v občini Murska Sobota in je bil prijavljen Centralnemu higienskemu zavodu Beograd (Bedernjak, 1993).

2.1 EPIDEMIOLOGIJA IN GEOGRAFSKA RAZŠIRJENOST LEPTOSPIROZE

2.1.1 Leptospiroza pri živalih

Glavni rezervoar leptospir predstavlja glodavci in mali sesalci, predvsem miši, podgane, voluharji in podlasice. Dober pokazatelj razširjenosti okužbe v nekem kraju so tudi ježi. Okužijo se lahko tudi domače živali, kot so svinje, konji, govedo, psi in mačke. Te pogosto prihajajo v stik s človekom, zato predstavljajo nevarnost za prenos leptospiroze na človeka (Bedernjak, 1993).

Najpogostejsa načina prenosa okužbe med živalmi sta direkten stik s kontaminiranim urinom in zaužitje kontaminirane krme, možen pa je tudi kongenitalen prenos (Bedernjak, 1993).

Živali okužbo največkrat prebolijo brez kliničnih znakov in postanejo asimptomatski klicenosci, saj se leptospire naselijo v ledvičnih tubulih ter se z urinom izločajo v okolje. Dolžina in intenziteta leptospirurije sta odvisni od gostitelja in serovara. Domače živali izločajo leptospire še več tednov ali mesecev po preboleli okužbi, medtem ko glodavci največkrat vse življenje. Večinoma se med živalskim gostiteljem in leptospirami razvije simbioza, zaradi česar žival ohrani ledvično funkcijo in ne pogine, s tem pa uspešno širi bakterije naprej v okolje (Bedernjak, 1993).

Posamezni serovari se pogosteje pojavljajo pri določenih živalskih vrstah. Tako serovar *Canicola* najpogosteje najdemo pri psih, *Pomona* največkrat okuži govedo in svinje, *Ballum* miši, *Icterohaemorrhagiae* pa podgane (Kaufmann in Weyant, 2009).

Identifikacija serovarov in njihovih najpogostejših gostiteljev je pomembna s stališča javnega zdravstva, saj omogoča postavitev sistema metod za preprečevanje in nadzor širjenja bolezni (WHO, 2003).

2.1.2 Leptosiroza pri ljudeh

Možnost humane okužbe je odvisna od prisotnosti živali, načina življenja ljudi ter poklicnih in rekreacijskih aktivnosti prebivalstva. Število primerov leptosiroze se spreminja iz leta v leto in je odvisno od količine padavin in števila glodavcev. Čeprav prostoživeče živali predstavljajo majhno nevarnost za zdravje ljudi, pa povzročajo človeška obolenja posredno s prenosom leptosiroze na domače živali (Bedernjak, 1993).

Človek se okuži s posrednim ali neposrednim stikom s kontaminiranim živalskim urinom in za leptospire predstavlja naključnega gostitelja. Leptospire vstopajo v telo skozi poškodovano kožo, konjuktivo, možna pa je tudi okužba z aerosoli ali inhalacijo kontaminirane vode. Ob dolgotrajni izpostavljenosti kože kontaminirani vodi lahko leptospire vstopijo tudi skozi nepoškodovano kožo (Farr, 1995; Levett, 2001). Opisani so redki primeri prenosa okužbe iz človeka na človeka ter preko živalskega ugriza (Gollop in sod., 1993). Življenjski cikel leptospir v naravi prikazuje slika 1.

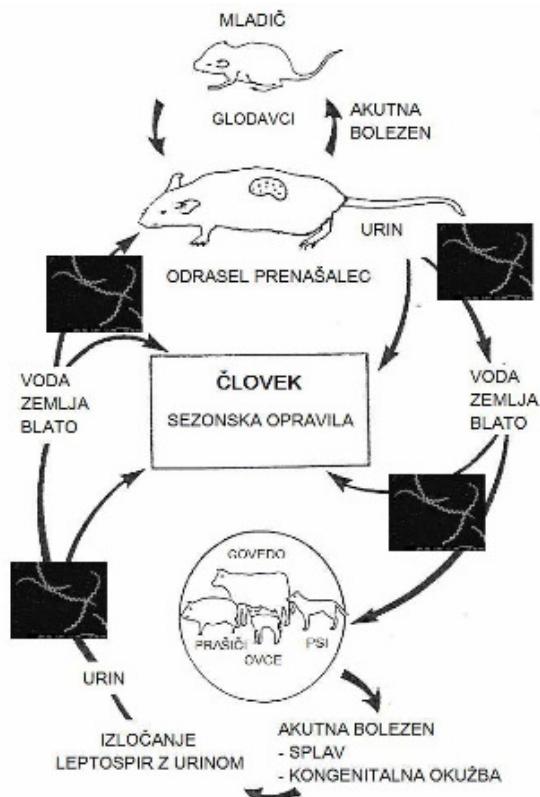
Podobno kot živali, tudi človek po preboleli okužbi nekaj časa izloča leptospire z urinom. Ta ni tako kužen kot živalski, saj je zaradi nizkega pH urina njihovo preživetje omejeno (Levett, 2001).

Nadaljnje širjenje leptospir s človeškim urinom omejuje tudi sistem kanalizacije (WHO, 2003).

Novejše raziskave so pokazale, da kar 5 % zdravih prebivalcev Amazonije izloča leptospire z urinom, čeprav serološki testi ne kažejo znakov trenutne ali nedavno prebolele okužbe. Dokazana je tudi zmožnost patogenih in intermediarnih (potencialno patogenih) leptospir za perzistentno okužbo renalnih tubulov (Ganoza in sod., 2010).

Leptosiroza se pojavlja sporadično ali v manjših epidemijah, ki navadno sledijo poplavam in drugim naravnim nesrečam (Simões in sod., 1969).

Poklicna izpostavljenost predstavlja veliko tveganje za okužbo. Najbolj ogroženi so rudarji, vodovodni delavci, vojaki, veterinarji, zaposleni v kmetijstvu, delavci na riževih poljih in delavci, ki se ukvarjajo z deratizacijo (Waitkins, 1986). Od rekreativnih dejavnosti predstavljajo tveganje za okužbo vodni športi, še posebej poleti, ko so zaradi visokih temperatur vzpostavljeni idealni pogoji za razmnoževanje leptospir v rekah in jezerih (Mumford, 1989).



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

2.1.3 Razširjenost leptospiroze v Sloveniji in po svetu

Bolezen je razširjena po vsem svetu in se pri ljudeh pojavlja skozi vse leto. Največ primerov je v tropskih in subtropskih krajih, saj sta vлага in temperatura omejujoča dejavnika pri razmnoževanju leptospir. Endemska območja so: jugovzhodna Azija, Kitajska, Afrika, ter južna in centralna Amerika. Tretjina obolelih se okuži zaradi poklicne izpostavljenosti, drugi pa pri rekreaciji. Med obolelimi za leptospirozo je 3-krat več moških kot žensk, saj pogosteje opravljajo rizične poklice (Levett, 2001; Levett in Haake, 2009).

V Sloveniji je leptospiroza endemska v Pomurju, kjer povprečna letna umrljivost znaša 12,75 oseb na 100 000 prebivalcev. Oboleli v Pomurju predstavljajo 90 % vseh obolelih v Sloveniji. Primeri se pojavljajo sporadično skozi vse leto, zabeležena je tudi ena hidrična epidemija, in sicer leta 1974, ko je bilo hospitaliziranih 20 obolelih. Dobro razvito kmetijstvo v Pomurju omogoča preživetje številnim glodavcem, ki nato z urinom kontaminirajo površinske vode, zemljo ter okužijo domače živali. Možnosti za okužbo je veliko, predvsem pri opravljanju kmetijskih del in kopanju v kontaminiranih vodah. Obolenjajo vse starostne skupine in oba spola. V nasprotju z ostalimi endemskimi področji je v Pomurju obolenost pri ženskah nekoliko večja kot pri moških. Gre za posledico delitve dela, saj je večina moških zaposlena v industriji, zato so ženske prevzele kmetijska opravila (Bedernjak, 1993).

Novejše raziskave kažejo velik razkorak med razširjenostjo leptospiroze pri ljudeh in živalih na posameznih območjih Slovenije. Na določenih živinorejskih območjih je bila ugotovljena kar 20 % okuženost domačih živali, s tem da se leptospiroza pri ljudeh ne pojavlja (Bedernjak, 1993; Bedernjak, 1995).

2.2 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI LEPTOSPIR

2.2.1 Taksonomija leptospir

Klasifikacija leptospir je zahtevna in se ves čas spreminja. Rod *Leptospira* uvrščamo v družino *Leptospiraceae*, v katero prištevamo tudi robove *Leptonema* in *Turneriella*. Družina *Leptospiraceae* spada skupaj z družino *Spirochaetaceae* v red *Spirochaetales* (Levett, 2001). Filogenetsko drevo družine *Leptospiraceae* prikazuje slika 2.

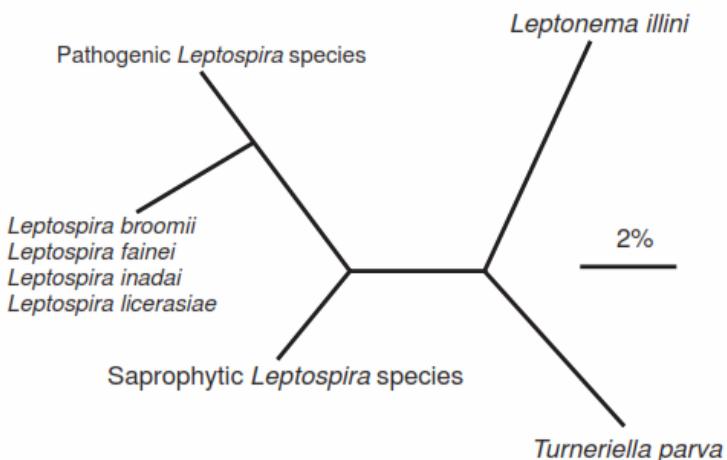
Klasična delitev leptospir temelji na fenotipskih lastnostih in rod *Leptospira* razdeli v dve vrsti, pri čemer je ključni kriterij za razlikovanje med obema patogenost. *Leptospira interrogans* sensu lato vključuje vse patogene seve, v vrsto *Leptospira biflexa* sensu lato pa sodijo saprofitne leptospire. Osnovna taksonomska enota pri klasični delitvi je serovar, več antigensko podobnih serovarov pa tvori serološko skupino. Serološka skupina nima posebnega taksonomskega statusa, je pa zelo uporabna pri razumevanju epidemiologije. Vrsto *L. interrogans* sestavlja več kot 200, *L. biflexa* pa 60 serovarov (Farr, 1995; Kaufmann in Weyant, 2009).

Molekularno-taksonomske raziskave so pokazale veliko genetsko raznovrstnost znotraj obstoječih vrst *L. interrogans* in *L. biflexa*, potrdile pa so tudi obstoj novega rodu znotraj družine *Leptospiraceae*, to je *Leptonema*. Molekularna klasifikacija je problematična za klinične mikrobiologe, saj je nekompatibilna s serološko, ki so jo veliko let uspešno uporabljali v klinične in epidemiološke namene (Brenner in sod., 1999).

Prvotna genotipska klasifikacija je leptospire razdelila na 10 vrst, in sicer *L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. santarosai*, *L. borgpeterseni*, *L. inadai*, *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii* in *L. parva*. Pozneje je bila v sistem leptospir dodana vrsta *L. kirschneri* (Ramadass in sod., 1992). Raziskovalci Centra za nalezljive bolezni so leta 1999, na podlagi molekularnih analiz, definirali še vrste *L. broomii*, *L. licerasiae* ter *Leptospira genomospecies 1, 3, 4 in 5* (Brenner in sod., 1999; Levett in Haake, 2009).

Genotipska delitev temelji na razlikah v genomu in ne patogenosti, zato so znotraj iste vrste lahko tako patogeni, kot nepatogeni sevi.

Filogenetske analize so pokazale, da poleg patogenih in saprofitnih leptospir obstaja še tretja skupina. Gre za leptospire z intermediarnim patogenim statusom oziroma potencialno patogene leptospire, ki zajemajo vrste *L. broomii*, *L. fainei*, *L. inadai* in *L. licerasiae* (Levett in Haake, 2009).



Slika 2: Filogenetsko drevo družine *Leptospiraceae*, ki temelji na nukleotidnem zaporedju 16S rRNA (Levett in Haake, 2009). Prikazana so razmerja med bakterijami družine *Leptospiraceae*, iz katerih je razvidno, da se leptospire delijo v tri skupine - patogene leptospire, saprofitne leptospire ter intermediarne oziroma potencialno patogene leptospire. K slednjim prištevamo vrste *L. bromeii*, *L. fainei*, *L. inadai* in *L. licerasiae*.

2.2.2 Morfologija leptospir

Leptospire so gibljive spirohete z značilnimi kljukasto ukrivljenimi konci. Dolge so 6-20 μm , široke pa 0,1-6 μm , zaradi česar jih opredelimo kot najtanjše predstavnice spirohet. Sveže izolirane leptospire so običajno bolj vijačno zvite in krajše kot laboratorijski sevi po pasažiranju (Bedernjak, 1993). Morfologijo leptospir prikazuje slika 3.

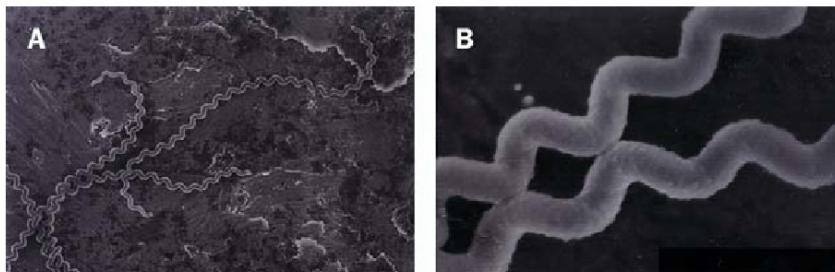
Struktura celice je podobna kot pri ostalih spirohetah, kar pomeni, da sta citoplazemska membrana in peptidoglikanska celična stena tesno povezani, prekriva pa ju še zunanjega membrana. Lipopolisaharid v celični steni ima podobno zgradbo kot pri ostalih po Gramu negativnih bakterijah (Haake, 2000).

Gibanje leptospir je lahko translacijsko ali netranslacijsko. Omogočata ga dva periplazmatska flagela s kompleksno proteinsko zgradbo (Trueba in sod., 1992).

Morfološka struktura leptospiram omogoča, da se prebijejo tudi skozi zelo viskozne medije, kot je na primer vezivno tkivo. Greenberg in Canale-Parola (1977) navajata, da se v bolj viskoznih medijih gibljivost leptospir celo poveča.

Leptospire se slabo obarvajo po Gramu in Giemsi, zato jih barvamo z anilinskimi barvili, kot je karbol fuksin, neobarvane pa lahko opazujemo z mikroskopiranjem v temnem polju (Ahmad in sod., 2005).

Pri leptospirah je prisotna velika antigenska heterogenost, na podlagi česar jih uvrščamo v posamezne serološke skupine in serovare (Levett, 2001).



Slika 3: Morfologija leptospir (Bharti in sod., 2003).

2.2.3 Antigenske lastnosti leptospir

2.2.3.1 Lipopolisaharidi

Lipopolisaharidi (LPS) so glavni površinski antigeni, proti katerim je usmerjen humoralni imunski odziv in so kriterij za razvrščanje leptospir v posamezne serovare (Bulach in sod, 2000). Za LPS leptospir je značilno, da so po strukturi in biokemijski zgradbi podobni lipopolisaharidom drugih po Gramu negativnih bakterij, le da so manj toksični za gostitelja. Glavni del LPS predstavlja lipid A, ki je odgovoren za toksično aktivnost molekule. Nanj je vezan središčni polisaharid, iz katerega izhajajo terminalne polisaharidne verige (antigeni O). Zapis za endotoksični antigen O se pri *L. interrogans* nahaja na *rfb* lokusu, za katerega predvidevajo, da so ga leptospire pridobile z lateralnim prenosom genov (Bulach in sod, 2000).

Približno 80 % odprtih bralnih okvirjev (ORF – angl. Open reading frame), ki so vpleteni v sintezo LPS pri leptospirah, je zelo podobnih tistim pri *E. coli*, kar nakazuje na visoko konservativnost teh genov (Bulach in sod, 2000).

Ogljikovi hidrati predstavljajo 54 %, lipidi 12 % in proteini 5 % celotne LPS molekule. Glavne sladkorne komponente so galaktoza, arabinoza, ramnoza in ksiloza. Razmerja med njimi se razlikujejo med posameznimi serovari. Posebnost leptospir je, da za sintezo LPS ne morejo uporabiti zunanjih virov ogljikovih hidratov, pač pa vse sladkorje, ki se pojavijo v LPS sintetizirajo *de novo* (Bulach in sod, 2000).

Od lipidov so v LPS najpogosteje zastopane hidroksilaurična (3-OH-C_{12:0}), palmitinska (C_{16:0}) in oleinska kislina (C_{18:0}) (Vinh in sod., 1985).

2.2.3.2 Proteinski antigeni

Proteini zunanje membrane (Omp – angl. Outer membrane proteins) predstavljajo enega od glavnih virulentnih dejavnikov pri leptospirah, zaradi česar so predmet številnih raziskav na področju cepiv in serološke diagnostike. Razdelimo jih v tri skupine, in sicer periferne proteine, transmembranske proteine in lipoproteine (Cinco, 2010).

Najpomembnejši protein zunanje membrane je lipoprotein LipL32. Njegova ekspresija se v času okužbe zelo poveča, zato ima kar 95 % bolnikov z leptosirozo protitelesa proti LipL32 (Levett in Haake, 2009). Za virulenco leptospir je pomemben tudi protein Loa22, ki se nahaja na površini celične membrane. Če se gen za ta protein okvari zaradi insercije ali delekcije, postane sev nevirulenten (Cinco, 2010).

Prvi opisani transmembranski protein je bil OmpL1, ki se nahaja v zunanji membrani patogenih leptospir in deluje kot porin (Cinco, 2010).

Leptospire sintetizirajo tudi imunoglobulinom podobne proteine - Lig (angl. Leptospiral immunoglobulin-like protein), katerih funkcija je uravnavanje interakcij z gostiteljsko celico in jih najdemo samo pri patogenih leptospirah. Lig proteini so nameščeni na zunanji membrani, kjer se ob stiku z gostiteljsko celico močno vežejo z fibronektinom, fibrinogenom, kolagenom in lamininom (Cinco, 2010; Levett in Haake, 2009).

2.2.4 Struktura genoma pri leptospirah

Genom leptospir je velik približno 5000 bp. Predstavlja ga dve krožni molekuli DNA - velik (4400 - 4600 kb) in mali (350 kb) kromosom (Nascimento in sod., 2004). Za vse leptospire je značilno, da imajo dokaj nizek odstotek GC baznih parov (35–41 %) (Picardeau in sod, 2008). Posebnost genoma *L. interrogans* je, da geni za 16S rRNA niso organizirani v operone, kot pri ostalih bakterijah, pač pa so raztreseni po celiem kromosому. *L. interrogans* ima dva seta genov za 16S in 23S rRNA in en set za 5S rRNA (Picardeau in sod, 2008). Prisotnih je več insercijskih zaporedij, ki skupaj s transpozazami predstavljajo okrog 2 % genoma leptospir (Nascimento in sod., 2004).

Picardeau in sod. (2008) so naredili raziskavo, v kateri so primerjali genome *L. biflexa*, *L. borgpetersenii* in *L. interrogans* sensu stricto. Omenjena primerjava jim je omogočila identifikacijo posameznih odsekov genoma, ki so specifični za patogene ozziroma saprofitne leptospire. Ugotovili so, da genom *L. biflexa* serovar Patoc, sev Patoc 1 sestavlja trije replikoni – genetski elementi, ki se v času replikacije DNA obnašajo kot samostojne enote. Od teh sta večja dva podobna kromosomoma patogenih leptospir, tretji replikon, imenovan p74 pa je edinstven za *L. biflexa*. Ena izmed glavnih razlik med patogenima *L. borgpetersenii* in *L. interrogans* sensu stricto ter saprofitnimo *L. biflexa* je razlika v številu genov za 5S rRNA, saj ima slednja dva seta genov za 5S rRNA, patogeni leptospiri pa le enega (Picardeau in sod, 2008).

Patogene in saprofitne leptospire se razlikujejo tudi v številu genov za tRNA. Počasi rastoči *L. borgpetersenii* in *L. interrogans* sensu stricto imata vsaka 37 genov za tRNA, medtem ko jih ima hitro rastoča *L. biflexa* 35, kar nakazuje na dejstvo, da hitrost rasti ni pogojena s številom genov za tRNA, kot so domnevali v preteklosti (Picardeau in sod, 2008).

2.2.5 Metabolizem leptospir

Leptospire so kemoorganotrofi, kar pomeni, da energijo in ogljik pridobivajo z oksidacijo organskih spojin, natančneje dolgih maščobnih kislin (Xue, 2010).

Metabolizem leptospir je aeroben, zato potrebujejo stalen vir kisika. Optimalen pH za razmnoževanje je 7,2–7,6; temperatura pa 28–30 °C (Palmer, 1988).

Leptospire imajo gene, ki kodirajo encime s peroksidazno aktivnostjo, kot so katalaza, glutation peroksidaza in tiolna peroksidaza, s katerimi se izognejo oksidativnemu stresu, ki je del imunskega odziva gostitelja. Nimajo superoksid dismutaze in regulonov SoxRS in OxyR, ki jih ima večina bakterij za zaščito pred oksidativnim stresom, zato to naloge najverjetneje prevzamejo metaloporfirini (Nascimento in sod., 2004).

2.2.6 Gojitev leptospir

Leptospire lahko gojimo v mediju, obogatenem z vitaminoma B2 in B12, dolgimi verigami maščobnih kislin ter amonijevimi solmi. Najboljše rastejo na gojiščih, ki vsebujejo serum ali albumin (Levett, 2001). Opisanih je več tekočih medijev, ki temeljijo na zajčjem serumu in so jih opisali Fletcher, Korthoff, Noguchi in Stuart. Največkrat uporabljeno je Ellinghausen McCullough gojišče modificirano po Johnson in Harris (EMHJ), ki temelji na oleinski kislini in albuminu. Zaradi občutljivosti na svetlobo jih inkubiramo v temi, pri temperaturi 28–30 °C, v aerobnih pogojih (Levett, 2001; Palmer, 1988) .

2.3 LEPTOSPIROZA

2.3.1 Virulentni dejavniki in patogeneza

2.3.1.1 Virulentni dejavniki

Na izid okužbe vplivata patogenost bakterije in imunski odziv gostitelja. Leptospire imajo številne virulentne dejavnike, ki jim omogočajo vdor v gostiteljsko celico, razmnoževanje in širjenje (Ružić-Sabljić, 2002).

Pri vseh patogenih leptospirah je zaradi LPS prisotna endotoksična aktivnost, nekateri serovari pa so sposobni sintetizirati tudi eksotoksine. Serovari Ballum, Hardjo, Pomona in Tarassovi sintetizirajo hemolizine, ki delujejo kot sfingomielinaze, torej razgrajujejo sfingomelin v plazemski membrani eritrocitov (Bernheimer in Bey, 1986).

Hemolizin ima tudi serovar Lai, vendar ta ne deluje kot sfingomielinaza, pač pa tvori pore v membrani gostiteljske celice (Lee in sod., 2000).

Citotoksično aktivnost imata serovara Pomona in Copenhageni, katera proizvajata citotoksin, ki in vivo izzove tipični histopatološki efekt z infiltracijo makrofagov in polimorfonuklearnih celic (Yam in sod., 1970).

Pritrditev na gostiteljsko celico omogočajo adhezini. Patogene leptospire se lahko vežejo na endotelijalne celice, ledvične epitelijske celice, fibroblaste ter na monocite in makrofage v *in vitro* celičnih linijah (Cinco, 2010).

Sekveniranje genoma *L. interrogans* sensu stricto je omogočilo izvedbo analiz, s katerimi so ugotovili, da je v patogenezo leptospir vpletene več kot 200 proteinov zunanje membrane. Med temi so najpomembnejši adhezini Lsa21, Lsa24, LigA, LigB in LenA (Cinco, 2010).

Pomemben virulentni dejavnik je tudi zmožnost tvorbe biofilmov. Še posebej pomembni so tisti biofilmi, v katerih je prisotnih več mikrobnih vrst, saj lahko pride do prenosa genov med posameznimi vrstami. Tvorba biofilmov omogoča dolgotrajno preživetje leptospir v vodi in prsti, saj so zaščitene pred škodljivimi vplivi okolja in manj občutljive na protimikrobna sredstva (Ristow in sod., 2008).

Za širjenje patogenih leptospir v okolje je pomembna njihova dolgotrajna naselitev v ledvicah okuženih sesalcev. Ristow in sod. (2008) so potrdili tvorbo celičnih agregatov v renalnih tubulih ter s tem ovrgli prepričanje, da patogene leptospire ne morejo tvoriti biofilmov. Primerjali so tudi tvorbo biofilmov pri patogenih in saprofitnih leptospirah. Saprofitne leptospire začnejo tvoriti biofilme po 2-5 dneh, patogene pa potrebujejo okrog 20 dni, kar korelira s hitrostjo z rasti, saj saprofitne leptospire rastejo hitreje (Ristow in sod., 2008).

2.3.1.2 Patogeneza

Patogene leptospire najpogosteje vstopajo v telo skozi kožo, možno mesto vstopa pa so tudi očesna veznica, sluznica žrela in tonzil. Takoj po vstopu se razširijo po krvožilnem sistemu in preidejo v različne organe (Farr, 1995).

Patogenost leptospir je odvisna od encimov in toksinov, ki jih izločajo ter od različnih snovi, ki se sproščajo pri njihovi lizi. Največje patološke spremembe pri leptospirozi se odražajo na epitelu žil in v hepatocitah (Bedernjak, 1993).

Značilne so obsežne hemoragije, ki nastanejo kot posledica vaskulitisa in poškodb endotelija. Histopatologija se najbolj odraža na jetrih, ledvicah, srcu in pljučih, prizadeti pa so lahko tudi drugi organi. Do slabšanja ledvične funkcije ali popolne ledvične odpovedi pride zaradi poškodb renalnih tubulov. Patološke spremembe na srcu zajemajo intersticijski miokarditis, infiltracijo limfocitov in endotelijskih celic ter hemoragije. Pljučne lezije so večinoma hemoragične, do vnetnih sprememb pride ob sekundarnih okužbah (Farr, 1995).

2.3.2 Klinična slika leptospiroze

Obseg simptomov pri leptospirozi je širok in variira od subkliničnih okužb, pri katerih zdravljenje ni potrebno, do fatalne sistemske bolezni, kjer je potrebna takojšnja bolnišnična oskrba (Levett in Haake, 2009).

Leptospiroza se pojavlja v dveh oblikah. Prva in bolj pogosta je neikterična ali leptospiroza brez zlatenice. Predstavlja 85–90 % vseh primerov in poteka v dveh fazah. Akutna ali septkemična faza traja približno 7 dni. Sledi ji imunska faza, v kateri nastajajo specifična protitelesa in pride do izločanja leptospir z urinom (Farr, 1995). Leptospiroza z zlatenico ali Weilov sindrom je nevarnejša oblika bolezni, ki je lahko tudi smrtna. Ta oblika se pojavi v 5–10 % vseh primerov okužb (Farr, 1995).

Umrljivost zaradi leptospiroze je najverjetneje podcenjena, saj je zaradi malega števila leptospir v kliničnih vzorcih potrditev diagnoze težavna, poleg tega pa so tudi klinični znaki neznačilni in jih lahko hitro zamenjamo za druge bolezni (Farr, 1995; Levett, 2001).

2.3.2.1 Leptospiroza brez zlatenice

Večina okužb je subkliničnih ali z blago izraženimi simptomi. Nastop bolezni označujejo nespecifični klinični znaki, kot je vročina, mrzlica, glavobol, bolečine v mišicah, abdominalna bolečina, slabost, bruhanje in kožni izpuščaji. Glavoboli so ponavadi hudi, značilne so retroorbitalne bolečine in občutljivost na svetlobo (Levett in Haake, 2009). Bolečine v mišicah so najpogosteje v spodnjem delu hrbta, stegnih in mečah. Pri približno četrtni okuženih se razvije aseptični meningitis (Levett, 2001).

Pri leptospirozi brez zlatenice simptomi izzvenijo po 7 dneh, kar sovpada s pojavom specifičnih protiteles v serumu. Imunska faza bolezni lahko traja 4-30 dni (Farr, 1995). Leptospire so odstranjene iz krvi in cerebrospinalne tekočine po 1-2 tednih po pričetku imunske faze. Leptospirurija se začne v imunski fazni in traja 1-3 tedne. Umrljivost pri tej obliki bolezni je skoraj nična, čeprav lahko pride do smrti zaradi obsežnejših hemoragij. Možnih je kar nekaj diferencialnih diagnoz - virusne okužbe (hantavirus, virus influenze, HIV, denga virus), encefalitis, poliomielitis, rikecijoza, infekcijska mononukleoza, bruceloza, malarija, virusni hepatitis in pljučnica (Levett in Haake, 2009).

2.3.2.2 Leptospiroza z zlatenico – Weilov sindrom

Weilov sindrom predstavlja težjo obliko bolezni, saj prizadene več organov hkrati. Začetek bolezni je nenaden - pojavi se visoka vročina, močan glavobol, bolečine v mišicah, pogosto so prisotni simptomi gastrointestinalnega trakta (slabost, bruhanje, abdominalne bolečine, diareja) (Levett in Haake, 2009).

Zlatenica (ikterus) se pojavi 3-7 dan po nastopu bolezni. Funkcija jeter je sicer okvarjena, vendar se lahko regenerira in je redko vzrok smrti. Pojavijo se hemoragije v oblikah hematomov, pozneje pa v oblikah manjših ali večjih krvavitev na koži, sluznicah in drugih organih. V nadalnjem poteku bolezni se ikterus povečuje, subkutane in notranje krvavitve postajajo obsežnejše. Pri desetini bolnikov se pojavi izpuščaj, ki je podoben škrlatinkam ali ošpicam. Pride tudi do sprememb na očeh, kjer so možne retinalne krvavitve. Pogosta oblika leptospirozne okužbe je tudi meningitis, ki ga lahko laboratorijsko dokažemo pri skoraj vseh težjih primerih (Farr, 1995; Levett, 2001).

Umrljivost pri Weilovem sindromu je 5-15 %. Smrt najpogosteje nastopi v drugem tednu bolezni, kot posledica ledvične odpovedi, obsežnih hemoragij ter motenj delovanja srca in pljuč (Levett in Haake, 2009).

2.4 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA LEPTOSPIROZE

2.4.1 Odvzem vzorca, transport in skladiščenje

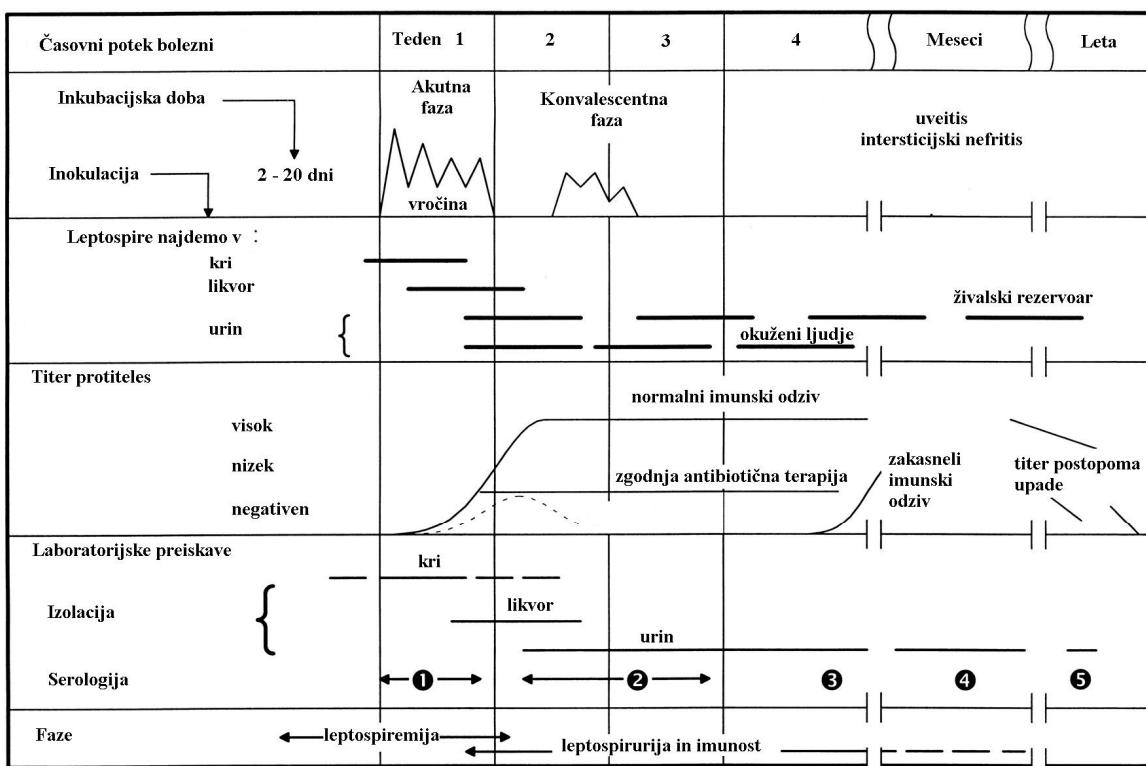
Izbira vzorca je odvisna od faze bolezni, vsekakor pa je priporočljivo, da klinični material odvzamemo čim prej v poteku bolezni (Levett in Haake, 2009).

V prvih 10 dnevih okužbe sta najprimernejša vzorca za dokaz prisotnosti leptospir kri in cerebrospinalna tekočina. Odvzeti ju moramo pred začetkom antibiotične terapije. Krvi, ki je namenjena za hemokulturo, je potrebno dodati heparin, ki preprečuje strjevanje (WHO, 2003).

V drugem tednu bolezni se začnejo leptospire izločati z urinom, zato le ta postane najprimernejši vzorec. Potrebna je pazljivost pri odvzemu urina, saj v primeru kontaminacije ostale bakterije hitro prrastejo leptospire v gojišču (Farr, 1995).

Vzorce je potrebno čim prej inokulirati v gojišče, še posebej v primeru kislega urina, saj ima ta inhibitoren učinek na rast leptospir (Levett, 2001). Po približno 7-10 dneh od pričetka bolezni pride do pojava protiteles, zato se v drugem tednu bolezni odvzame kri za serološke preiskave. Za ugotavljanje titra protiteles sta potrebna dva vzorca, in sicer iz akutne in rekonvalescentne faze (Kaufmann in Weyant, 2009).

V primeru smrti bolnika analiziramo vzorce tkiv kot so jetra, ledvice in možgani. V takšnem primeru je vzorce potrebno odvzeti in inokulirati v gojišče najpozneje 4 ure od nastopa smrti, saj v nasprotnem primeru litični procesi hitro uničijo leptospire. Transport in shranjevanje kužnin morata potekati pri 4 °C (Kaufmann in Weyant, 2009). Potek bolezni in diagnostične pristope za potrditev okužbe kaže slika 4.



Slika 4: Časovni potek leptosiroze in diagnostični postopki za potrditev okužbe (Levett, 2001)

2.4.2 Ugotavljanje prisotnosti leptospir z mikroskopiranjem

Prisotnost leptospir v kliničnih vzorcih lahko dokažemo direktno, z mikroskopiranjem v temnem polju in fluorescenčno mikroskopijo. Mikroskopske preparate pripravimo iz vzorcev krvi, urina, cerebrospinalne tekočine in dializata (Cinco, 2010).

Mikroskopiranje v temnem polju je hitra in enostavna metoda, a je zaradi nizke specifičnosti in občutljivosti potrebna sočasna uporaba drugih metod za potrditev diagnoze. Največjo težavo predstavljajo vzorci z nizko koncentracijo leptospir, saj je meja detekcije 10^4 leptospir/mL. Posebna pozornost je potrebna pri mikroskopiranju preparatov krvi, saj lahko neizkušenega opazovalca zavede gibanje fibrina in ostalih proteinskih vlaken, kar pripelje do lažno pozitivnega rezultata. Slabost metode je tudi nezmožnost razlikovanja med patogenimi in saprofitnimi leptospirami (Levett, 2001).

Imunofluorescenčna mikroskopija temelji na zaznavanju leptospir s pomočjo protiteles, ki so konjugirana s fluorokromi, kar zviša občutljivost metode. Uporaba imunofluorescenčnih tehnik je razširjena predvsem v veterini (Ahmad in sod., 2005).

2.4.3 Izolacija leptospir

Klinične vzorce je potrebno v roku 24 ur inokulirati v epruvete s poltrdim gojiščem. Obstajajo številna gojišča za izolacijo leptospir, kot so EMJH, Fletcher in Stuart. Najpogosteje uporabljen je gojišče EMJH, ki je sestavljeno iz osnovnega in obogatitvenega medija (WHO, 2003).

V klinični mikrobiologiji je zaželena uporaba selektivnih gojišč, saj je klinični material velikokrat kontaminiran. Selektivnost EMJH gojišča se največkrat poveča z dodatkom 5-fluorouracila, lahko pa tudi z različnimi antibiotiki, ki zavirajo rast kontaminant, a ne vplivajo na leptospire. Takšni antibiotiki so neomicin, kanamicin in amfotericin B. V primeru kontaminacije je potrebno kulturo prefiltrirati skozi 0,2 ali 0,45 µm filter ter jo nato precepiti v sveži medij (Levett, 2001; Rittenberg, 1958).

V fazi leptospiremije so za postavitev diagnoze uporabne hemokulture. Gre za postopek, pri katerem bolnikovo kri vbrizgamo v tekoče gojišče z namenom, da bi namnožili bakterije, ki povzročajo bolezensko stanje. Inokulum je ponavadi majhen, saj so v krvi prisotne snovi, ki bi lahko zavirale rast bakterij (WHO, 2003).

V 10 mL poltrdega gojišča se doda 5-10 kapljic krvi, nato pa se naredijo še 3 redčitve, tako da je koncentracija inhibitornih snovi kar se da majhna. Zaradi nizke koncentracije bakterij v vzorcih je najboljši način za uspešno izolacijo ta, da z vsakim vzorcem inokuliramo 3-5 epruvet (Ahmad in sod., 2005).

Kulture leptospir inkubiramo 8 tednov in jih tedensko pregledujemo pod mikroskopom v temnem polju, preden jih opredelimo kot negativne. V primeru, da je koncentracija leptospir manjša od 10^7 /mL, gojišče ostane bistro, ko pa koncentracija preseže 10^9 bakterij/mL gojišče pomotni (Levett, 2001).

Za shranjevanje kultur sta najprimernejša medija EMJH in Stuartovo gojišče. V temi shranjene kulture je potrebno precepiti vsake 3 mesece. Za daljše shranjevanje je najprimernejša zamrznitev v tekočem dušiku. Liofilizacija leptospir se ne priporoča (Ahmad in sod., 2005; WHO, 2003).

2.4.4 Serološke metode

Večina primerov leptosiroze se diagnosticira s serološkimi metodami, pri katerih s pomočjo znanega antiga ugotavljamo prisotnost protiteles in obratno. Protitelesa se pojavijo v serumu 5-7 dan po nastopu simptomov, kar predstavlja problem pri težjih primerih leptosiroze, kjer lahko smrt bolnika nastopi pred pojavom protiteles (Ahmad in sod., 2005).

Od seroloških metod se najpogosteje uporablja mikroaglutinacijski test (MAT) in encimsko-imunska metoda (ELISA). Za uspešno postavitev diagnoze je velikokrat potrebna še vzporedna ali zaporedna uporaba ostalih diagnostičnih metod (Levett in Haake, 2009).

Za ugotavljanje titra protiteles potrebujemo dva vzorca serum, odvzeta v akutni in rekonvalescentni fazi. Štirikratni porast titra pomeni pozitiven rezultat. V akutni fazi bolezni je velika navzkrižna reaktivnost med posameznimi serološkimi skupinami, zato se občasno odvzame še tretji vzorec, ki služi za natančno opredelitev serološke skupine (Levet, 2001; Levett in Haake, 2009).

2.4.4.1 Mikroaglutinacijski test

Mikroaglutinacijski test (MAT) je referenčna metoda pri diagnostiki leptosiroze. Reakcijo mikroaglutinacije izvedemo tako, da serum bolnika s sumom na leptosirozo, pomešamo s kulturo leptospir ter opazujemo stopnjo aglutinacije z mikroskopiranjem v temnem polju. Na podlagi ocene stopnje aglutinacije določimo titer protiteles, ki je opredeljen kot največja razredčina serum, pri kateri je 50 % leptospir prostih v suspenziji, preostalih 50 % pa aglutiniranih. Pri pozitivnih vzorcih pride do 4-kratnega porasta titra (med akutnim in rekonvalescentnim serumom) (Sehgal in sod., 1999).

Specifična protitelesa se pri leptosirozi pojavijo šele v drugem tednu okužbe. Občutljivost MAT v prvem tednu bolezni je 41 %, v drugem 82 %, v tretjem in četrtem pa naraste na 96 % (Sehgal in sod., 1999).

Čeprav je največ primerov leptosiroze potrjenih z MAT, ima tudi številne pomanjkljivosti. Za izvedbo testa je potrebno imeti anigen v obliki živih leptospir, kar predstavlja možen vir okužbe za laboratorijske delavce (WHO, 2003). Vsak laboratorij ima omejen nabor referenčnih sevov za MAT, s katerimi testira serume. Ponavadi zbirka zajema samo tiste serovare leptospir, ki so lokalno razširjeni, zato negativen rezultat MAT še ne pomeni odsotnosti okužbe z leptospirami – lahko da gre za okužbo z serovarom, ki ga ni v zbirki (WHO, 2003). Interpretacija rezultatov je zelo zahtevna, zaradi visoke stopnje navzkrižne reaktivnosti med posameznimi serološkimi skupinami. Testa ne moremo standardizirati, zato ga je priporočljivo uporabljati v kombinaciji z ostalimi analitskimi metodami (Ahmad in sod., 2005).

Ostale serološke metode, ki se uporablajo manj pogosto so: indirektna hemaglutinacija (IHA), indirektni imunofluorescentni test, lateksna aglutinacija ter hitri testi na podlagi serologije - »dipstick« testi (Terpstra, 2003).

2.4.4.2 Referenčni sevi leptospir

Za izvedbo MAT testa potrebujemo zbirko referenčnih sevov leptospir. Njihovo vzdrževanje je dokaj zahtevno, poleg tega pa je potrebno redno izvajanje kontrole, s katero potrdimo identiteto seva (Cerquiera in sod., 2010).

Glavni problemi, ki se pojavljajo v zvezi z referenčnimi sevi so:

- kontaminacija z drugimi bakterijskimi vrstami,
- kontaminacija s saprofitnimi leptospirami,
- napačno označevanje in zamenjave vzorcev.

Idealno bi bilo, če bi laboratoriji rutinsko preverjali kvaliteto referenčnih sevov z monoklonskimi protitelesi ali s sekveniranjem gena za 16S rRNA (Cerquiera in sod., 2010).

2.4.5 Molekularne metode za dokaz okužbe in identifikacijo leptospir

2.4.5.1 Molekularne metode za dokaz okužbe

Za uspešno zdravljenje leptospiroze so potrebne občutljive in specifične laboratorijske metode, ki zagotavljajo hitro postavitev diagnoze in s tem omogočijo pravočasno uvedbo ustrezne antibiotične terapije. Tem kriterijem najbolj ustreza molekularno-biološke metode, s katerimi dokazujemo prisotnost DNA leptospir v kliničnih vzorcih (Hookey, 1992; Levett, 2001).

Pri leptospirozi predstavlja problem nizko število bakterij v kužnini, zaradi česar se je razvilo več diagnostičnih metod, ki temeljijo na pomnoževanju DNA (Levett, 2001).

Molekulo DNA v laboratorijski diagnostiki največkrat dokazujemo z verižno polimerazno reakcijo (PCR). Ključni del reakcije so kratka nukleotidna zaporedja - oligonukleotidni začetniki, ki se vežejo na DNA in skupaj s termostabilnim encimom polimerazo omogočajo pomnoževanje tarčnih genov (Brown in sod., 1995).

Celoten postopek zajema izolacijo DNA iz bakterijske kulture ali kliničnega vzorca, reakcijo pomnoževanja DNA ter na koncu zaznavanje PCR produktov in ovrednotenje rezultatov. DNA leptospir lahko izoliramo iz krvi, urina, cerebrospinalne tekočine, očesne tekočine in različnih tkiv (Brown in sod., 1995).

Reakcija pomnoževanja DNA zajema tri korake. Začne se z denaturacijo tarčne DNA, pri čemer se verigi dvojne vijačnice ločita, kar ponavadi poteka pri višji temperaturi, oziroma je le ta odvisna od vsebnosti G-C baznih parov in dolžine tarčne DNA. Sledi prileganje oligonukleotidnih začetnikov pri temperaturi, ki je 3-5 °C nižja od temperature taljenja. Naslednja faza je podaljševanje verige ob prisotnosti dNTP-jev in termostabilne polimeraze, ki ima optimum delovanja 72 °C. Cikel se ponovi večkrat – dokler ne dosežemo želene koncentracije PCR produkta ali pa postane določena komponenta reakcije omejujoči dejavnik (WHO, 2003). Zaželeno je, da končani PCR reakciji sledi hibridizacija ali izvedba »nested« PCR, saj se s tem povečata občutljivost in specifičnost metode.

Pri »nested« PCR se izvedeta dve zaporedni reakciji, pri čemer PCR produkte prve reakcije uporabimo kot tarčno DNA v drugi reakciji. Največji problem te metode predstavlja velika možnost navzkrižne kontaminacije (Roux, 2009).

Občutljivost in specifičnost reakcije sta v veliki meri odvisni od oligonukleotidnih začetnikov, ki jih uporabimo. Tarči pomnoževanja sta največkrat gena za 16S in 23S rRNA, gen za protein LipL32, lahko pa tudi repetitivni elementi, kot sta na primer IS1533 in IS1500 (Levett, 2001).

Oligonukleotidna začetnika A in B, ki so ju pri raziskavi uporabili Merien in sod. (1992), pomnožujeta 331 bp dolg odsek gena za 16S rRNA (*rrs*) pri patogenih in saprofitnih leptospirah. Možnost kontaminacije kliničnih vzorcev s saprofitnimi leptospirami je sicer izredno majhna, a če bi do tega prišlo, bi z uporabljenem metodo posledično dobili lažno pozitiven rezultat (Mérien, 1992).

Gravekamp in sod. (1993) so na podlagi gena za 16S rRNA zasnovali oligonukleotidne začetnike G1/G2 in B64-I/B64-II. Par G1/G2 pomnožuje DNA *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. weillii*, *L. noguchii*, *L. santarosai* in *L. meyeri*, B64-I/ B64-II pa *L. kirschneri*. Pri primerjavi uspešnosti PCR reakcije z izolacijo so ugotovili, da je v določenih primerih prišlo do odstopanja, saj je bila izolacija uspešna, rezultat PCR pa kljub temu negativen. Navajajo, da so možni vzroki za lažno negativne rezultate naslednji:

- prisotnost inhibitorjev v vzorcu,
- nizka koncentracija bakterij v vzorcu,
- vzorci so bili večkrat odmrznjeni in zamrznjeni, kar je lahko vplivalo na razgradnjo DNA (Gravekamp in sod., 1993).

Podobno raziskavo, z istima paroma oligonukleotidnih začetnikov, je naredil tudi Brown s sod. (1995). Poleg izolacije in PCR so izvedli še MAT. Analizirali so 71 vzorcev, od katerih je dalo 48 % pozitiven rezultat pri izolaciji, 62 % pri PCR reakciji ter kar 97 % pri MAT. PCR je dal pozitiven rezultat pri vzorcih dveh bolnikov, ki sta umrla preden je prišlo do serokonverzije. Raziskava je potrdila, da ima PCR veliko vlogo v diagnostiki leptospiroze, še posebej v začetnih fazah bolezni, preden se pojavijo protitelesa (Brown in sod., 1995).

Razvitih je tudi več metod za zaznavanje DNA leptospir v realnem času. Njihova glavna prednost je, da lahko v relativno kratkem času zaznavamo in hkrati kvantificiramo leptospire v vzorcu. Za zaznavanje PCR produkta se uporablajo barvila in sonde, ki oddajajo fluorescenco. Od barvil se najpogosteje uporablja SYBR Green, ki se veže na dvoverižno DNA, zato fluorescenza narašča premo sorazmerno s količino PCR produkta. Slabost barvil je ta, da se vežejo na vso dvoverižno DNA, tudi na morebitne nespecifične produkte (Mérien in sod., 2005).

Možna je tudi uporaba TaqMan sond, katerih zaporedje je komplementarno tarčnemu delu DNA. Na 5' koncu imajo vezan fluorofor, na 3' koncu pa utiševalce oziroma inhibitor fluorescence. Ko se sonda veže na tarčno DNA, Taq polimeraza odcepi fluorofor, posledično se poveča fluorescenza, saj ni več inhibirana s strani utiševalca. Občutljivost reakcije, ob uporabi Taqman sond, je 10 leptospir/mL pri vzorcih urina in 2 leptospiri/mL za serum (Smythe in sod., 2002).

2.4.5.2 Molekularne metode za identifikacijo leptospir

Identifikacija serovara leptospir, ki povzroča okužbo, ni neposredno potrebna za uspešno zdravljenje bolnika. Uporabna je predvsem pri epidemioloških raziskavah in pri načrtovanju programov za preprečevanje širjenja bolezni (Ahmad in sod., 2005). Večina molekularnih metod za identifikacijo leptospir temelji na restrikciji DNA in ugotavljanju oligonukleotidnega zaporedja (Levett, 2001).

Med metode za genotipizacijo leptospir, pri katerih se uporablja encimska restrikcija DNA, prištevamo RFLP (angl. Restriction fragment length polymorphisms), REA (angl. Restriction enzyme analysis), PFGE (angl. Pulsed-field gel electrophoresis) in ribotipizacijo (Levett, 2001).

Pri RFLP se uporablajo restrikcijski encimi, ki razrežejo DNA leptospir v fragmente, na podlagi katerih lahko identificiramo posamezne seve. Dobljene fragmente ločimo z agarozno gelsko elektroforezo, kjer na gelu tvorijo značilen vzorec. Sorodnost med posameznimi sevi ugotovimo na podlagi primerjave vzorcev neznanih sevov z zanimi standardi (Terpstra, 2003).

Pri PFGE z restrikcijski encimi razrežemo genomsko DNA na večje fragmente, ki jih nato ločimo s pomočjo agarozne gelske elektroforeze. Restrikcijska endonukleaza, ki se najpogosteje uporablja za razgradnjo DNA leptospir je *Not I*. Za razliko od RFLP, pri tej metodi fragmenti potujejo v pulzirajočem električnem polju, kjer ob spremembri smeri električnega toka spremenijo smer svojega potovanja. Večji fragmenti težje spremenijo smer potovanja, zato po gelu potujejo počasneje. Prednost te metode je enostavna interpretacija, zaradi manjšega števila fragmentov na gelu (Galloway in Levett, 2008).

Pri ribotipizaciji gre za kombinacijo RFLP z metodo Southern blot. Fragmenti, ki jih dobimo po encimski restrikciji ločimo na agaroznem gelu, nato jih prenesemo na membrano in hibridiziramo s sondom, katera se veže na gen za 16S ali 23S rRNA. Na koncu dobimo odtis (angl. Fingerprint), ki je dokaj enostaven za interpretacijo (Terpstra, 2003). Večina serovarov pri ribotipizaciji ustvari unikatni vzorec odtisov, na podlagi katerih jih lahko razlikujemo. Slednje ne velja za serovare, ki so znani po tem, da so tesno genetsko povezani, kot sta na primer serovara *Icterohaemorrhagiae* in *Copenhageni* (Tamai in sod., 1988).

Glavna slabost restrikcijskih metod je ta, da za izvedbo zahtevajo velike količine očiščene DNA, kar pri leptospirozi predstavlja problem, saj so bakterije v kužnini prisotne v nizkem številu (Levett, 2001).

Tipizacija zaporedij multiplih lokusov (MLST) je ena izmed novejših metod ugotavljanja nukleotidnega zaporedja in je uporabna predvsem v epidemioloških raziskavah (Levett in Haake, 2009). Metoda temelji na analizi zaporedij polimorfizmov v visoko ohranjenih genih in zato predstavlja učinkovito orodje za ugotavljanje genetske povezanosti med posameznimi organizmi znotraj iste vrste. Postopek je sestavljen iz PCR reakcije in sekveniranja (Ahmed in sod., 2006).

Metode kot so REA, PFGE in RFLP, za izvedbo zahtevajo večje količine čiste DNA, poleg tega je njihova ponovljivost slaba, rezultati zahtevni za interpretacijo, prenos podatkov na različne informacijske medije pa težaven. MLST vse te težave zaobide, saj je enostavna za izvedbo in standardizacijo, rezultati so specifični, enostavna pa je sta tudi njihov prenos v baze podatkov in medlaboratorijska primerjava (Ahmed in sod., 2006).

2.4.6 Metode za razlikovanje med patogenimi in saprofitnimi leptospirami

Razlikovanje med patogenimi in saprofitnimi leptospirami je pomembno zaradi javnega zdravstva, epidemioloških raziskav in načrtovanja programov nadzora nad zoonozami (WHO, 2003). Status patogenosti leptospir je nemogoče oceniti na podlagi morfologije, zato se v ta namen uporablajo določene fenotipske ter genotipske laboratorijske metode (Mgode in sod., 2010).

Uporaba ene same metode ne zadostuje za zanesljivo razlikovanje med patogenimi in saprofitnimi leptospirami. Za opredelitev statusa patogenosti je potreben polivalenten pristop, še posebej zaradi pojavljanja novih vrst z intermediarnim statusom patogenosti (potencialno patogene leptospire) in vrst s kontraverznim taksonomskim statusom (Mgode in sod., 2010).

2.4.6.1 Klasične metode za razlikovanje med patogenimi in saprofitnimi leptospirami

Patogene in saprofitne leptospire najpogosteje razlikujemo glede na občutljivost na 8-azogvanin, diferencialno rast pri 13 °C in konverzijo v sferično obliko v 1M NaCl. Možna pa je tudi uporaba seroloških metod ter testnih živali (Mgode in sod., 2010).

Purinski analog 8-azogvanin inhibitorno vpliva na sintezo RNA in s tem neposredno zavira sintezo encimov pri patogenih leptospirah. Priporočljiva koncentracija za diferenciacijo med patogenimi in nepatogenimi leptospirami je 225 µg/mL 8-azogvanina, kar predstavlja 2-krat večjo koncentracijo kot je potrebna za inhibicijo rasti patogenih leptospir in 4-krat manjšo od koncentracije, ki vpliva na saprofitne leptospire (Johnson in Rogers, 1964).

Leptospire, ki rastejo v prisotnosti 8-azogvanina, pri 13 °C in se v 1M raztopini NaCl pretvorijo v sferično obliko, so saprofitne (Johnson in Rogers, 1964; Nobaude in sod., 2002; Shukla in sod., 2003).

2.4.6.2 Molekularne metode za razlikovanje med patogenimi in saprofitnimi leptospirami

V nasprotju s klasičnimi metodami, ki so sicer zanesljive, a dolgotrajne, predstavljajo molekularne metode hitrejšo alternativo.

Protokol za razlikovanje med patogenimi in saprofitnimi leptospirami, ki smo ga uporabili v diplomski nalogi so objavili Murgia in sod. (1997). Njihov namen je bil najti zanesljivo metodo, s katero bi lahko v vzorcih površinske vode ločili patogene leptospire od saprofitnih. Kultivacijske metode se jim niso zdele ustrezne, saj je v površinskih vodah več saprofitnih leptospir, ki rastejo hitreje kot patogene, kar bi lahko vodilo v lažno negativne rezultate. Vse do takrat objavljene PCR metode so imele številne pomanjkljivosti - nekatere niso pomnoževale vseh serovarov, druge so pomnoževale patogene in nepatogene serovare, tretje so poleg leptospir pomnoževale tudi druge bakterijske vrste ali pa so bile prezapletene za rutinsko uporabo (Murgia in sod., 1997).

Oligonukleotidni začetniki za to raziskavo so bili osnovani na podlagi gena *rrs*, kateri nosi zapis za ribosomsko podenoto 16S. Uspešnost metode so testirali z uporabo referenčnih sevov patogenih in nepatogenih leptospir. Prišli so do ugotovitve, da oligonukleotidna začetnika Lepat1/Lepat2 pomnožujeta del gena *rrs* samo pri patogenih leptospirah, par Sapro1/Sapro2 pa samo pri nepatogenih leptospirah. Z omenjenima paroma oligonukleotidnih začetnikov so tudi dokazali heterogenost vrste s kontraverznim taksonomskim statusom - *L. meyeri* (Murgia in sod., 1997). Pred tem je namreč veljalo prepričanje, da *L. meyeri* vsebuje samo serovare nepatogenih leptospir, kljub temu pa so serovari Ranarum, Sofia in Perameles dali pozitiven rezultat pri pomnoževanju z oligonukleotidnima začetnikoma Lepat1/Lepat2. Serovar Semaranga, ki spada v isto vrsto pa se je pomnožil s Sapro1/Sapro2 (Murgia in sod., 1997). Izvedli so tudi »nested« PCR, pri kateri so produkte pomnoževanja z L3/L4, pomnožili še s kombinacijo oligonukleotidnih začetnikov L4/Lepat2 ter na tak način povečali občutljivost reakcije (Murgia in sod., 1997).

Prišli so do zaključka, da je PCR z oligonukleotidnimi začetniki Lepat1/Lepat2 in Sapro1/Sapro2, primerna metoda za ugotavljanje prisotnosti patogenih leptospir v okoljskih in kliničnih vzorcih. Posebej uporabna je pri sumu, da so v kliničnem ali okoljskem vzorcu prisotne tako patogene kot saprofitne leptospire (Murgia in sod., 1997).

Noubade in sod. (2002) so za razlikovanje uporabili dva para oligonukleotidnih začetnikov, in sicer par A/B, ki je pomnoževal 331 bp dolg odsek patogenih in nepatogenih leptospir ter par G1/G2, ki je pomnoževal 285 bp dolg odsek pri patogenih leptospirah.

Rezultate dobljene s PCR metodo so nato primerjali tudi s klasičnimi metodami za razlikovanje med patogenimi in nepatogenimi leptospirami (rast pri 13 °C in rast v prisotnosti 8- azogvanina). Navajajo, da je od 27 vzorcev, ki so dali pozitiven rezultat pri PCR reakciji, izolacija leptospir uspela samo v 4 primerih. Prišli so do ugotovitve, da pomnoževanje s temi oligonukleotidnimi začetniki omogoča hitro, enostavno in specifično metodo za dokazovanje leptospir ter njihovo diferenciacijo (Noubade in sod., 2002).

Razvrstitev sevov med patogene in nepatogene leptospire omogoča tudi izvedba »multiplex« PCR v realnem času, kjer lahko z uporabo TaqMan sond v eni reakciji dokažemo prisotnost patogenih oziroma saprofitnih leptospir. Pri izvedbi se uporablja trije pari oligonukleotidnih začetnikov:

- za pomnoževanje dela gena za 16S rRNA, značilnega za rod *Leptospira*;
- za pomnoževanje genov *ligA/B*, ki so značilni za patogene leptospire,
- za pomnoževanje dela gena za 23S rRNA, značilenega za saprofitne leptospire

Gen *lig* je prisoten samo pri patogenih leptospirah in je virulentni faktor, saj omogoča adhezijo na gostiteljske celice (Bedir in sod., 2010).

Pri pomnoževanju gena *ligA/B* in 23S rRNA je občutljivost reakcije 10^2 bakterij/mL, pri pomnoževanju 16S rRNA pa 10 bakterij/mL. Specifičnost reakcije je bila preverjena z 10 drugimi bakterijskimi vrstami, ki pa so vse dale negativen rezultat (Bedir in sod., 2010).

Metodo za sočasno razlikovanje patogenih in nepatogenih leptospir je razvil tudi Tansuphasiri s sod. (2006). Kot tarči pomnoževanja so uporabili visoko konservativna gena za LipL32 in 16S rRNA. LipL32 je glavni lipoprotein zunanje membrane pri patogenih leptospirah in ga pri nepatogenih leptospirah ne najdemo (Tansuphasiri in sod, 2006).

Simultano pomnoževanje dveh tarčnih genov so dosegli s sočasno uporabo dveh parov oligonukleotidnih začetnikov. Produkt pomnoževanja gena za LipL32 je bil velik 279 bp, pri 16S rRNA pa 430 bp. Patogene leptospire so dale pozitiven rezultat z obema paroma oligonukleotidnih začetnikov in tako tvorile produkte velikosti 279 in 430 bp, medtem ko se je pri nepatogenih leptospirah pomnožil samo gen za 16S rRNA (430 bp).

Poudarjajo, da je uspešnost PCR reakcije odvisna predvsem od čistosti izolirane DNA ter morebitne prisotnosti inhibitorjev (Tansuphasiri in sod., 2006).

Uspešnost metode so potrdili tudi Vital-Brazil in sod. (2010), ki so jo uporabili za razlikovanje med patogenimi in saprofitnimi leptospirami v vodnih vzorcih (Vital-Brazil in sod., 2010).

Uavechanichkul in sod. (2011) so opisali uporabo oligonukleotidnih začetnikov Lepto1, Lepto2 in Lepto3, s katerimi je možno v enem koraku razlikovati med saprofitnimi in patogenimi leptosirami. Glede na zaporedje gena za 16S rRNA (*rrs*) so najprej zasnovali dva oligonukleotidna začetnika - Lepto1 in Lepto2. Produkte pomnoževanja so ločili na poliakrilamidnem gelu, a ker njegova uporaba ni namenjena za rutinsko delo, so na podlagi gena *rrs* konstruirali še tretji oligonukleotidni začetnik - Lepto3. Tega so nato uporabili v kombinaciji z Lepto2, kar jim je omogočilo razlikovanje med patogenimi in saprofitnimi leptospirami glede na število fragmentov na agaroznem gelu. PCR produkt patogenih leptospir sta predstavljala dva fragmenta, v velikosti 409 in 503 bp, pri saprofitnih pa je bil le eden, in sicer velikosti 503 bp (Uavechanichkul in sod., 2011).

2.5 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE

2.5.1 Zdravljenje leptosiroze

Leptospire so dobro občutljive na antibiotike, zato je za uspešno zdravljenje bolezni potrebna čimprejšnja uvedba antibiotične terapije (Bedernjak, 1995).

Za zdravljenje leptosiroze se najpogosteje uporablja penicilin. Antibiotična terapija povzroči hiter padec vročine in izboljšanje splošnega stanja, prepreči nastanek meningitisa ter zmanjša možnosti za nastanek avtoimunskih zapletov. V primeru alergije na penicilin se lahko uporabita tetraciklin in doksiciklin. Slednji se lahko uporablja tudi kot kratkotrajna profilaksa. Bolnike z Weilovim sindromom, zaradi možnosti številnih zapletov zdravimo na oddelkih za intenzivno nego (Bedernjak, 1995).

2.5.2 Preprečevanje leptospiroze

Glavni preventivni ukrep je nadzor nad glodavci z redno in sistematično deratizacijo. Potrebno je izogibanje posrednem in neposrednim stikom z glodavci in njihovimi izločki. Osebe, ki opravljajo poklice z večjim tveganjem za okužbo, morajo uporabljati ustrezen zaščitno obleko, rokavice in škornje. Potrebna je tudi dobra higienska praksa na kmetijah, v skladiščih, klavnicih in mlekarnah. Priporoča se izogibanje kopanju v higiensko oporečnih, predvsem stoječih vodah (Bedernjak, 1993).

2.5.2.1 Cepljenje

Obsežne raziskave na področju razvoja cepiv za preprečevanje leptospiroze potekajo tako v veterini, kot tudi v humani medicini. Razvita so atenuirana, inaktivirana, rekombinantna in DNA cepiva. Atenuirana in inaktivirana cepiva so prevladovala v preteklosti. Ta cepiva sicer izzovejo primeren imunski odziv, a je vprašljiva njihova varnost (Wang in sod., 2007).

Uvedba genetskih metod predstavlja mejnik v razvoju cepiv, saj sta proizvodnja in čiščenje rekombinantnih cepiv zaradi njih enostavnejša, hkrati pa so takšna cepiva učinkovitejša in varnejša (Wang in sod., 2007). Poleg rekombinantnih cepiv so v razvoju tudi DNA cepiva. Do danes sta bili na živalih preizkušeni dve DNA cepivi, od katerih je eno vsebovalo gen za Hap1 (protein odgovoren za hemolizo), drugo pa gen za FlaB2 (endoflagelin pri leptospirah) (Wang in sod., 2007).

3 MATERIALI IN METODE

V diplomski nalogi smo uporabili 13 sevov leptospir, ki se rutinsko uporabljam pri serološki diagnostiki leptospiroze ter 116 sevov iz zbirke laboratorija, ki so jih pridobili bodisi iz referenčnih centrov ali drugih laboratorijs. Iz vsakega seva smo pridobili DNA in jo pomnožili v petih PCR reakcijah, pri katerih smo vsakič uporabili drug par oligonukleotidnih začetnikov.

3.1 MATERIALI

3.1.1 Sevi leptospir, ki se uporabljam za mikroaglutinacijski test (MAT)

V raziskavo smo vključili seve leptospir, ki se v Laboratoriju za diagnostiko boreloz in leptospiroze dnevno uporabljam pri rutinski diagnostiki in so prikazani v preglednici 1. Serovara 12 in 13 v času opravljanja diplomskega dela nista bila dosegljiva, zato nista bila vključena v raziskavo.

Preglednica 1: Sevi leptospir za mikroaglutinacijski test, ki smo jih uporabili v raziskavi

Serološka skupina (št./ ime)	Serovar	Sev
1. GRIPPOTYPHOSA	Grippotyphosa	Moskva V
2. CANICOLA	Canicola	Hond Utrecht IV
3. SEJROE	Sejroe	M84
4. POMONA	Pomona	Pomona
5. CYNOPTERI	Cynopteri	3522C
6. ICTEROHAEMORRHAGIAE	Copenhageni	Wijnberg
7. SEMARANGA	Patoc	Patoc 1
8. AUSTRALIS	Australis	Ballico
9. AUTUMNALIS	Autumnalis	Akiyami A
10. PYROGENES	Pyrogenes	Salinem

Se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 1: Sevi leptospir za mikroaglutinacijski test, ki smo jih uporabili v raziskavi

Serološka skupina (št./ime)	Serovar	Sev
11. BATAVIAE	Bataviae	Van Tienen
12. TARRASOVI – ni na voljo	Tarrasovi	Mitis Johnson
13. BALLUM – ni na voljo	Castellanis	Castellon 3
14. PANAMA	Panama	CZ 214 K
15. JAVANICA	Javanica	Veldart Batavia 46

3.1.2 Sevi leptospir iz zbirke laboratorija

Analizirali smo 116 sevov leptospir, ki predstavljajo del zbirke leptospir Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo (IMI), Laboratorija za diagnostiko boreloz in leptosiroze. Nekatere med njimi so pridobili iz:

- Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarske fakultete Sveučilišta u Zagrebu, Laboratorij za leptospire (ZG);
- Inštituta Pasteur v Parizu (P);
- Royal Tropical inštituta v Amsterdamu (A);
- Laboratorija Veterinarske fakultete Ljubljana (LJ).

Število uporabljenih sevov leptospir ter skupno število vzorcev DNA, ki smo jih uporabili v raziskavi, je prikazano v preglednici 2.

Preglednica 2: Število sevov leptospir ter vzorcev DNA, uporabljenih pri raziskavi

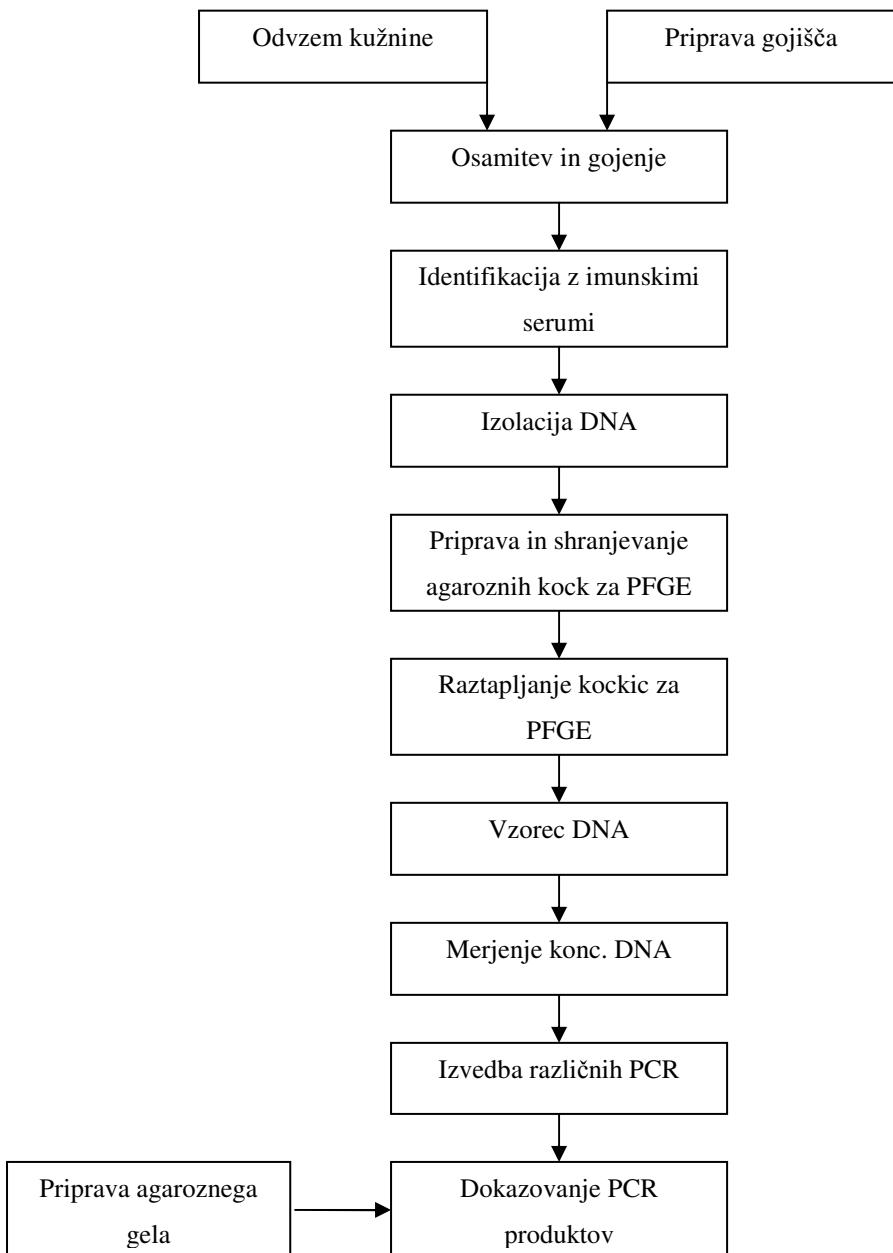
Sevi leptospir oz. vzorci DNA	Število
Skupno število sevov	116
- Patogeni sevi	112
- Saprofitni sevi	4
Skupno število vzorcev DNA	151
- DNA patogenih leptospir	146
- DNA saprofitnih leptospir	5

Vsi uporabljeni sevi leptospir iz zbirke laboratorija so prikazani v prilogi B. Iz določenih sevov smo pripravili po 2 vzorca DNA, tako da smo skupno analizirali 151 vzorcev. Vzorci DNA označeni s številko in črko (npr. 1A) so bili pridobljeni iz agaroznih kockic, medtem ko so bili vzorci, ki imajo v oznaki /1 (npr. 1A/1), pridobljeni iz istega seva, vendar izolirani po klasični metodi iz kulture (Priloga B). Iz določenih sevov je bila DNA izolirana samo po klasični metodi iz kulture. Ti vzorci so označeni samo s številko.

3.2 METODE

Osamitev in identifikacijo leptospir, izolacijo DNA ter njeno shranjevanje v obliki agaroznih kock, je predhodno izvedlo osebje Laboratorija za diagnostiko borelioza in leptospirose (IMI). Moje raziskovalno delo se je začelo z raztapljanjem agaroznih kockic, v katerih je bila DNA leptospir.

Vse metode, uporabljenе pri raziskovalnem delu, so podrobneje opisane v spodnjih podpoglavljih. Shema raziskovalnega dela je predstavljena na sliki 5.



Slika 5: Shema raziskovalnega dela

3.2.1 Priprava gojišča EMJH

Za gojitev leptospir so uporabili gojišče EMJH. Pripravili so ga tako, da so zatehtali 2,3 g osnovnega medija (Difco™ Leptospira Medium Base EMJH) in mu dodali 900 mL deionizirane vode. Podrobnejša sestava osnovnega gojišča EMJH je prikazana v preglednici 3.

Dobljeno raztopino so avtoklavirali 15 minut pri 121 °C, jo ohladili na sobno temperaturo ter aseptično dodali 100 mL suplementa z albuminom. Gojišče so preko 0,22 µL filtra razdelili v sterilne epruvete, ki so jih nato 24 ur inkubirali pri 37 °C ter na tak način preverili njihovo sterilnost (WHO, 2003).

Preglednica 3: Sestava osnovnega gojišča Ellinghousen McCullough modificirano po Johnson in Harris (Johnson in Harris, 1967)

Sestavina	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 Gojenje leptospir

Seve leptospir so gojili v gojišču EMJH. Inkubacija je potekala v temi, pri 28 °C. Kulture leptospir so tedensko pregledovali z mikroskopiranjem v temnem polju, vsake 3-4 tedne pa so jih tudi precepili (Levett, 2001).

3.2.3 Identifikacija leptospir z imunskimi serumi

Vse kulture leptospir so identificirali s pomočjo aglutinacije z različnimi imunskimi serumi, pri čemer so posamezen izolat testirali z vsakim imunskim serumom iz zbirke Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo ter ga na podlagi tega uvrstili v ustrezno serološko skupino, kot je prikazano v preglednici 1.

Serume in kulture so pred začetkom testa razredčili na primerno koncentracijo. Serume so pripravili tako, da so v 960 µL fiziološke raztopine dodali 40 µL seruma ter tako dobili redčitev 1:25. Kulturo leptospir so redčili v razmerju 1:1 (1 µL fiziološke raztopine + 1 µL kulture leptospir). Test so izvedli na mikrotitrni ploščici, kjer so v prvo vdolbinico odpipetirali 50 µL kulture leptospir, v drugo 25 µL seruma in 25 µL kulture, v tretjo pa 25 µL fiziološke raztopine, 25 µL seruma in 50 µL kulture.

Vsebino tretje vdolbinice so premešali, nato pa odstranili 50 µL. Tako so dobili v drugi vdolbinici razredčino 1:50, v tretji pa 1:100. Sledila je inkubacija 45 minut do 1 ure pri 37 °C. Po končani inkubaciji so iz vsake luknjice prenesli 10 µL na objektno stekelce in rezultat reakcije preverili z mikroskopiranjem v temnem polju pri 160-kratni povečavi. Test so označili kot pozitiven v primeru, ko je bilo aglutiniranih več kot 50 % leptospir.

Pri pozitivnem titru 1:100 so serum redčili naprej v mikrotitrski ploščici. Prva vdolbinica je služila kot kontrola, saj so vanjo odpipetirali 50 µL redčene kulture leptospir. V vdolbinice od 2 do 9 so odpipetirali po 25 µL fiziološke raztopine, nato pa v drugo vdolbinico dodali še 25 µL seruma. Iz druge vdolbinice so nato prenesli 25 µL v tretjo ter nadaljevali do devete, iz katere so na koncu 25 µL zavrgli. Tako so dobili zaporedje redčitev: kontrola, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800. V vdolbinice od 2 do 9 so na koncu dodali še 25 µL redčene kulture leptospir. Sledila je inkubacija od 45 minut do 1 ure, pri 37 °C. Rezultate reakcije so ovrednotili z mikroskopiranjem v temnem polju pri 160-kratni povečavi. Odčitali so najvišji titer protiteles, pri katerem so še zaznali aglutinacijo leptospir. Serološko so opredelili serovar leptospire tako, da je pripadala tistemu serovaru, katerega serum je aglutiniral leptospire pri najvišji redčitvi (Ahmad in sod., 2005).

3.2.4 Izolacija DNA

DNA leptospir je bila izolirana iz bakterijskih kultur, in sicer na dva načina. Pri prvem je šlo za klasično izolacijo DNA iz bakterijske kulture, pri drugem pa je bila uporabljen metoda izolacije DNA z inkorporacijo v gelu. Oba postopka sta bila izvedena po internem protokolu Laboratorija za diagnostiko borelioze in leptospirose.

3.2.4.1 Izolacija DNA iz bakterijske kulture

Izolacija DNA iz bakterijske kulture se izvaja v prostoru, kjer delamo z bakterijsko kulturo. Postopka se ne sme izvajati v prostoru, namenjenemu izolaciji DNA iz kliničnih vzorcev, zaradi možnosti pojava lažno pozitivnih rezultatov v primeru kontaminacije površin ali reagentov.

Za izolacijo so uporabili 1 mL bakterijske kulture, ki so ga prenesli v mikrocentrifugirko in centrifugirali 10 minut pri 10.000 obratih. Odlili so supernatant in 2-krat sprali sediment s pufrom PBS. Po spiranju so usedlini dodali 100–500 µL vode. Količina dodane vode je bila odvisna od začetne količine kulture, in sicer so je dodali toliko, da je bila raztopina na videz mlečno bleda. Mikrocentrifugirko so postavili v termoblok, segret na 95 °C in vzorec inkubirali 15 minut. Po inkubaciji so vzorec takoj zamrznili na -20 °C (Levett, 2001).

3.2.4.2 Izolacija DNA iz bakterijske kulture za pripravo agaroznih kockic

Za pripravo agaroznih kockic s kromosomsko DNA leptospir je potrebnih vsaj 10 epruvet z rastočo bakterijsko kulturo (v gojišču EMJH). Vsak vzorec so pregledali v temnem polju ter tako določli število, vitalnost in možne kontaminante. Neustrezne epruvete so zavrgli, druge pa so združili in centrifugirali 10 minut pri 10.000 obratih. Supernatant so odlili, usedlino pa 3-krat sprali s TN pufrom. Koncentracijo leptospir so določili spektrofotometrično pri OD₅₉₅.

Sledila je priprava agaroznih kockic, za katere so najprej pripravili 2 % agarozo z nizko temperaturo tališča (angl. Low melting point agarose), kateri so dodali TN pufer.

Nato so zmešali enako količino vzorca (bakterijska kultura v pufru TN) in pripravljene agaroze, premešali ter pustili v termobloku pri 85 °C. Dobljeno mešanico bakterijskih celic in agaroze so nalili v modelčke za kockice. Te so potem za 30 minut dali v hladilnik, da so se strdile. Tako dobljene agarozne kockice so potopili v pufer za lizo leptospir in jih inkubirali 24 ur pri 37 °C, na stresalniku (80-100 obratih/min). Po končani inkubaciji so kockice sprali s TE pufrom, nato pa jih prenesli v pufer za digestijo borelij. Inkubacija v pufru za digestijo je trajala 72 ur pri 50 °C, na stresalniku (80-100 obratih/min).

Po končani inkubaciji je sledilo 5-kratno spiranje s pufrom TE, vsakič po 1 uro. Po zaključenem spiranju so agarozne kockice spravili v TE pufru, na 4 °C (Herrmann in sod., 1992). Po celotnem postopku so dobili celotno leptospirino DNA v agarozi in to smo lahko ohranili dlje časa za nadaljnje molekularno delo.

3.2.5 Pridobivanje DNA iz agaroznih kockic

Iz pripravljenih agaroznih kock smo od posamezne kocke odščipnili delček in ga dali v mikrocentrifugirko. Dodali smo $300 \mu\text{L}$ vode, nato pa smo mikrocentrifugirko postavili v termoblok, ki smo ga predhodno segreli na 95°C . Vzorec smo v termobloku inkubirali 15 minut in ga takoj po končani inkubaciji zamrznili na -20°C .

3.2.6 Priprava redčitev DNA

Želeli smo ugotoviti kakšna je najmanjša koncentracija DNA, ki s posameznimi oligonukleotidnimi začetniki še da pozitiven rezultat, zato smo pripravili redčitve DNA sevov za MAT.

Vse vzorce smo redčili v razmerju 1:1, kar pomeni, da smo v $100 \mu\text{L}$ vode dodali $100 \mu\text{L}$ vzorca DNA. Vsak vzorec DNA sevov za MAT smo redčili do redčitve 1:1 048 576.

3.2.7 Merjenje koncentracije DNA z aparaturom NanoDrop

Koncentracijo DNA v vzorcih in njihovih redčitvah smo ugotavljali s pomočjo širokospikalnega spektrofotometra NanoDrop 1000. Njegovo delovanje temelji na tehnologiji optičnih vlaken, kar omogoča meritve koncentracije DNA z veliko natančnostjo in ponovljivostjo. Vir svetlobe predstavlja pulzna ksenonska žarnica, podatke o svetlobi, ki prodira skozi vzorec pa zbira senzor. NanoDrop je povezan z računalnikom, na katerem je nameščena programska oprema, ki omogoča zaznavanje in obdelavo signalov ter meritve.

Z meritvami smo dobili podatke o koncentraciji DNA v $\text{ng}/\mu\text{L}$ pri 260 nm . Pred začetkom izvajanja meritev smo vse vzorce pretresli na mešalniku.

Meritve smo izvedli tako, da smo odpipetirali $1 \mu\text{L}$ vzorca na spodnjo optično enoto in prislonili zgornjo optično enoto, da je prišla v stik z vzorcem. Vzorec je tvoril most med zgornjo in spodnjo optično enoto, kar je omogočilo izvedbo meritve. Na začetku smo aparat umerili s tekočino v kateri so raztopljeni vzorci DNA – v našem primeru je bila to voda NF (angl. Nuclease free water). Zaradi večje natančnosti smo aparat umerili na vsakih 10 meritev.

Koncentracijo DNA smo izmerili pri vseh vzorcih, ki smo jih pozneje uporabili v reakcijah pomnoževanja.

3.2.8 Pomnoževanje DNA leptospir

DNA leptospir smo testirali s petimi različnimi pari oligonukleotidnih začetnikov, in sicer z L3/L4, L4/LPato2, LeptoA/LeptoB, Lepat1/Lepat2 ter Sapro1/Sapro2, od katerih vsi pomnožujejo odseke gena *rrs*. Pari LeptoA/LeptoB, L3/L4 in L4/LPato2 se rutinsko uporablajo pri diagnostiki leptospiroze v Laboratoriju za diagnostiko borelioze in leptospiroze (IMI), para Lepat1/Lepat2 ter Sapro1/Sapro2 pa sta bila testna.

V preglednici 4 je prikazano, kateri par oligonukleotidnih začetnikov je specifičen za katero skupino leptospir (Merien in sod., 1992; Murgia in sod., 1997).

Preglednica 4: Oligonukleotidni začetniki, specifični za pomnoževanje bodisi patogenih ali saprofitnih leptospir

	L3/L4	L4/LPato2	LeptoA/B	Lepat1/2	Sapro1/2
Patogene leptospire	x	x	x	x	
Saprofitne leptospire			x		x

Vse PCR reakcije so poleg testnih vzorcev vključevale tudi pozitivno in negativno kontrolo. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili DNA leptospir, kot negativno pa sterilno destilirano vodo.

Vse oligonukleotidne začetnike je sintetiziralo podjetje TIB MOLBIOL (Nemčija); PCR reakcije smo izvajali na napravi T3 Thermocycler (Biometra, Goettingen, Nemčija). Ostale reagente ($MgCl_2$, PCR pufer, Taq polimeraza) je proizvedlo podjetje Qiagene (Hilden, Nemčija).

3.2.8.1 »Nested« PCR z oligonukleotidnimi začetniki L3/L4 in L4/LPato2

»Nested« PCR z oligonukleotidnimi začetniki L3/L4 in L4/LPato2 smo izvedli z namenom potrditve ustreznosti sevov za nadaljnje raziskave. Ker gre za že preizkušeno metodo, ki se uporablja v rutinski diagnostiki, smo z njo testirali samo 8 sevov za MAT. Vključili smo serovare Grippotyphosa, Canicola, Sejroe, Pomona, Cynopteri, Icterohaemorrhagiae, Semaranga in Australis, kateri se rutinsko uporabljajo pri MAT. Najprej smo DNA pomnožili z oligonukleotidnima začetnikoma L3/L4. V primeru, da so bili rezultati pomnoževanja negativni, smo s produkti pomnoževanja izvedli še »nested« PCR z L4/LPato2 in na tak način potrdili patogeni status leptospir (Murgia in sod., 1997).

3.2.8.1.1 PCR z oligonukleotidnima začetnikoma L3/L4

Oligonukleotidna začetnika L3/L4 pomnožujeta gen *rrs* patogenih leptospir. Produkt pomnoževanja je dolg 640 bp. Sestava uporabljene reakcijske mešanice je prikazana v preglednici 5, pogoji PCR reakcije pa v preglednici 6.

Preglednica 5: Sestava reakcijske mešanice za polimerazno verižno reakcijo z oligonukleotidnima začetnikoma L3/L4

Reagent	Koncentracija	Količina
voda		17 µL
pufer	1x	5 µL
MgCl ₂	1,5 mM	4 µL
dNTP	200 µM	4 µL
Oligonukleotidni začetnik L3	0,5 µM	5 µL
oligonukleotidni začetnik L4	0,5 µM	5 µL
Taq polimeraza	1,25 U	0,25 µL
Skupaj		40 µL
vzorec DNA		10 µL
Skupaj		50 µL

Preglednica 6: Pogoji za polimerazno verižno reakcijo pri uporabi oligonukleotidnih začetnikov L3/L4

Stopnja reakcije	Temperatura	Časovni interval	Ponovitve
Začetna denaturacija	93 °C	3 min	1x
Denaturacija	93 °C	1 min	
Prileganje oligonukleotidnih začetnikov	57 °C	1 min	35x
Podaljševanje verige	72 °C	1 min	
Končno podaljševanje	72 °C	9 min	1x
Shranjevanje	4 °C	∞	

3.2.8.1.2 PCR z oligonukleotidnima začetnikoma L4/LPato2

Oligonukleotidna začetnika L4/LPato2 sta specifična za patogene leptospire. Gre za vgnezdena oligonukleotidna začetnika, saj je njuna tarča pomnoževanja odsek znotraj gena, ki ga pomnožujeta L3/L4. PCR produkt je dolg 270 bp. Sestava uporabljeni reakcijske mešanice je prikazana v preglednici 7, pogoji PCR reakcije pa v preglednici 8.

Preglednica 7: Sestava reakcijske mešanice za polimerazno verižno reakcijo z oligonukleotidnima začetnikoma L4/LPato2

Reagent	Koncentracija	Količina
voda		26 µL
pufer	1x	5 µL
MgCl ₂	1,5 mM	3 µL
dNTP	200 µM	2,5 µL
oligonukleotidni začetnik L4	0,5 µM	5 µL
oligonukleotidni začetnik LPato2	0,5 µM	5 µL
Taq polimeraza	1,25 U	0,25 µL
Skupaj		46,75 µL
Vzorec DNA		3 µL
Skupaj		50 µL

Preglednica 8: Pogoji za polimerazno verižno reakcijo pri uporabi oligonukleotidnih začetnikov L4/LPato2

Stopnja reakcije	Temperatura	Časovni interval	Ponovitve
Začetna denaturacija	93 °C	3 min	1x
Denaturacija	93 °C	1 min	
Prileganje oligonukleotidnih začetnikov	52 °C	1 min	35x
Podaljševanje verige	72 °C	1 min	
Končno podaljševanje	72 °C	9 min	1x
Shranjevanje	4 °C	∞	

3.2.8.2 PCR z oligonukleotidnima začetnikoma LeptoA/LeptoB

Oligonukleotidna začetnika LeptoA/LeptoB pomnožujeta DNA vseh leptospir, patogenih in saprofitnih. Produkt pomnoževanja je dolg 331 bp.

Z LeptoA/LeptoB smo pomnožili DNA sevov za MAT, redčitve DNA sevov za MAT ter 105 vzorcev DNA, pridobljenih iz sevov laboratorijske zbirke leptospir. Vseh vzorcev nismo testirali, saj se LeptoA/LeptoB uporablja pri rutinski diagnostiki, tako da so bili že vsi predhodno testirani z omenjenima oligonukleotidnima začetnikoma.

V preglednici 9 sta prikazani nukleotidni zaporedji obeh oligonukleotidnih začetnikov, v preglednici 10 sestava reakcijske mešanice, preglednica 11 pa vsebuje pogoje reakcije (Merien in sod., 1992).

Preglednica 9: Nukleotidni zaporedji oligonukleotidnih začetnikov LeptoA/LeptoB

Oligonukleotidni začetnik	Zaporedje
LeptoA	5' – GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG – 3'
LeptoB	5' – TTC CCC CCA TTG AGC AAG ATT – 3'

Preglednica 10: Sestava reakcijske mešanice za polimerazno verižno reakcijo z oligonukleotidnima začetnikoma LeptoA/LeptoB

Reagent	Začetna koncentracija	Končna koncentracija	Količina
voda			23 µL
pufer	10x	1x	5 µL
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	3 µL
dNTP	10 mM	200 µM	4 µL
oligonukleotidni začetnik LeptoA	1 µM	0,1 µM	5 µL
oligonukleotidni začetnik LeptoB	1 µM	0,1 µM	5 µL
Taq polimeraza	250 U	1,25 U	0,25 µL
VZOREC			5 µL
Skupaj			45,75 µL

Preglednica 11: Pogoji za polimerazno verižno reakcijo pri uporabi oligonukleotidnih začetnikov LeptoA/LeptoB

Stopnja reakcije	Temperatura	Časovni interval	Ponovitve
Začetna denaturacija	93 °C	3 min	1x
Denaturacija	93 °C	1 min	
Prileganje oligonukleotidnih začetnikov	60 °C	1 min	35x
Podaljševanje verige	72 °C	1 min	
Končno podaljševanje	72 °C	9 min	1x
Shranjevanje	4 °C	∞	

3.2.8.3 PCR z oligonukleotidnima začetnikoma Lepat1/Lepat2

Za dokaz patogenih leptospir smo preizkusili oligonukleotidna začetnika Lepat1/Lepat2, ki pomnožujeta gen *rrs* izključno pri patogenih leptospirah. Produkt pomnoževanja je dolg 330 bp. V preglednici 12 sta prikazani nukleotidni zaporedji obeh oligonukleotidnih začetnikov, v preglednici 13 sestava reakcijske mešanice, preglednica 14 pa vsebuje pogoje pri katerih je potekala reakcija (Murgia in sod., 1997).

Z oligonukleotidnima začetnikoma Lepat1/Lepat2 smo pomnožili DNA sevov za MAT, redčitve DNA sevov za MAT ter 151 vzorcev DNA sevov laboratorijske zbirke leptospir.

Preglednica 12: Nukleotidni zaporedji oligonukleotidnih začetnikov Lepat1/Lepat2

Oligonukleotidni začetnik	Zaporedje
Lepat1	5' – GAG TCT GGG ATA ACT TT – 3'
Lepat2	5' – TCA CAT YGC TGC TTA TTT T – 3'

Preglednica 13: Sestava reakcijske mešanice za polimerazno verižno reakcijo z oligonukleotidnima začetnikoma Lepat1/Lepat2

Reagent	Začetna koncentracija	Končna koncentracija	Količina
voda			7,89 µL
pufer	10x	1x	2,5 µL
MgCl ₂	25 mM	3 mM	3,0 µL
dNTP	25 mM	0,25 mM	0,25 µL
oligonukleotidni začetnik Lepat1	20 µM	0,504 µM	0,63 µL
oligonukleotidni začetnik Lepat2	20 µM	0,504 µM	0,63 µL
HotGoldstar	5U	0,5 U	0,1 µL
Skupaj			15,0 µL
VZOREC			10,0 µL
Skupaj			25,0 µL

Preglednica 14: Pogoji za polimerazno verižno reakcijo pri uporabi oligonukleotidnih začetnikov Lepat1/Lepat2

Stopnja reakcije	Temperatura	Časovni interval	Ponovitve
Začetna denaturacija	95 °C	10 min	1x
Denaturacija	93 °C	1 min	35x
Prileganje oligonukleotidnih začetnikov	48 °C	1 min	

Se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 14: Pogoji za polimerazno verižno reakcijo pri uporabi oligonukleotidnih začetnikov Lepat1/Lepat2

Stopnja reakcije	Temperatura	Časovni interval	Ponovitve
Podaljševanje verige	72 °C	1 min	35x
Končno podaljševanje	72 °C	9 min	1x
Shranjevanje	4 °C	∞	

3.2.8.4 PCR z oligonukleotidnima začetnikoma Sapro1/Sapro2

Prisotnost saprofitnih leptospir v vzorcu smo ugotavljali z oligonukleotidnima začetnikoma Sapro1/Sapro2, ki pomnožujeta *rrs* gen pri saprofitnih leptospirah. Po končani reakciji dobimo PCR produkt velikosti 247 bp. Z oligonukleotidnima začetnikoma Sapro1/Sapro2 smo pomnožili DNA sevov za MAT, redčitve DNA sevov za MAT ter 151 vzorcev DNA sevov laboratorijske zbirke leptospir. Nukleotidni zaporedji oligonukleotidnih začetnikov, sestava reakcijske mešanice in pogoji pri katerih je potekala reakcija so prikazani v preglednicah 15, 16 in 17 (Murgia in sod., 1997) .

Preglednica 15: Nukleotidni zaporedji oligonukleotidnih začetnikov Sapro1/Sapro2

Oligonukleotidni začetnik	Zaporedje
Sapro1	5' – AGA AAT TTG TGC TAA TAC CGA ATG T – 3'
Sapro2	5' – GGC GTC GCT TCA GGC TTT CG – 3'

Preglednica 16: Sestava reakcijske mešanice za polimerazno verižno reakcijo z oligonukleotidnima začetnikoma Sapro1/Sapro2

Reagent	Začetna koncentracija	Končna koncentracija	Količina
voda			7,89 µL
pufer	10x	1x	2,5 µL
MgCl ₂	25 mM	3 mM	3,0 µL
dNTP	25 mM	0,25 mM	0,25 µL

Se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 16: Sestava reakcijske mešanice za polimerazno verižno reakcijo z oligonukleotidnima začetnikoma Sapro1/Sapro2

Reagent	Začetna koncentracija	Končna koncentracija	Količina
oligonukleotidni začetnik Sapro1	20 µM	0,504 µM	0,63 µL
oligonukleotidni začetnik Sapro2	20 µM	0,504 µM	0,63 µL
HotGoldstar	5 U	0,5 U	0,1 µL
Skupaj			15,0 µL
VZOREC			10,0 µL
Skupaj			25,0 µL

Preglednica 17: Pogoji za polimerazno verižno reakcijo pri uporabi oligonukleotidnih začetnikov Sapro1/Sapro2

Stopnja reakcije	Temperatura	Časovni interval	Ponovitve
Začetna denaturacija	95 °C	10 min	1x
Denaturacija	93 °C	1 min	
Prileganje oligonukleotidnih začetnikov	63 °C	1,5 min	35x
Podaljševanje verige	72 °C	1 min	
Končno podaljševanje	72 °C	10 min	1x
Shranjevanje	4 °C	∞	

3.2.8.5 Ponovitve reakcij

Izvedli smo več ponovitev PCR reakcij s Sapro1/Sapro2 in Lepat1/Lepat2, in sicer za vzorce, ki niso dali pričakovanega rezultata. Uporabili smo DNA tako patogenih, kot saprofitnih leptospir. Od saprofitnih leptospir smo uporabili vzorce 1E, 2F, 3J in 3J/1 (vsi Semaranga, Patoc, Patoc 1). Vključili smo tudi redčitve vzorca 3J/1, in sicer 1:256, 1:512 in 1:1024. Od patogenih sevov smo uporabili vzorce DNA z oznako 2H (Australis, Australis, Ballico), 7H (Canicola, Canicola, Hond Utrecht IV), 5F in 9I (oba Icterohaemorrhagiae, Icterohaemorrhagiae, RGA).

3.2.9 Priprava agaroznega gela

Rezultate pomnoževanja DNA smo ovrednotili z agarozno gelsko elektroforezo. V ta namen smo si po internem protokolu laboratorija pripravili agarozni gel. V sterilno erlenmajerico smo zatehtali 0,5 g agaroze, ki smo ji nato dodali 50 mL TAE pufra. Sledilo je 3-minutno segrevanje v mikrovalovni pečici, pri čemer se je agarosa raztopila v pufru. Ko se je raztopina nekoliko ohladila smo dodali 3,5 µL etidijevega bromida. Predhodno smo si pripravili tudi model za pripravo gela, v katerega smo zlili agarozno raztopino ter počakali 20 minut, da se je gel popolnoma strdil. Nato smo previdno odstranili glavnice in nosilec z gelom vstavili v kad za elektroforezo. Tako pripravljen gel smo na koncu prelili s TAE pufrom.

3.2.10 Agarozna gelska elektroforeza

Po izvedeni PCR reakciji in pripravi agaroznega gela je sledila izvedba gelske elektroforeze. Najprej smo PCR produkte obarvali tako, da smo v 3 µL barvila dodali 10 µL vzorca. Tako pripravljene vzorce smo nanesli na gel. Po nanosu vseh vzorcev smo prižgali elektroforezo, ki je trajala 20 minut. Po končanem postopku smo nosilec z agaroznim gelčkom odstranili iz kadi za elektroforezo in rezultate ovrednotili ter fotografirali pod UV svetilko (Murgia in sod., 1997).

3.2.11 Kontrola kontaminacije

Posamezne stopnje dela smo izvajali v ločenih in posebej zato namenjenih prostorih. Pri vsaki fazi smo uporabljali drug komplet pipet in sterilen material za enkratno uporabo, katerega nismo prenašali med prostori. Med posameznimi faami smo vedno amenjali rokavice. Za kontrolo kontaminacije smo pri vsaki reakciji vključili dve negativni kontroli. Vse reagente smo alikvotirali in shranili v manjših količinah. Pripravo reakcijske mešanice smo izvajali v laminarju, ki smo ga predhodno obsevali z UV lučjo.

4 REZULTATI

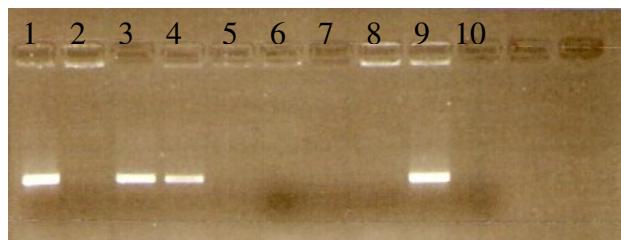
Pozitiven rezultat reakcije pomnoževanja predstavljajo vzorci, ki so v preglednici 18 opredeljeni kot močno pozitivni, pozitivni ali šibko pozitivni.

Preglednica 18: Interpretacija rezultatov pomnoževanja DNA

Rezultat pomnoževnaja	Oznaka
Močno pozitiven	++
Pozitiven	+
Šibko pozitiven (mejni rezultat)	+/-
Negativen	-

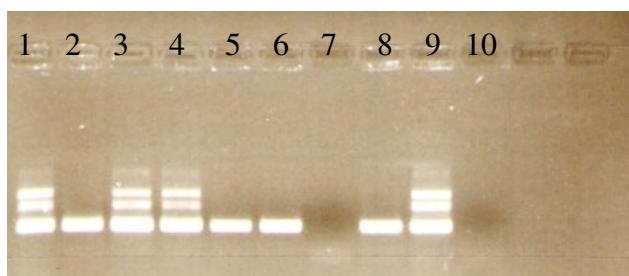
4.1 REZULTATI »NESTED« PCR Z L3/L4 IN L4/LPato2

DNA sevov za MAT smo v 1. stopnji pomnožili z oligonukleotidnima začetnikoma L3/L4, ki pomnožujeta DNA patogenih leptospir. Uporabili smo DNA 8-ih sevov, ki spadajo v serovare Grippotyphosa, Canicola, Sejroe, Pomona, Cynopteri, Icterohaemorrhagiae, Semaranga in Australis. Pozitiven rezultat smo dobili pri serovarih Grippotyphosa, Sejroe, Pomona in Australis. Rezultati pomnoževanja z oligonukleotidnima začetnikoma L3/L4 so prikazani na sliki 6.



Slika 6: Gelska elektroforeza produktov polimerazne verižne reakcije z oligonukleotidnima začetnikoma L3/L4. Vzorci 1-6 in 8-9 so sevi leptospir, na pozicijah 7 in 10 pa se nahajata negativni kontroli. 1- Grippotyphosa; 2- Canicola; 3- Sejroe; 4- Pomona; 5- Cynopteri; 6- Icterohaemorrhagiae; 7- negativna kontrola (voda); 8- Semaranga; 9- Australis; 10- negativna kontrola (voda).

Po prvi smo izvedli še drugo PCR reakcijo, z oligonukleotidnima začetnikoma L4/LPato2, ki prav tako pomnožujeta DNA patogenih leptospir. V tej reakciji smo kot tarčno DNA uporabili PCR produkte, ki so nastali pri reakciji pomnoževanja z L3/L4. V tem primeru so dali pozitiven rezultat vsi uporabljeni vzorci, vključno s saprofitnim sevom Semaranga, Patoc, Patoc 1. Rezultati pomnoževanja z oligonukleotidnima začetnikoma L4/LPato2 so prikazani na sliki 7.



Slika 7: Gelska elektroforeza produktov polimerazne verižne reakcije z oligonukleotidnima začetnikoma L4/LPato2. Vzorci 1-6 in 8-9 so sevi leptospir, na pozicijah 7 in 10 pa se nahajata negativni kontroli. 1- Grippotyphosa; 2- Canicola; 3- Sejroe; 4- Pomona; 5- Cynopteri; 6- Icterohaemorrhagiae; 7- negativna kontrola (voda); 8- Semaranga; 9- Australis; 10- negativna kontrola (voda).

4.2 REZULTATI POMNOŽEVANJA DNA Z OLIGONUKLEOTIDNIMA ZAČETNIKOMA LeptoA/LeptoB

Z oligonukleotidnima začetnikoma LeptoA/LeptoB smo pomnožili DNA sevov za MAT, redčeno DNA sevov za MAT ter DNA sevov laboratorijske zbirke leptospir.

4.2.1 Pomnoževanje DNA sevov za MAT in njihovih redčitev z LeptoA/LeptoB

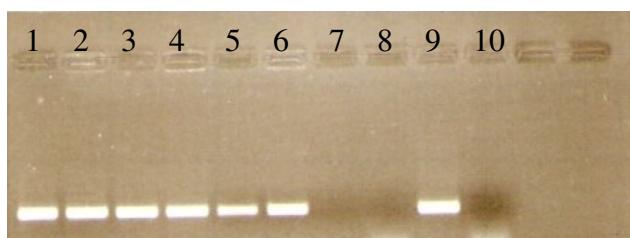
Za to preiskavo smo uporabili seve za MAT, ki pripadajo serovarom Grippotyphosa, Canicola, Sejroe, Pomona, Cynopteri, Icterohaemorrhagiae, Semaranga, Australis, Autumnalis, Pyrogenes, Bataviae, Panama in Javanica. Pričakovali smo, da bodo vsi sevi dali pozitiven rezultat v obliki fragmenta velikosti 331 bp, ker LeptoA/LeptoB pomnožujeta DNA patogenih in nepatogenih leptospir.

Zanimalo nas je tudi, kolikokrat lahko redčimo vzorec DNA, da še dobimo pozitiven rezultat pomnoževanja.

Pri PCR reakciji z LeptoA/LeptoB smo v večini primerov pozitiven rezultat dobili do 10. redčitve (1:1024). Izjema so bili: serovar Icterohaemorrhagiae, kjer smo zadnji pozitiven rezultat dobili pri 9. redčitvi (1:512), Grippotyphosa pri 12. redčitvi (1:4096), Pyrogenes in Panama pri 13. redčitvi (1:8192) ter Javanica pri 15. redčitvi (1:32 768).

Z redčenjem vzorcev se je posledično manjšala koncentracija DNA, kar je bilo dobro vidno na gelu, kjer se je postopoma manjšala intenziteta fragmentov.

Do odstopanja je prišlo le pri sevu Semaranga, Patoc, Patoc 1, kjer smo pri neredčenem vzorcu, kljub izredno visoki koncentraciji DNA (123,5 ng/ μ L) dobili negativen rezultat, kar je vidno na sliki 8. Naslednje redčitve tega seva (od 1:4 do 1:1024) so bile pozitivne.



Slika 8: Gelska elektroforeza produktov polimerazne verižne reakcije z oligonukleotidnima začetnikoma LeptoA/LeptoB. Vzorci 1-6 in 8-9 so produkti pomnoževanja neredčene DNA sevov za MAT, na pozicijah 7 in 10 pa se nahajata negativni kontroli. 1- Grippotyphosa; 2- Canicola; 3- Sejroe; 4- Pomona; 5- Cynopteri; 6- Icterohaemorrhagiae; 7- negativna kontrola (voda); 8- Semaranga; 9- Australis; 10- negativna kontrola (voda).

Podrobnejši rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir, ki se uporabljajo za MAT in njihovih redčitev se nahajajo v prilogi A.

4.2.2 Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir z LeptoA/LeptoB

PCR reakcije z LeptoA/LeptoB nismo izvedli z vsemi sevi, saj so vsi že bili predhodno testirani s tema oligonukleotidnima začetnikoma, v postopku rutinskega testiranja ob sumu na leptospirozo. Uporabili smo 105 vzorcev DNA, pridobljenih iz sevov laboratorijske zbirke leptospir, od katerih so 104 dali pozitiven rezultat, v enem primeru pa do pomnoževanja ni prišlo, kar predstavlja lažno negativen rezultat. Podrobnejši rezultati pomnoževanja DNA leptospir z oligonukleotidnima začetnikoma LeptoA/LeptoB so prikazani v prilogi B.

4.3 REZULTATI POMNOŽEVANJA DNA Z OLIGONUKLEOTIDNIMA ZAČETNIKOMA Lepat1/Lepat2

Z oligonukleotidnima začetnikoma Lepat1/Lepat2 smo pomnožili DNA sevov za MAT ter DNA leptospir iz zbirke laboratorija.

4.3.1 Pomnoževanje DNA sevov za MAT in njihovih redčitev z Lepat1/Lepat2

Serovara Sejroe in Australis sta pri pomnoževanju DNA z Lepat1/Lepat2 dala pozitiven rezultat vse do 20. redčitve (1:1 048 576), prav tako tudi Grippotyphosa, Cynopteri in Icterohaemorrhagiae, s tem da se pri teh treh vmes pojavi tudi negativen rezultat.

Pri serovaru Pomona smo zadnji pozitivni rezultat opazili pri 17. (1:131 072), pri serovaru Canicola pa pri 18. redčitvi (1:262 144).

Reakcije s serovari Autumnalis, Pyrogenes, Bataviae, Panama in Javanica smo izvajali naknadno, zato smo testirali samo štiri redčitve DNA (1:2048, 1:8192, 1:16 384, 1:32 768), za katere smo se odločili na podlagi že dobljenih rezultatov. Serovara Pyrogenes in Bataviae sta bila nekoliko problematična, saj pri nekaterih redčitvah nismo dobili ustreznega PCR produkta, ostali so dali pozitiven rezultat pri vseh štirih redčitvah.

DNA saprofitnega serovara Semaranga se je pomnožila v prvih šestih redčitvah (do 1:64) ter pri zadnjih dveh (1:524 288, 1:1 048 576).

Pri vseh vzorcih je bilo opazno manjšanje intenzitete fragmentov na gelu v skladu z manjšanjem koncentracije DNA. Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir, ki se uporablajo za MAT, z oligonukleotidna začetnikoma Lepat1/Lepat2, so predstavljeni v prilogi A.

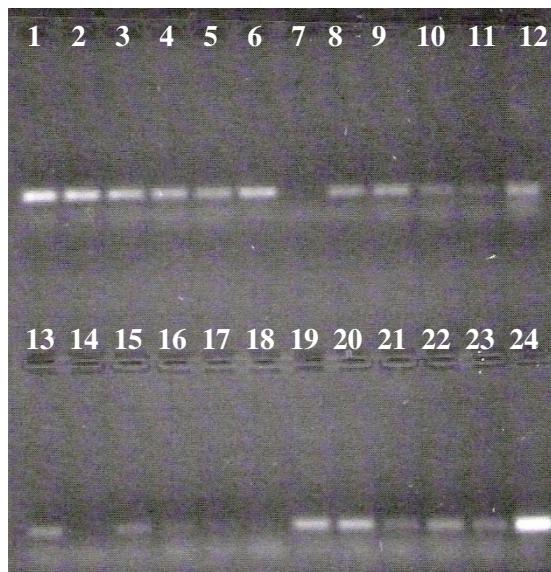
4.3.2 Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir z Lepat1/Lepat2

Po testiranju DNA sevov za MAT, smo z Lepat1/Lepat2 pomnožili tudi DNA ostalih sevov iz laboratorijske zbirke leptospir. Uporabili smo 116 sevov, od katerih je bilo 112 patogenih ter 4 nepatogene leptospire. Od nepatogenih leptospir smo uporabili sev Andamana, Andamana, CH11 in 3 seve Semaranga, Patoc, Patoc 1. Skupno smo testirali 151 vzorcev DNA, pri čemer je 146 vzorcev pripadalo patogenim, 5 pa saprofitnim leptospiram.

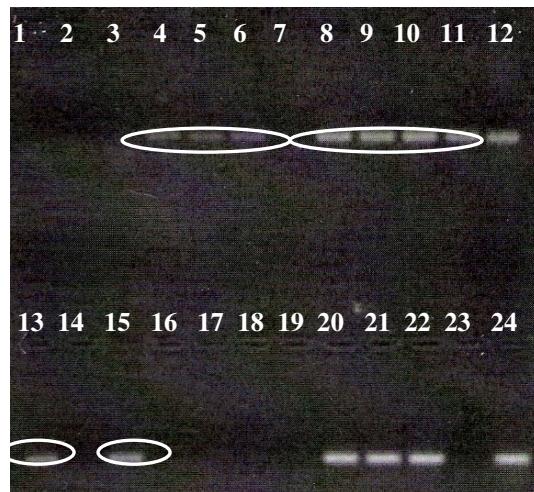
V nekaterih primerih smo uporabili dva vzorca DNA, pridobljena iz istega seva. Ker je v določenih primerih prišlo do neujemanja rezultatov pri pomnoževanju vzorcev DNA iz istega seva, smo pri izračunih dvojne vzorce upoštevali vsakega posebej.

Pri pomnoževanju z oligonukleotidnima začetnikoma Lepat1/Lepat2 je pozitiven rezultat dalo 135 vzorcev DNA patogenih leptospir, kar predstavlja 92,5 %. Od saprofitnih leptospir so se z Lepat1/Lepat2 pomnožili 4 vzorci oziroma 80,0 %. Podrobnejši rezultati pomnoževanja DNA leptospir iz zbirke laboratorija, z oligonukleotidnima začetnikoma Lepat1/Lepat2, so predstavljeni v prilogi B.

Na slikah 9 in 10 je nekaj rezultatov pomnoževanja DNA z oligonukleotidnima začetnikoma Lepat1/Lepat2. Za vsako skupino leptospir – patogenih in nepatogenih, je prikazan primer rezultatov, ko so se vsi vzorci pomnožili z ustreznim parom oligonukleotidnih začetnikov ter primer, pri katerih je prišlo do lažno pozitivnih ali lažno negativnih rezultatov.



Slika 9: Gelska elektroforeza produktov pomnoževanja DNA patogenih leptospir z oligonukleotidnima začetnikoma Lepat1/Lepat2. Na mestih 7, 12 in 14 se nahajajo negativne kontrole (7, 14 - sterilna destilirana voda; 12 – Semaranga, Patoc, Patoc 1), na mestu 24 pa pozitivna kontrola (Australis, Australis, Ballico). Na ostalih mestih na gelu so produkti pomnoževanja DNA patogenih leptospir. Razvidno je, da so vsi vzorci dali ustrezen, torej pozitiven rezultat, v obliki fragmenta velikosti 330 bp. Pomnožila se je tudi negativna kontrola – sev Semaranga, Semaranga, Patoc 1 (na mestu 12).



Slika 10: Gelska elektroforeza produktov pomnoževanja DNA saprofitnih leptospir z oligonukleotidnima začetnikoma Lepat1/ Lepat2. Na mestih 7 in 14 se nahajata negativni (sterilna destilirana voda), na mestih 12 in 24 pa pozitivni kontroli (12 - Pomona, Pomona, Pomona; 24- Javanica, Javanica, Veldart Batavia 46). Na mestih 20, 21, 22 se nahajajo vzorci patogenih leptospir, zato so z Lepat1/Lepat2 dali pozitiven rezultat. Ostala mesta na gelu so zapolnjena z PCR produkti saprofitnih leptospir, katerih DNA se je v nekaterih primerih pomnožila, posledica česar so bili lažno pozitivni rezultati, ki so na sliki posebej označeni.

4.4 REZULTATI POMNOŽEVANJA DNA Z OLIGONUKLEOTIDNIMA ZAČETNIKOMA Sapro1/Sapro2

Z oligonukleotidnima začetnikoma Sapro1/Sapro2 smo pomnožili DNA sevov za MAT ter DNA leptospir iz zbirke laboratorija.

4.4.1 Pomnoževanje DNA sevov za MAT in njihovih redčitev s Sapro1/Sapro2

Ustrezne rezultate pri pomnoževanju z Sapro1/Sapro2, so dali serovari Cynopteri, Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Pyrogenes, Bataviae, Panama in Javanica ter vse njihove redčitve. Tudi redčitve DNA serovarov Grippotyphosa, Canicola, Sejroe in Pomona so v večini primerov dale negativne rezultate, s tem da so se predvsem pri višjih redčitvah pojavili posamezni mejni rezultati.

Pri sevu Australis, Australis, Ballico se je DNA v določenih primerih pomnožila, čeprav gre za patogeno leptospiro. Močno pozitiven rezultat je dal neredčen vzorec ter redčitve od 1 (1:2) do 6 (1:64), šibko pozitivne pa so bile tudi 7. (1:128), 8. (1:256), 12. (1:4096), 13. (1:8192), 14. (1:16 384), 16. (1:65 536) ter 17. redčitev (1:131 072).

Pomnoževanje DNA saprofitnega seva Semaranga, Patoc, Patoc 1 je bilo uspešno, saj smo tako pri neredčenem vzorcu, kot pri redčitvah dobili pozitivne rezultate. Intenziteta fragmentov na gelu je sovpadala z zmanjševanjem koncentracije DNA pri posameznih redčitvah.

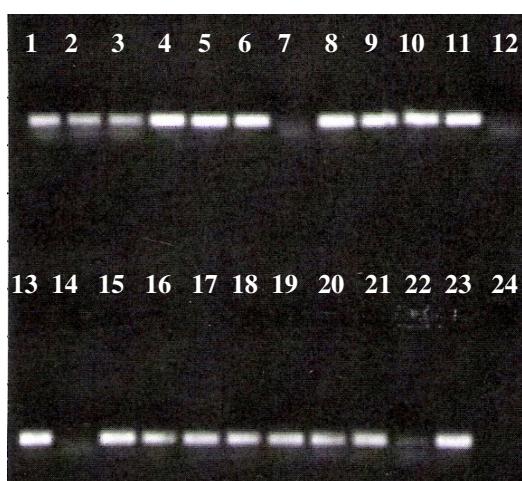
Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir, ki se uporabljajo za MAT, z oligonukleotidnima začetnikoma Sapro1/Sapro2, so prikazani v prilogi A.

4.4.2 Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir s Sapro1/Sapro2

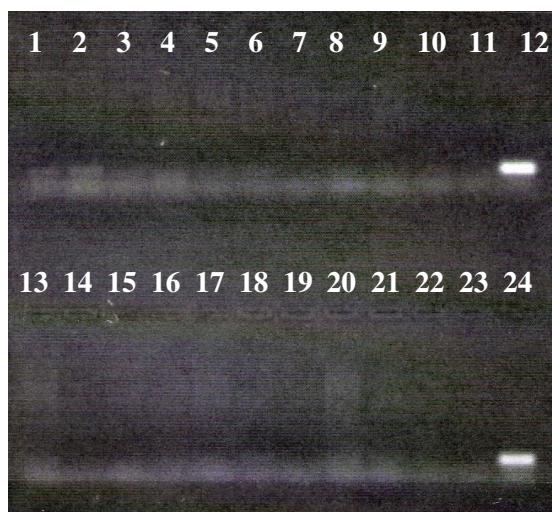
Za pomnoževanje z oligonukleotidnima začetnikoma Sapro1/Sapro2 smo uporabili istih 151 vzorcev DNA, kot pri pomnoževanju z Lepat1/Lepat2. Pozitiven rezultat je dalo vseh 5 vzorcev DNA saprofitnih leptospir. Z Sapro1/Sapro2 se je pomnožilo 88 od 146 vzorcev DNA patogenih leptospir, kar predstavlja 60,3 %.

Podrobnejši rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir iz zbirke laboratorija, z oligonukleotidnima začetnikoma Sapro1/Sapro2, so prikazani v prilogi B.

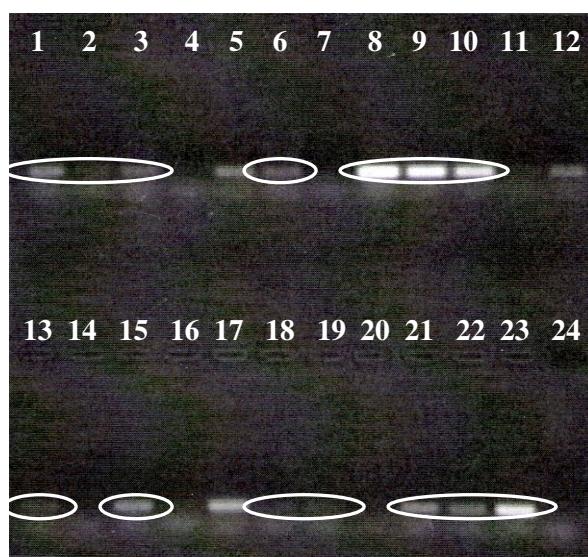
Na slikah 11, 12 in 13 je nekaj rezultatov pomnoževanja DNA z oligonukleotidnima začetnikoma Sapro1/Sapro2. Za vsako skupino leptospir – patogenih in nepatogenih, so prikazani primeri rezultatov, ko so se vsi vzorci pomnožili z ustreznim parom oligonukleotidnih začetnikov ter primeri, pri katerih je prišlo do lažno pozitivnih oziroma lažno negativnih rezultatov.



Slika 11: Gelska elektroforeza produktov pomnoževanja DNA saprofitnih leptospir z oligonukleotidnima začetnikoma Sapro1/Sapro2. Na mestih 7, 14 in 22 se nahajajo negativne kontrole (7, 14 – sterilna destilirana voda; 22 – Javanica, Javanica, Veldart Batavia 46). Na mestu 12 je, sicer zelo šibkim signalom, pozitivna kontrola (12 - Semaranga, Patoc, Patoc 1). Ostala mesta na gelu so zapolnjena s sevi saprofitnih leptospir ter njihovimi redčitvami. DNA vseh saprofitnih leptospir se je v reakciji pomnožila in tvorila ustrezni produkt velikosti 274 bp.



Slika 12: Gelska elektroforeza produktov pomnoževanja DNA patogenih leptospir z oligonukleotidnima začetnikoma Sapro1/Sapro2. Na mestih 7, 14 in 24 se nahajajo negativne kontrole (7, 14 – sterilna destilirana voda; 24 – Australis, Australis, Ballico), na mestu 12 pa pozitivna kontrola (Semaranga, Patoc, Patoc 1). Na ostalih mestih na gelu so produkti pomnoževanja DNA patogenih leptospir. Na gelu vidimo, da se DNA patogenih leptospir ni pomnožila s Sapro1/Sapro2, razen v primeru negativne kontrole, seva Australis, Australis, Ballico (na mestu 24).



Slika 13: Gelska elektroforeza produktov pomnoževanja DNA patogenih leptospir z oligonukleotidnima začetnikoma Sapro1/Sapro2 – prikaz lažno pozitivnih rezultatov. Na mestih 7, 14 in 24 se nahajajo negativne kontrole (7, 14 – sterilna destilirana voda; 24 – Canicola, Canicola, Hond Utrecht IV). Na mestih 5, 12, 17 in 24 so pozitivne kontrole, in sicer sev Semaranga, Patoc, Patoc 1. Na ostalih mestih na gelu so produkti pomnoževanja DNA patogenih leptospir. Razvidno je, da se je večina izolatov patogenih leptospir pomnožila s Sapro1/Sapro2, posledica česar so lažno pozitivni rezultati, ki so na sliki posebej označeni.

4.5 PONOVIDNE PCR REAKCIJ S SAPROFITNIMI SEVI

Pri ponovitvah PCR reakcij so vzorci 1E, 2F in 3J (vsi Semaranga, Patoc, Patoc 1) dali pozitiven rezultat tako s Sapro1/Sapro2, kot z Lepat1/Lepat2, s tem da so imeli fragmenti na gelu močnejšo intenziteto pri pomnoževanju s Sapro1/Sapro2.

Vzorec 3J/1 (Semaranga, Patoc, Patoc 1), pridobljen iz Royal Tropical inštituta v Amsterdamu, je edini, ki se je pomnožil samo z oligonukleotidnima začetnikoma Sapro1/Sapro2, z Lepat1/Lepat2 pa je dal negativen rezultat. Enako so reagirale tudi njegove redčitve – 1:256, 1:512 in 1:1024. Rezultati ponovitev reakcij pomnoževanja DNA saprofitnih leptospir so prikazani v preglednici 19.

Ponovljivost metode je dobra, saj se rezultati pri večkratnem pomnoževanju posameznega seva z istim parom oligonukleotidnih začetnikov niso spremajali.

Preglednica 19: Rezultati ponovitev reakcij pomnoževanja DNA saprofitnih leptospir. Laboratoriji iz katerih so bili pridobljeni sevi so označeni s kraticami: A – Amsterdam, LJ – Ljubljana, ZG – Zagreb.

Vzorec	Serološka opredelitev	Lab.	Konc. DNA [ng/ µL]	Sapro1/Sapro2	Lepat1/Lepat2
7	SEMARANGA, Patoc, Patoc 1	A	41,22	+, +, +, ++, ++, ++, ++, ++, ++	-, -, -, -, -, -, -, -, -
7	SEMARANGA, Patoc, Patoc 1 (1:256)	A	-1,07	++, ++, ++, ++, ++, ++, ++	-, -, -
7	SEMARANGA, Patoc, Patoc 1 (1:512)	A	-1,60	++, ++, ++, ++, ++, ++, ++	-, -, -
7	SEMARANGA, Patoc, Patoc 1 (1:1024)	A	-1,34	++, ++, ++, ++, ++, ++, ++	-, -, -
1E	SEMARANGA, Patoc, Patoc 1	LJ	-0,47	++, ++, ++, ++, ++, ++, ++, ++, ++	+, +, +, +, +, + +, +, +
2F	SEMARANGA, Patoc, Patoc 1	ZG	1,08	++, ++, ++, ++, ++, ++, ++, ++, ++	+, +, +, +, +, + +, +, +
3J	SEMARANGA, Patoc, Patoc 1	A	9,40	++, ++, ++, ++, ++, ++, ++, ++, ++	+, +, +, +, +, + +, +, +

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo poskušali razlikovati med patogenimi in saprofitnimi leptospirami, s pomočjo PCR reakcije ter dvema paroma oligonukleotidnih začetnikov – Lepat1/Lepat2 in Sapro1/Sapro2. Vsak vzorec smo pomnožili tudi z oligonukleotidnima začetnikoma LeptoA/LeptoB, ki pomnožujeta DNA tako saprofitnih, kot patogenih leptospir.

V Laboratoriju za diagnostiko boreloz in leptospiroze (IMI) se za ugotavljanje prisotnosti leptospir v kliničnih vzorcih trenutno uporablja dve PCR metodi, in sicer pomnoževanje z LeptoA/LeptoB ter »nested« PCR, ki je namenjen potrditvi okužbe s patogenimi leptospirami.

Večina primerov leptospiroze je potrjena s serološko reakcijo MAT, ki velja za »zlati standard« v diagnostiki te bolezni, kljub temu pa ima tudi številne pomanjkljivosti. Specifična protitelesa se začnejo tvoriti šele 7 do 10 dni po okužbi, zato je test uporaben šele od drugega tedna bolezni. Za potrditev diagnoze je potreben tudi parni serum, katerega je pri hitrem neugodnem poteku bolezni nemogoče pridobiti. Za izvedbo MAT je potreben antigen v obliki živih leptospir, zato je potrebno s precepljanjem stalno vzdrževati zbirkovo leptospir oziroma referenčnih sevov, kar predstavlja nevarnost okužbe za laboratorijske delavce. Nizek titer protiteles še ne izključuje možnosti leptospiroze, saj je možno, da bolezen povzroča sev leptospir, katerega nimamo v zbirkovi in tako dobimo lažno negativen rezultat (Ahmad in sod., 2005; WHO, 2003). V raziskavi, ki so jo izvedli Chappel in sod. (2004), so preverjali usposobljenost laboratorijev za izvajanje MAT. V dveh krogih so testirali 57 laboratorijev iz vsega sveta, katerim so poslali po pet vzorcev serum v vsakem krogu. Na podlagi dobljenih rezultatov so prišli do zaključka, da je bilo v prvem krogu 11 %, v drugem pa kar 14 % rezultatov mikroaglutinacijskega testa lažno negativnih (Chappel in sod., 2004). Ne glede na to, da MAT predstavlja standard, gre za metodo, ki je zapletena tako pri izvedbi, kot pri interpretaciji rezultatov.

Od molekularnih metod se v Laboratoriju za diagnostiko boreloz in leptospiroze (IMI) za dokazovanje prisotnosti leptospir v kliničnih vzorcih uporablajo tri PCR reakcije.

Najprej se vsak vzorec DNA pomnoži z LeptoA/LeptoB in L3/L4, od katerih prvi par pomnožuje DNA vseh leptospir, drugi pa je specifičen samo za patogene leptospire. V primeru, da je rezultat pomnoževanja z L3/L4 negativen, se izvede še druga stopnja reakcije z vgnezdenima oligonukleotidnima začetnikoma L4/LPato2. V tej reakciji tarčno DNA predstavlja odsek znotraj gena, ki ga pomnožujeta L3/L4. Glavni prednosti metode »nested« PCR sta občutljivost, predvsem pa visoka specifičnost. Problem predstavlja možnost navzkrižne kontaminacije in dolgotrajna izvedba, saj gre za dvostopenjsko reakcijo (Merien in sod., 2005). Zato smo v diplomski nalogi žeeli ugotoviti, ali je PCR reakcija z Lepat1/Lepat2 in Sapro1/Sapro2 ustrezna metoda, s katero bi lahko v enem koraku ločili patogene leptospire od saprofitnih. Predpostavljeni smo, da se bodo rezultati pomnoževanja z Lepat1/Lepat2 in Sapro1/Sapro2 med seboj izključevali.

»Nested« PCR z L3/L4 in L4/LPato2 je že ustaljena metoda, ki se uporablja v rutinski diagnostiki, zato smo z njo testirali samo 8 sevov za MAT (Grippotyphosa, Canicola, Sejroe, Pomona, Cynopteri, Icterohaemorrhagiae, Semaranga in Australis). Pozitiven rezultat z L3/L4 so dali le serovari Grippotyphosa, Sejroe, Pomona in Australis (slika 6). V drugi stopnji reakcije smo uporabili še vgnezdena oligonukleotidna začetnika L4/LPato2, s katerima smo povečali občutljivost metode. Potrdili smo, da gre za patogene leptospire, saj se je pomnožila DNA vseh sevov. V nasprotju s pričakovanji se je pomnožila tudi DNA seva Semaranga, Patoc, Patoc 1, ki ni patogen (pozicija 8 na sliki 7).

Pri uporabi »nested« PCR je potrebna posebna previdnost pri delu in interpretaciji rezultatov, saj obstaja velika možnost kontaminacije pri prenosu PCR produktov iz prve reakcijske mešanice v drugo (Merien in sod., 2005). Obstaja verjetnost, da se je to zgodilo tudi v našem primeru, vendar pa je potrebno upoštevati, da sta obe negativni kontroli dali negativen rezultat, kar nakazuje na odsotnost kontaminacije reakcijske mešanice. Težave s sevom Semaranga, Patoc, Patoc 1 so bile prisotne ves čas, zato ne izključujemo možnosti kontaminacije omenjenega seva s patogenimi leptospirami.

V naslednjem koraku smo testirali DNA 13 kultur za MAT in njihove redčitve, pri čemer smo vzorce pomnožili s tremi pari oligonukleotidnih začetnikov - LeptoA/LeptoB ter testnima Lepat1/Lepat2 in Sapro1/Sapro2.

Za uporabo redčitev smo se odločili, ker je bila pri neredčenih vzorcih intenziteta fragmentov na gelu premočna in zato neprimerljiva s tistimi, ki jih ponavadi dobimo pri kliničnih vzorcih. Želeli smo tudi ugotoviti kakšna je občutljivost PCR metode, ob uporabi posameznih oligonukleotidnih začetnikov, oziroma kakšna je najmanjša koncentracija DNA, ki še da pozitiven rezultat.

Pri serovarih Autumnalis, Pyrogenes, Bataviae, Panama in Javanica, smo v analizo vključili samo določene redčitve (priloga A), za katere smo na podlagi predhodnih izkušenj predvidevali, da vsebujejo mejne koncentracije DNA, pri katerih bo prišlo do preskoka rezultatov, od pozitivnega k negativnemu.

Pri pomnoževanju DNA sevov za MAT z LeptoA/LeptoB, smo pričakovali, da bodo pozitiven rezultat, v obliki 331 bp velikega fragmenta, tvorili vsi vzorci, saj omenjena oligonukleotidna začetnika pomnožujeta del gena *rrs* vseh leptospir. V skladu z našimi pričakovanji je večina vzorcev neredčene DNA dala pozitiven rezultat. Izjema je bil serovar Semaranga, ki je dal negativen rezultat, kljub visoki koncentraciji DNA v vzorcu (123,5 ng/µL) (slika 8).

V primeru, ko je koncentracija tarčne DNA v PCR reakciji prevsoka, lahko pride do dušenja reakcije pomnoževanja, posledica česar je lažno negativen rezultat (Roux, 1995). Možna razloga za pojav lažno negativnih rezultatov sta lahko tudi prisotnost inhibitorjev in nizka koncentracija DNA v vzorcu. Znano je, da je DNA leptospir zelo občutljiva, zato lahko pride tudi do njene razgradnje, predvsem v primeru večkratnega zamrzovanja in odmrzovanja vzorca (Gravekamp in sod., 1993).

Pri pomnoževanju redčene DNA sevov za MAT z oligonukleotidnima začetnikoma LeptoA/LeptoB, smo pozitivne rezultate najpogosteje dobili vse do 10. (1:1024), v določenih primerih pa tudi do 15. redčitve (1:32 768). Rezultati pomnoževanja so natančneje prikazani v prilogi A.

V primerjavi z LeptoA/LeptoB, smo z Lepat1/Lepat2 uspeli pomnožiti DNA v veliko večjih redčitvah. Pri petih sevih smo dobili pozitivne rezultate vse do 20. redčitve (1:1 048 576).

Na podlagi rezultatov, ki so prikazani v prilogi A, lahko sklepamo, da bi z oligonukleotidnima začetnikoma Lepat1/Lepat2 zaznali nižjo koncentracijo DNA patogenih leptospir v vzorcu, kot z LeptoA/LeptoB.

Serovar, ki nam je pri pomnoževanju z Lepat1/Lepat2 povzročal težave, je bil ponovno Semaranga. Pri omenjenem sevu so dali pozitiven rezultat tako neredčen vzorec DNA, kot redčitve od 2 (1:2) do 6 (1:64) (priloga A). Glede na to, da je sev saprofiten, oligonukleotidna začetnika Lepat1/Lepat2 pa pomnožujeta del gena *rrs* pri patogenih leptospirah, gre za lažno pozitivne rezultate. Potrebno je upoštevati, da je bila koncentracija neredčenega vzorca DNA omenjenega seva z 123,5 ng/µL med najvišjimi. Kombinacija visoke koncentracije tarčne DNA in velikega števila ciklov pomnoževanja pa lahko povzroči kopičenje nespecifičnih produktov, zaradi česar dobimo lažno pozitiven rezultat (Cha in Thilly, 1993). Obstaja tudi možnost kontaminacije saprofitnega seva s patogenimi leptospirami.

Oligonukleotidna začetnika Sapro1/Sapro2 pomnožujeta del gena *rrs* pri saprofitnih leptospirah, zato smo v skladu s pričakovanji uspešno pomnožili neredčeno DNA saprofitnega serovara Semaranga ter vse njene redčitve (priloga A).

Pri pomnoževanju neredčene DNA patogenih sevov z omenjenima oligonukleotidnima začetnikoma, so vsi, z izjemo serovara Australis, dali negativen rezultat. Redčitve DNA, ki so dale ustrezen rezultat pomnoževanja so pripadale serovarom Cynopteri, Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Pyrogenes, Bataviae, Panama in Javanica. Kljub temu, da sta oligonukleotidna začetnika Sapro1/Sapro2 specifična za saprofitne leptospire, so se pomnožile posamezne redčitve DNA patogenih serovarov Grippotyphosa, Canicola, Sejroe in Pomona. V vseh primerih je šlo za mejni rezultat, saj je bil signal zelo šibek.

Neredčena DNA seva Australis, Australis, Ballico in kar trinajst njegovih redčitev je bilo pozitivnih pri pomnoževanju s Sapro1/Sapro2. V tem primeru ni šlo za mejni rezultat, saj so bili signali močni, predvsem pri neredčenem vzorcu ter redčitvah od 1 (1:2) do 6 (1:64) (priloga A).

Možen razlog za takšne rezultate je kontaminacija omenjenega seva s saprofitnimi leptospirami. Saprofitne leptospire rastejo hitreje, zato pri morebitni kontaminaciji vzorca hitro prerastejo patogene (Murgia in sod., 1997).

Po tem, ko smo Lepat1/Lepat2 in Sapro1/Sapro2 preizkusili na sevih za MAT in njihovih redčitvah, smo želeli ugotoviti, kako bi se metoda obnesla na leptospirah iz zbirke.

Od 146 vzorcev DNA patogenih leptospir je pozitiven rezultat, pri pomnoževanju z Lepat1/Lepat2, dalo 135 vzorcev oziroma 92,5 % (priloga B). Prav tako so se z Lepat1/Lepat2 pomnožili 4 vzorci DNA saprofitnih leptospir, kar predstavlja 80,0 % (priloga B).

Pri reakciji z oligonukleotidnima začetnikoma Sapro1/Sapro2 je pozitiven rezultat dalo vseh 5 vzorcev DNA saprofitnih leptospir ter kar 88 od 146 vzorcev DNA patogenih leptospir oziroma 60,3 % (priloga B).

Idealno bi bilo, če bi se rezultati testiranih vzorcev razdelili v dve skupini, in sicer na resnično pozitivne in resnično negativne. Ker pa je redko katera metoda 100 % občutljiva in specifična, pride do pojava lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov (Gordis, 2004).

Do lažno pozitivnih rezultatov lahko privede visoka koncentracija tarčne DNA v vzorcu, zaradi česar v reakciji pride do nastanka nespecifičnih produktov. Na splošno velja, da visoka koncentracija tarčne DNA in veliko število ciklov zmanjšata specifičnost reakcije. Specifičnost PCR reakcije lahko zvišamo tako, da spremenimo sestavo reakcijske mešanice ali spremenimo pogoje pri katerih reakcija poteka. Znižanje koncentracije dNTP-jev ali MgCl₂, odstranitev inhibitorjev reakcije, dodatek glicerola ali formamida, zmanjšanje števila ciklov in zvišanje temperature vezave oligonukleotidnih začetnikov so dejavniki, ki vplivajo v smeri zvišanja specifičnosti PCR reakcije (Cha in Thilly, 1993).

Eden izmed možnih vzrokov za lažno pozitivne rezultate je tudi kontaminacija, do katere lahko pride pri katerikoli stopnji preiskave. Problem predstavljajo tudi kontaminacije sevov leptospir v laboratorijskih zbirkah. Te se lahko kontaminirajo s saprofitnimi leptospirami ali z drugimi bakterijskimi vrstami, s tem da je zaznavanje in odstranitev slednjih bistveno lažja (Cerquiera in sod., 2010). Do kontaminacije patogenih sevov leptospir s saprofitnimi lahko pride v primeru, da so bile za pripravo gojišča uporabljene nesterilne sestavine. Znani so tudi primeri prenosa saprofitnih leptospir na material za delo preko vode (WHO, 2003). Obstaja tudi možnost napačnega označevanja in zamenjave vzorcev v procesu precepljanja in vzdrževanja zbirke (Cerquiera in sod., 2010).

Za nekatere seve iz zbirke je že bilo dokazano, da so kontaminirani s saprofitnimi leptospirami. To je bilo ugotovljeno z metodo PCR v realnem času ter potrjeno z MAT, in sicer za naslednje vzorce:

- 9K (Ballum, Ballum, Castellon 3; Amsterdam),
- 4L (Javanica, Javanica, Veldart Batavia 46; Amsterdam),
- 5L (Tarassovi, Tarassovi, MJ; Amsterdam),
- 7L (Panama, Panama, CZ214; Amsterdam) (Kodre, 2009).

Kot je razvidno iz rezultatov v prilogi B, se je tudi v našem primeru DNA omenjenih sevov pomnožila z vsemi pari oligonukleotidnih začetnikov, med drugim tudi z Sapro1/Sapro2, kar še dodatno potrjuje prisotnost kontaminacije.

Zaradi možnosti kontaminacije bi bilo potrebno zbirke leptospir, še posebej referenčne seve za MAT, periodično preverjati ter potrjevati njihovo identiteto. Cerquiera in sod. (2010), kot najbolj zanesljiv način za preverjanje referenčnih sevov, predlagajo testiranje z monoklonskimi protitelesi in sekvenciranje gena za 16S rRNA (Cerquiera in sod., 2010).

V treh primerih se DNA patogenih leptospir iz zbirke ni pomnožila z nobenim parom oligonukleotidnih začetnikov (priloga B), kar je najverjetnejše posledica razkroja DNA, zaradi večkratnega zamrzovanja in odmrzovanja vzorca. Možna je tudi prisotnost inhibitorjev v vzorcu (Gravekamp in sod., 1993).

Pri testiranju Lepat1/Lepat2 in Sapro1/Sapro2 smo uporabljali enak protokol, kot so ga uporabili Murgia in sod. (1997), z manjšimi spremembami. Namesto klasičnega encima smo uporabili »Hot start« polimerazo, ki za aktivacijo potrebuje 10-minutno segrevanje na 95 °C, zato se zmanjša količina nespecifičnih produktov.

Dolžina in temperatura posameznih stopenj pomnoževanja ter število ciklov pri reakciji z Lepat1/Lepat2 so se popolnoma ujemali s tistimi iz članka (preglednica 14), pri Sapro1/Sapro2 pa je bila edina razlika ta, da je podaljševanje verige v našem primeru trajalo eno minuto namesto dveh (preglednica 17). Murgia navaja, da so s Sapro1/Sapro2 in Lepat1/Lepat2 uspešno razlikovali med patogenimi in saprofitnimi leptospirami, saj so se rezultati obeh pomnoževanj med seboj izključevali (Murgia in sod., 1997). Uspešnost metode so pozneje potrdili tudi Mgode in sod. (2010).

Potrdili smo uspešnost metode, ki je trenutno v uporabi, to je PCR z LeptoA/LeptoB. Z omenjenima oligonukleotidnima začetnikoma, ki pomnožujeta del gena *rrs* vseh leptospir, smo uspeli pravilno identificirati 104 od 105 vzorcev oziroma 99,0 %. Edini vzorec z negativnim rezultatom je bil sev Icterohaemorrhagiae, Icterohaemorrhagiae, RGA (Zagreb), kateri se ni pomnožil niti z Lepat1/Lepat2, niti s Sapro1/Sapro2 (priloga B). Z omenjenim sevom smo izvedli tudi ponovitve, vendar smo prav tako pri vseh dobili negativen rezultat. Rezultati so najverjetneje posledica prej omenjenega razkroja DNA v vzorcu. Že nekajkratno zamrzovanje in odmrzovanje vzorca lahko poškoduje in povzroči razgradnjo DNA.

Sevi saprofitnih leptospir so bili v celotni preiskavi najbolj problematični, zato smo izvedli nekaj ponovitev PCR reakcij, v katere smo vključili vse seve Semaranga, Semaranga, Patoc 1 in nekatere njihove redčitve ter jih ponovno pomnožili z LeptoA/LeptoB, Lepat1/Lepat2 in Sapro1/Sapro2. Rezultati ponovljenih reakcij so prikazani v preglednici 19. Vzorci z oznakami 1E, 2F in 3J so dali pozitiven rezultat z vsemi tremi pari oligonukleotidnih začetnikov.

DNA seva Semaranga, Patoc, Patoc 1, pridobljenega iz Royal Tropical inštituta v Amsterdamu, je edina pravilno reagirala. Fragmente ustrezne velikosti smo dobili samo pri pomnoževanju z LeptoA/LeptoB in Sapro1/Sapro2, reakcija pomnoževanja z Lepat1/Lepat2 pa je bila negativna. Tudi redčitve (1:256, 1:512, 1:1024) tega seva so se pomnožile samo s Sapro1/Sapro2, z Lepat1/Lepat2 so dale negativen rezultat. Na podlagi tega bi lahko zaključili, da je ta sev čist, medtem ko so preostali trije kontaminirani s patogenimi leptospirami.

Pri ponovitvah PCR reakcij z LeptoA/LeptoB in redčeno DNA smo dobili šibko pozitivne ali negativne rezultate, saj so bile koncentracije DNA v uporabljenih redčitvah nizke. LeptoA/LeptoB ne pomnožujeta tako nizkih koncentracij DNA, kot ostala dva para oligonukleotidnih začetnikov, kar smo ugotovili že pri pomnoževanju redčitev DNA sevov za MAT.

Ponovljivost reakcije s posameznim parom oligonukleotidnih začetnikov je dobra, saj pri ponovitvah reakcij ni prišlo do odstopanja rezultatov (preglednica 19).

V diplomski nalogi smo želeli ugotoviti, ali lahko na podlagi pomnoževanja gena *rrs*, z oligonukleotidnimi začetniki Lepat1/Lepat2 in Sapro1/Sapro2, ločimo med patogenimi in saprofitnimi leptospirami. Na podlagi rezultatov smo prišli do zaključka, da razlikovanje med patogenimi in saprofitnimi leptospirami, z omenjenima paroma oligonukleotidnih začetnikov ni možno.

Ker pa je bila metoda uspešno uporabljena že v več primerih (Mgode in sod., 2010; Murgia in sod., 1997), bi bilo potrebno izvesti nadaljnje raziskave, v katerih bi specifičnost reakcije povečali z manipulacijo ostalih parametrov, kot sta na primer temperatura prileganja oligonukleotidnih začetnikov in koncentracija tarčne DNA. Povečati bi bilo potrebno nabor testiranih saprofitnih sevov ter predhodno ugotoviti morebitne kontaminacije. V kolikor bi bila takšna optimizacija uspešna, bi metodo lahko uporabili pri rutinski diagnostiki leptospiroze. Ker sta v primerjavi z »nested« PCR, ki se trenutno uporablja v Laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroze (IMI), reakciji z Lepat1/Lepat2 in Sapro1/Sapro2 enostopenjski, bi to pomenilo skrajšanje časa potrebnega za postavitev diagnoze.

5.2 SKLEPI

- Pomnoževanje DNA leptospir s paroma oligonukleotidnih začetnikov Lepat1/Lepat2 in Sapro1/Sapro2 je občutljiva, vendar pre malo specifična metoda, da bi razlikovala patogene leptospire od saprofitnih.
- Ponovljivost reakcij pomnoževanja z Lepat1/Lepat2 in Sapro1/Sapro2 je dobra, saj pri večkratnem pomnoževanju istih vzorcev ni prišlo do odstopanj rezultatov.
- Menimo, da je najslabša točka naloge dejstvo, da sevi tako patogenih, kot saprofitnih leptospir, niso bili čisti, zaradi česar specifičnost uporabljenе PCR metode ni bila dobra.

6 POVZETEK

Rod *Leptospira* je sestavljen iz vrst patogenih in nepatogenih spirohet. Patogene leptospire povzročajo bolezen, ki se imenuje leptospiroza in lahko prizadene živali in ljudi. Gre za zoonozo, ki je razširjena po vsem svetu, v Sloveniji pa je največ primerov v Pomurju. Glavni rezervoar predstavlja mali glodalci, človek je zgolj naključni gostitelj. Simptomi so različni in variirajo od subkliničnih okužb do težjih oblik z krvavitvami in odpovedjo več organov, ki se velikokrat konča s smrtnim izidom. Nepatogene leptospire so prisotne v naravi, največkrat v vodnih okoljih. Pri človeku ne povzročajo bolezni, a jih kljub temu občasno najdemo v kliničnih vzorcih, večinoma kot posledico kontaminacije.

Za uspešno postavitev diagnoze je ključnega pomena prava izbira kliničnega vzorca in najustreznejše metode. Najpogosteje odvzeti klinični vzorci ob sumu na leptospirozo so kri, likvor in urin, izbor vzorca pa je v glavnem odvisen faze bolezni. V diagnostiki leptospiroze se uporablja veliko fenotipskih in genotipskih metod, od katerih ima vsaka določene prednosti, kot tudi pomanjkljivosti. Referenčna metoda je mikroaglutinacijski test, vedno več pa se uporablja tudi molekularne metode. Te so sicer zelo občutljive in specifične, a zaradi tehnične zapletenosti in visoke cene pogosto neuporabne za delo v rutinskih laboratorijih.

Namen diplomskega dela je bil preveriti, ali lahko z uporabo oligonukleotidnih začetnikov Lepat1/Lepat2 in Sapro1/Sapro2 ugotovimo bodisi patogene ali saprofitne leptospire.

Trenutno se v Laboratoriju za diagnostiko borelioze in leptospiroze (IMI) od molekularnih metod uporablja pomnoževanje DNA z LeptoA/LeptoB in »nested« PCR, z oligonukleotidnimi začetniki L3/L4 in L4/LPato2. Metoda je zamudna, saj poteka v dveh stopnjah, poleg tega obstaja tudi velika nevarnost kontaminacije.

S pari oligonukleotidnih začetnikov LeptoA/LeptoB, Lepat1/Lepat2 in Sapro1/Sapro2 smo pomnožili DNA 13 sevov za MAT ter DNA sevov iz zbirke laboratorija. DNA sevov za MAT smo tudi redčili in redčitve uporabili v PCR reakcijah z istimi pari oligonukleotidnih začetnikov. Na podlagi rezultatov pomnoževanja redčene DNA smo ugotovili, da Lepat1/Lepat2 in Sapro1/Sapro2 pomnožujeta DNA v večjih redčitvah, kot LeptoA/LeptoB.

Z Lepat1/Lepat2 smo pravilno identificirali 92,5 % vzorcev DNA patogenih leptospir iz zbirke laboratorija. Z istima oligonukleotidnima začetnikoma se je pomnožilo tudi 80,0 % vzorcev DNA saprofitnih leptospir.

Pri pomnoževanju DNA saprofitnih leptospir iz zbirke s Sapro1/Sapro2 so vsi vzorci tvorili ustrezni PCR produkt. Med patogenimi leptospirami pa je bilo kar 60,3 % bilo takšnih, ki so z omenjenima oligonukleotidnima začetnikoma dali lažno pozitiven rezultat.

Največji problem testirane metode predstavlja veliko število lažno pozitivnih rezultatov, do katerih pride iz več razlogov. Za nekaj sevov iz zbirke je bilo že predhodno potrjeno, da so kontaminirani s saprofitnimi leptospirami. Druga možnost je ta, da je zaradi visoke koncentracije tarčne DNA prišlo do nespecifičnega pomnoževanja, kar je vodilo v lažno pozitiven rezultat.

Na podlagi dobljenih rezultatov smo prišli do zaključka, da bi bilo potrebno zvišati specifičnost metode, in sicer z manipulacijo drugih parametrov (temperatura prileganja oligonukleotidnih začetnikov, število ciklov, koncentracija tarčne DNA,...), saj v nasprotnem primeru metoda ni uporabna za razlikovanje med patogenimi in saprofitnimi leptospirami.

7 VIRI

- Ahmad S. N., Shah S., Ahmad F. M. 2005. Laboratory diagnosis of leptospirosis. *Journal of Postgraduate Medicine*, 51, 3: 195-200
- Ahmed N., Devi S. M., Valverde Mde L., 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*, 23, 5: 28
- Bedernjak J. 1993. Leptosiroze pri nas in po svetu. Murska Sobota, Pomurska založba: 136 str.
- Bedernjak J. 1995. Zdravljenje leptosiroz. *Medicinski Razgledi*, 34: 529-534
- Bedir O., Kilic A., Atabek E., Kuskucu A. M., Turhan V., Basustaoglu A. C. 2010. Simultaneous detection and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* spp. by multiplex real-time PCR (TaqMan) assay. *Polish Journal of Microbiology*, 59: 167-173
- Bernheimer A. W., Bey R. F. 1986. Copurification of *Leptospira interrogans* serovar Pomona hemolysin and sphingomyelinase C. *Infection and Immunity*, 54: 262-264
- Bharti A. R., Nally J. E., Ricaldi J. N., Matthias M. A., Diaz M. M., Lovett M. A., Levett P. N., Gilman R. H., Willig 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: 839-858
- Brown P. D., Gravekamp C., Carrington D. G., van de Kemp H., Hartskeerl R. A., Edwards C. N., Everard C. O., Terpstra W. J., Levett P. N. 1995. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of Medical Microbiology*, 43: 110-114

- Bulach D. M., Kalambaheti T., Pena-Moctezuma A., Adler B., 2000. Lipopolysaccharide biosynthesis in leptospira. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2, 4: 375-380
- Cerqueira G. M., McBride A. J., Queiroz A., Pinto L. S., Silva E. F., Hartskeerl R. A., Reis M. G., Ko A. I., Dellagostin O. A. 2010. Monitoring *Leptospira* strain collections: the need for quality control. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82, 1: 83-87
- Cha R. S., Thilly W. G. 1993. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *PCR Methods and Application*, 3, 3: 18-29
- Chappel R. J., Goris M., Palmer M. F., Hartskeerl R. A. 2004. Impact of proficiency testing on results of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 12: 5484-5488
- Cinco M. 2010. New insight into the pathogenicity of leptospires: evasion of host defences. *New Microbiologica*, 33: 283-292
- Faine S., Adler B., Bolin C., Perolat P. 1999. *Leptospira* and leptospirosis. 2nd ed. Melbourne, MedSci: 257 str.
- Farr R. W. 1995. Leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases*, 21: 1-8
- Galloway R. L., Levett P. N. 2008. Evaluation of a modified pulsed-field gel electrophoresis approach for the identification of *Leptospira* serovars. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78: 628-632
- Ganoza C. A., Matthias M. A., Saito M., Cespedes M., Gotuzzo E., Vinetz J. M. 2010. Asymptomatic renal colonization of humans in the peruvian Amazon by *Leptospira*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4, 2: e612, doi:10.1371/journal.pntd.0000612: 10 str.
- Gollop J. H., Katz A. R. , Rudoy R. C., Sasaki D. M. 1993. Rat-bite leptospirosis. *Western Journal of Medicine*, 159: 76-77
- Gordis L. 2004. Epidemiology. 3rd ed. Philadelphia, Elsevier Saunders: 71-77
- Gravekamp C., Van de Kemp H., Franzen M., Carrington D., Schoone G. J., Van Eys G. J., Everard C. O., Hartskeerl R. A., Terpstra W. J. 1993. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *Journal of General Microbiology*, 139, 8: 1691-1700

- Greenberg E. P., Canale-Parola E. 1977. Motility of flagellated bacteria in viscous environments. *Journal of Bacteriology*, 132: 356-358
- Haake D. A. 2000. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology*, 146: 1491-1504
- Herrmann J. L., Bellenberg E., Perolat P., Baranton G., Saint Girons I. 1992. Pulsed-field gel electrophoresis of NotI digests of leptospiral DNA: a new method of serovar identification. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 7: 1696-1702
- Hookey J. V. 1992. Detection of *Leptospiraceae* by amplification of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiology Letters*, 90: 267-274
- Johnson R. C., Rogers P. 1964. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires with 8-azaguanine. *Journal of Bacteriology*, 88: 1618-1623
- Johnson R. C., Harris V. G. 1967. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires: Growth at low temperatures. *Journal of Bacteriology*, 94, 1: 27
- Kaufmann A. F., Weyant R. S. 2009. *Leptospiraceae*. V: Medical microbiology. 6th ed. Murray P. R., Rosenthal K. S., Pfaller M. A. (eds.). Missouri, Elsevier Mosby: 621-625
- Ko A. I., Goarant C., Picardeau M. 2009. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7: 736-747
- Kodre M. 2009. Serotipska in genotipska opredelitev leptospir. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 83 str.
- Lee S. H., Kim K. A., Park Y. G., Seong I. W., Kim M. J., Lee Y. J. 2000. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar Lai. *Gene*, 254: 19-28
- Levett P. N. 2001. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 2: 296-326
- Levett P. N., Haake D. A. 2009. *Leptospira* species (leptospirosis). V: Principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Mendell G. L., Bennett J. B., Dolin R. (eds.). Philadelphia, Churchill Livingstone: 1-7
- Mérien F., Amouriaux P., Perolat P., Baranton G., Saint Girons I. 1992. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 2219-2224

- Merien F., Portnoi D., Bourhy P., Charavay F., Berlioz-Arthaud A., Baranton G. 2005. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. FEMS Microbiology Letters, 249: 139-147
- Mgode G. F., Machang'u R. S., Collares-Pereira M., Vieira L. M., Goris M. G. A., Engelberts M., Hartskeerl R. A. 2010. Challenges in determining the pathogenicity status of *Leptospira* isolates with phenotypic methods: The need for a polyvalent approach. African Journal of Microbiology Research, 4, 23: 2528-2533
- Mumford C. J. 1989. Leptospirosis and water sports. British Journal of Hospital Medicine, 41: 519-519
- 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
- Nascimento A. L. T. O., Verjovski - Almeida S., Van Sluys M. A., Montiero – Vitorello M. B., Camargo L. E. A., Digiampietri L. A., Harstkeerl R. A., Ho P. L., Marques M. V., Oliveira M. C., Setubal J. C., Haake D. K., Martins E. A. L. 2004. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 37, 4: 459-477
- Noubade R., Krishnamurthy G. V., Murag S., Venkatesha M. D., Krishnappa G. 2002. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires by polymerase chain reaction. Indian Journal of Medical Microbiology, 20: 33-36
- Palmer M. F. 1988. Laboratory diagnosis of leptospirosis. Medical Laboratory Sciences, 45: 174-178
- Picardeau M., Bulach D. M., Bouchier C., Zuerner R. L., Zidane N., Wilson P. J., Creno S., Kuczek 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., Médigue C., Adler B. 2008. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. PLoS One, 3, 2: e1607, doi: 10.1371/journal.pone.0001607: 9 str.

- Ramadass P., Jarvis B. D., Corner R. J., Penny D., Marshall R. B. 1992. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. International Journal of Systematic Bacteriology, 42: 215-219
- Ristow P., Bourhy P., Kerneis S., Schmitt C., Prevost M. C., Lilenbaum W., Picardeau M. 2008. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. Microbiology, 154: 1309-1317
- Rittenberg M. B., Linscott W. D., Ball M. G. 1958. Simple method for separating leptospirae from contaminating microorganisms. Journal of Bacteriology, 76: 669-970
- Roux K. H. 2009. Optimization and troubleshooting in PCR. Genome Research, 4: 185-194
- Ružić – Sabljić E. 2002. Leptospire. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 303-307
- Sehgal S. C., Vijayachari P., Sharma S., Sugunan A. P. 1999. LEPTO Dipstick: a rapid and simple method for serodiagnosis of acute leptospirosis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 93: 161-164
- Shukla J., Tuteja U., Batra H. V. 2003. 16S rRNA PCR for differentiation of pathogenic and non-pathogenic leptospira isolates. Indian Journal of Medical Microbiology, 21: 25-30
- Simões J., de Azevedo J. F., Palmeiro J. M. 1969. Some aspects of the Weil's disease epidemiology based on a recent epidemic after a flood in Lisbon (1967). Anais Da Escola Nacional de Saude Publica e de Medicina Tropical, 3: 19-32
- 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: 13, doi: 10.1186/1471-2334-2-13: 7 str.
- Tamai T., Sada E., Kobayashi Y. 1988. Restriction endonuclease DNA analysis of *Leptospira interrogans* serovars Icterohaemorrhagiae and Copenhageni. Microbiology and Immunology, 32: 887-894

- Tansuphasiri U., Chanthadee R., Phulsuksombati D., Sangjun N. 2006. Development of a duplex-polymerase chain reaction for rapid detection of pathogenic *Leptospira*. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 37, 2: 297-308
- Terpstra W. J. 2003. Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva, World Health Organization: 122 str.
- Trueba G. A., Bolin C. A., Zuerner R. L. 1992. Characterization of the periplasmic flagellum proteins of *Leptospira interrogans*. Journal of Bacteriology, 174: 4761-4768
- Uavechanichkul R., Sraphet S., Suwancharoen D., Triwitayakorn K. 2011. PCR-based technique for detection and differentiation of pathogenic and saprophytic *Leptospira* species. International Journal of Microbiological Research, 2: 43-48
- Vinh T., Adler B., Faine S. 1985. Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. Journal of General Microbiology, 132: 103-109
- Vital-Brazil J. M., Balassiano I. T., Oliveira F. S., Costa A. D., Hillen L., Pereira M. M. 2010. Multiplex PCR-based detection of *Leptospira* in environmental water samples obtained from a slum settlement. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 105, 3: 353-355
- Waitkins S. A. 1986. Leptospirosis as an occupational disease. British Journal of Industrial Medicine, 43: 721-725
- Wang Z., Jin L., Wegrzyn A. 2007. Leptospirosis vaccines. Microbial Cell Factories, 6: 39, doi: 10.1186/1475-2859-6-39: 10 str.
- WHO. 2003. Human leptospirosis: guidance for diagnosis surveillance and control. Geneva, World Health Organizaton: 109 str.
- Xue F., Dong H., Wu J., Wu Z., Hu W., Sun A., Troxell B., Yang XF., Yan J. 2010. Transcriptional responses of *Leptospira interrogans* to host innate immunity: significant changes in metabolism, oxygen tolerance, and outer membrane. PLoS Neglected Tropical Diseases, 4, 10: e857, doi: 10.1371/journal.pntd.0000857: 18 str.
- Yam P. A., Miller N. G., White R. J. 1970. A leptospiral factor producing a cytopathic effect on L cells. Journal of Infectious Diseases, 122: 310-317

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici, prof. dr. Evi Ružić-Sabljić, ki mi je bila s svojim znanjem, nasveti in pozitivno energijo v veliko pomoč pri pisanju diplomskega dela. Hvala za ves vložen trud in čas.

Velika zahvala gre Jasmini Zlotrg, za vso pomoč in koristne napotke pri eksperimentalnem delu. Hvala tudi ostalim zaposlenim v Laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroze, ki so mi med delom kakorkoli pomagali.

Zahvaljujem se tudi doc. dr. Tadeji Matos za recenzijo diplomskega dela.

Posebna zahvala je namenjena moji družini, ki mi vedno stoji ob stani, me spodbuja in verjame vame.

Hvala tudi vsem prijateljem za vse prijazne besede in podporo.

PRILOGE

Priloga A: Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir, ki se uporablajo za mikroaglutinacijski test in njihovih redčitev

1. Grippotyphosa				
Redčitev	Konc. DNA (ng/µL)	LeptoA/LeptoB	Lepat1/Lepat2	Sapro1/Sapro2
Neredčeno	35,22	++	++	-
1. redčitev (1:2)	25,75	++	++	-
2. redčitev (1:4)	10,99	+	++	-
3. redčitev (1:8)	9,09	++	++	-
4. redčitev (1:16)	-2,47	+	++	-
5. redčitev (1:32)	-1,78	+/-	++	-
6. redčitev (1:64)	-3,68	++	++	-
7. redčitev (1:128)	-5,20	++	++	+/-
8. redčitev (1:256)	-6,29	++	++	-
9. redčitev (1:512)	-8,32	++	++	+/-
10. redčitev (1:1024)	-7,63	++	++	-
11. redčitev (1:2048)	0,57	+/-	++	-
12. redčitev (1:4096)	-1,75	+/-	+	-
13. redčitev (1:8192)	-1,63	-	+	-
14. redčitev (1:16 384)	-1,19	-	+	-
15. redčitev (1:32 768)	-0,82	-	+	-
16. redčitev (1:65 536)	-1,45	-	+	+/-
17. redčitev (1:131 072)	-1,35	-	+/-	+/-
18. redčitev (1:262 144)	-1,28	-	-	-
19. redčitev (1:524 288)	-0,93	-	-	-
20. redčitev (1:1 048 576)	-1,62	-	+/-	-

2. Canicola				
Redčitev	Konc. DNA (ng/µL)	LeptoA/LeptoB	Lepat1/Lepat2	Sapro1/Sapro2
Neredčeno	62,94	++	+	-
1. redčitev (1:2)	32,78	+	++	-
2. redčitev (1:4)	16,45	+	++	-
3. redčitev (1:8)	6,68	-	++	-

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir, ki se uporabljajo za MAT in njihovih redčitev

2. Canicola				
Redčitev	Konc. DNA (ng/µL)	LeptoA/LeptoB	Lepat1/Lepat2	Sapro1/Sapro2
4. redčitev (1:16)	2,78	++	++	-
5. redčitev (1:32)	-0,23	++	++	-
6. redčitev (1:64)	-0,97	++	++	-
7. redčitev (1:128)	-2,91	+	++	-
8. redčitev (1:256)	-2,50	+	++	-
9. redčitev (1:512)	-1,29	+	++	-
10. redčitev (1:1024)	-0,25	+/-	+	-
11. redčitev (1:2048)	-1,20	-	+	-
12. redčitev (1:4096)	-1,39	-	+	-
13. redčitev (1:8192)	-2,41	-	+	-
14. redčitev (1:16 384)	-1,53	-	+/-	-
15. redčitev (1:32 768)	-1,67	-	+/-	-
16. redčitev (1:65 536)	-1,71	-	+/-	-
17. redčitev (1:131 072)	-2,16	-	+/-	+/-
18. redčitev (1:262 144)	-1,62	-	+/-	+/-
19. redčitev (1:524 288)	-0,82	-	-	+/-
20. redčitev (1:1 048 576)	-1,20	-	-	-

3. Sejroe				
Redčitev	Konc. DNA (ng/µL)	LeptoA/LeptoB	Lepat1/Lepat2	Sapro1/Sapro2
Neredčeno	44,51	++	++	-
1. redčitev (1:2)	20,01	++	++	-
2. redčitev (1:4)	9,03	++	++	-
3. redčitev (1:8)	3,38	+	++	-
4. redčitev (1:16)	-0,24	+	++	-
5. redčitev (1:32)	1,77	+	++	-
6. redčitev (1:64)	-1,67	+	++	-
7. redčitev (1:128)	-2,05	+	++	-

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir, ki se uporabljajo za MAT in njihovih redčitev

3. Sejroe				
Redčitev	Konc. DNA (ng/µL)	LeptoA/LeptoB	Lepat1/Lepat2	Sapro1/Sapro2
8. redčitev (1:256)	-1,02	+	++	-
9. redčitev (1:512)	-2,21	+	++	-
10. redčitev (1:1024)	-1,32	+/-	++	-
11. redčitev (1:2048)	-1,47	-	+	-
12. redčitev (1:4096)	0,49	-	+	-
13. redčitev (1:8192)	-1,56	-	+	-
14. redčitev (1:16 384)	-1,23	-	+/-	-
15. redčitev (1:32 768)	-1,91	-	+/-	-
16. redčitev (1:65 536)	-1,41	-	+/-	+/-
17. redčitev (1:131 072)	-1,40	-	+/-	-
18. redčitev (1:262 144)	-0,07	-	+/-	-
19. redčitev (1:524 288)	-0,53	-	+/-	-
20. redčitev (1:1 048 576)	-0,01	-	+/-	-

4. Pomona				
Redčitev	Konc. DNA (ng/µL)	LeptoA/LeptoB	Lepat1/Lepat2	Sapro1/Sapro2
Neredčeno	283,87	++	++	-
1. redčitev (1:2)	32,20	++	++	-
2. redčitev (1:4)	16,18	++	++	-
3. redčitev (1:8)	8,32	++	++	-
4. redčitev (1:16)	3,81	++	++	-
5. redčitev (1:32)	2,30	++	++	-
6. redčitev (1:64)	-0,34	++	++	-
7. redčitev (1:128)	-0,51	++	++	-
8. redčitev (1:256)	-1,60	++	++	-
9. redčitev (1:512)	-0,53	++	++	-
10. redčitev (1:1024)	-1,01	+	++	-
11. redčitev (1:2048)	-1,98	-	+	-

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir, ki se uporabljajo za MAT in njihovih redčitev

4. Pomona				
Redčitev	Konc. DNA (ng/µL)	LeptoA/LeptoB	Lepat1/Lepat2	Sapro1/Sapro2
12. redčitev (1:4096)	-0,74	-	+	-
13. redčitev (1:8192)	-1,59	-	+	-
14. redčitev (1:16 384)	-1,94	-	+	-
15. redčitev (1:32 768)	-2,60	-	+	-
16. redčitev (1:65 536)	-1,77	-	+/-	-
17. redčitev (1:131 072)	-1,21	-	+/-	+/-
18. redčitev (1:262 144)	-1,98	-	-	+/-
19. redčitev (1:524 288)	-1,89	-	-	-
20. redčitev (1:1 048 576)	-2,20	-	-	-

5. Cynopteri				
Redčitev	Konc. DNA (ng/µL)	LeptoA/LeptoB	Lepat1/Lepat2	Sapro1/Sapro2
Neredčeno	52,75	++	+	-
1. redčitev (1:2)	33,28	+	++	-
2. redčitev (1:4)	14,56	+	++	-
3. redčitev (1:8)	6,25	+	++	-
4. redčitev (1:16)	2,35	+	++	-
5. redčitev (1:32)	0,04	+	++	-
6. redčitev (1:64)	-0,45	+	/	/
7. redčitev (1:128)	-1,02	+	/	/
8. redčitev (1:256)	-0,05	+	/	/
9. redčitev (1:512)	-0,61	+/-	+	-
10. redčitev (1:1024)	-1,32	+/-	+	-
11. redčitev (1:2048)	-0,92	-	+	-
12. redčitev (1:4096)	-1,69	-	+/-	-
13. redčitev (1:8192)	-1,73	-	+/-	-
14. redčitev (1:16 384)	-1,93	-	-	-
15. redčitev (1:32 768)	-2,71	-	-	-

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir, ki se uporabljajo za MAT in njihovih redčitev

5. Cynopteri				
Redčitev	Konc. DNA (ng/µL)	LeptoA/LeptoB	Lepat1/Lepat2	Sapro1/Sapro2
16. redčitev (1:65 536)	-2,04	-	+/-	-
17. redčitev (1:131 072)	-2,10	-	+/-	-
18. redčitev (1:262 144)	-0,82	-	+/-	-
19. redčitev (1:524 288)	0,22	-	+/-	-
20. redčitev (1:1 048 576)	-2,19	-	+/-	-

6. Icterohaemorrhagiae				
Redčitev	Konc. DNA (ng/µL)	LeptoA/LeptoB	Lepat1/Lepat2	Sapro1/Sapro2
Neredčeno	60,39	++	++	-
1. redčitev (1:2)	29,27	++	++	-
2. redčitev (1:4)	12,22	++	++	-
3. redčitev (1:8)	11,19	++	++	-
4. redčitev (1:16)	3,06	++	++	-
5. redčitev (1:32)	-1,26	++	++	-
6. redčitev (1: 64)	-0,72	++	++	-
7. redčitev (1:128)	-1,60	+	++	-
8. redčitev (1:256)	-2,25	+	+	-
9. redčitev (1:512)	-1,55	+/-	+	-
10. redčitev (1:1024)	-2,41	-	+	-
11. redčitev (1:2048)	-2,5	-	+	-
12. redčitev (1:4096)	-0,7	-	+	-
13. redčitev (1:8192)	-1,82	-	+	-
14. redčitev (1:16 384)	-1,15	-	+/-	-
15. redčitev (1:32 768)	-1,89	-	-	-
16. redčitev (1:65 536)	-2,19	-	+/-	-
17. redčitev (1:131 072)	-1,38	-	+/-	-
18. redčitev (1:262 144)	-1,23	-	+/-	-
19. redčitev (1:524 288)	-1,56	-	+/-	-
20. redčitev (1:1 048 576)	-1,07	-	+/-	-

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir, ki se uporabljajo za MAT in njihovih redčitev

7. Semaranga				
Redčitev	Konc. DNA (ng/µL)	LeptoA/LeptoB	Lepat1/Lepat2	Sapro1/Sapro2
Neredčeno	123,5	-	+	++
1. redčitev (1:2)	35,14	++	+	++
2. redčitev (1:4)	15,55	++	+	++
3. redčitev (1:8)	8,90	++	+	++
4. redčitev (1:16)	0,88	++	+	++
5. redčitev (1:32)	-0,93	++	+	++
6. redčitev (1:64)	-0,81	++	+/-	++
7. redčitev (1:128)	-1,23	+	-	++
8. redčitev (1:256)	-1,07	+	-	++
9. redčitev (1:512)	-0,60	+	-	++
10. redčitev (1:1024)	-1,34	+	-	++
11. redčitev (1:2048)	-0,99	-	-	+
12. redčitev (1:4096)	-0,72	-	-	+
13. redčitev (1:8192)	-0,99	-	-	+
14. redčitev (1:16 384)	-1,14	-	-	+
15. redčitev (1:32 768)	-1,29	-	-	+
16. redčitev (1:65 536)	-1,24	-	-	+
17. redčitev (1:131 072)	-0,49	-	-	+
18. redčitev (1:262 144)	-0,74	-	-	+
19. redčitev (1:524 288)	-0,84	-	+/-	+/-
20. redčitev (1:1 048 576)	-1,04	-	+/-	+/-

8. Australis				
Redčitev	Konc. DNA (ng/µL)	LeptoA/LeptoB	Lepat1/Lepat2	Sapro1/Sapro2
Neredčeno	62,16	++	++	++
1. redčitev (1:2)	27,77	++	++	+
2. redčitev (1:4)	12,87	++	++	+

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir, ki se uporabljajo za MAT in njihovih redčitev

8. Australis				
Redčitev	Konc. DNA (ng/µL)	LeptoA/LeptoB	Lepat1/Lepat2	Sapro1/Sapro2
3. redčitev (1:8)	20,77	++	++	+
4. redčitev (1:16)	1,34	++	++	+
5. redčitev (1:32)	2,11	++	++	+
6. redčitev (1:64)	-4,83	++	++	+
7. redčitev (1:128)	-1,63	++	++	+/-
8. redčitev (1:256)	-2,20	++	++	+/-
9. redčitev (1:512)	-2,09	++	++	-
10. redčitev (1:1024)	-2,24	++	++	-
11. redčitev (1:2048)	-0,94	-	+	-
12. redčitev (1:4096)	-1,25	-	+	+/-
13. redčitev (1:8192)	-1,88	-	+	+/-
14. redčitev (1:16 384)	-1,22	-	+	+/-
15. redčitev (1:32 768)	-2,52	-	+	-
16. redčitev (1:65 536)	-2,33	-	+/-	+/-
17. redčitev (1:131 072)	-1,57	-	+/-	+/-
18. redčitev (1:262 144)	-2,29	-	+/-	-
19. redčitev (1:524 288)	-0,78	-	+/-	-
20. redčitev (1:1 048 576)	-2,12	-	+/-	-

9. Autumnalis				
Redčitev	Konc. DNA (ng/µL)	LeptoA/LeptoB	Lepat1/Lepat2	Sapro1/Sapro2
11. redčitev (1:2048)	-1,71	-	+	-
13. redčitev (1:8192)	-2,14	-	+	-
14. redčitev (1:16 384)	-1,41	-	+	-
15. redčitev (1:32 768)	-2,24	-	+	-

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir, ki se uporabljajo za MAT in njihovih redčitev

10. Pyrogenes				
Redčitev	Konc. DNA (ng/µL)	LeptoA/LeptoB	Lepat1/Lepat2	Sapro1/Sapro2
11. redčitev (1:2048)	-1,37	+/-	+	-
13. redčitev (1:8192)	-1,82	+/-	+	-
14. redčitev (1:16 384)	-2,33	-	-	-
15. redčitev (1:32 768)	-1,83	-	+	-

11. Bataviae				
Redčitev	Konc. DNA (ng/µL)	LeptoA/LeptoB	Lepat1/Lepat2	Sapro1/Sapro2
11. redčitev (1:2048)	-1,51	-	+	-
13. redčitev (1:8192)	-2,16	-	-	-
14. redčitev (1:16 384)	-1,35	-	+	-
15. redčitev (1:32 768)	-2,44	-	-	-

14. Panama				
Redčitev	Konc. DNA (ng/µL)	LeptoA/LeptoB	Lepat1/Lepat2	Sapro1/Sapro2
11. redčitev (1:2048)	-1,66	+	+	-
13. redčitev (1:8192)	-2,02	+/-	+	-
14. redčitev (1:16 384)	-0,68	-	+	-
15. redčitev (1:32 768)	-2,20	-	+	-

15. Javanica				
Redčitev	Konc. DNA (ng/µL)	LeptoA/LeptoB	Lepat1/Lepat2	Sapro1/Sapro2
11. redčitev (1:2048)	-2,45	+	+	-
13. redčitev (1:8192)	-2,06	+/-	+	-
14. redčitev (1:16 384)	-3,22	+/-	+	-
15. redčitev (1:32 768)	-1,94	+/-	+	-

Priloga B: Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir iz zbirke laboratorija

Serološka identifikacija	Vzorec	Lab.	Konc. DNA [ng/ µL]	LeptoA/ LeptoB	Lepat1/ Lepat2	Sapro1/ Sapro2
ANDAMANA, Andamana, CH11	3F	LJ	3,81	++	+	++
AUSTRALIS, Australis, Ballico	3C	LJ	1,70	++	++	-
	3C/1	LJ	9,87	/	+	-
	7C	LJ	4,93	++	+	++
	3E	LJ	1,01	++	++	+/-
	6F	ZG	2,89	++	++	+
	7F	ZG	2,04	++	++	++
	1G	ZG	2,01	++	++	-
	2H	ZG	6,44	++	-,+,+,+	+/-
	3H	ZG	5,20	++	++	+/-
	5H	ZG	10,78	++	++	+/-
	10H	P	4,27	++	++	++
	1I	A	8,46	++	++	++
	1I/1	A	3,33	++	++	+
	1I/2	A	27,27	/	+	-
AUTUMNALIS, Autumnalis, Akiyami A	2L	ZG	-0,80	++	++	+/-
	7E	LJ	3,18	++	++	+/-
	8K	P	7,53	++	+	+
	3L	A	-1,46	++	+	+
BALLUM, Ballum, Mus 127	3L/1	A	30,25	/	+	-
	19	ZG	1,88	/	++	-
	9E	LJ	2,28	++	++	-
BALLUM, Castellonis, Castellon 3	9K	A	2,85	++	+	+

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge B: Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir iz zbirke laboratorija

Seroška identifikacija	Vzorec	Lab.	Konc. DNA [ng/ µL]	LeptoA/ LeptoB	Lepat1/ Lepat2	Sapro1/ Sapro2
BALLUM, Castellonis, Castellon 3	9K/1	A	29,48	/	++	-
BATAVIAE, Bataviae, Van Tienen	9A	LJ	-1,08	++	-	-
	9A/1	LJ	1,98	/	++	-
	2E	LJ	1,66	++	+	+
	5E	LJ	3,23	++	++	+
	3G	ZG	2,38	++	+	+/-
	4K	P	6,23	++	+	+
	6L	A	0,75	++	+	+
	6L/1	A	27,43	/	+	+
BATAVIAE, Bataviae, Leyden	20	ZG	2,01	/	+/-	-
CANICOLA, Canicola, Hond Utrecht IV	2D	LJ	-0,89	++	++	+
	7H	P	4,54	+	-,+,+,-	++
	2K	A	4,90	++	+	-
	2K/1	A	35,85	/	+	+
	15	ZG	2,58	/	-	+
CYNOPTERI, Cynopteri, 3522C	9D	LJ	1,61	++	+	+
	4J	A	8,29	++	+	++
	8J	P	10,10	++	++	+
GRIPPOTYPHOSA, Grippotyphosa, Moskva V.	5A	LJ	3,95	++	+/-	-
	5A/1	LJ	18,56	/	+	-
	6A	LJ	2,93	++	+/-	-

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge B: Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir iz zbirke laboratorija

Serološka identifikacija	Vzorec	Lab.	Konc. DNA [ng/ µL]	LeptoA/ LeptoB	Lepat1/ Lepat2	Sapro1/ Sapro2
GRIPPOTYPHOSA, Grippotyphosa, Moskva V.	6A/1	LJ	3,21	/	+	-
	5C	LJ	0,51	+	+	+
	5C/1	LJ	1,43	/	-	++
	9C	LJ	6,69	++	+	+
	9F	ZG	-2,06	++	++	+
	6H	P	1,87	+	++	+/-
	1K	A	3,31	++	+	+/-
	1K/1	A	26,44	/	+	+
	6I	ZG	12,46	++	++	+
HEBDOMADIS, Hebdomadis, Hebdomadis	4F	ZG	10,43	++	+	++
ICTEROHAEMORRHAGIAE, Copenhageni, Wijnberg	1A	LJ	4,47	++	+	-
	1A/1	LJ	1,82	/	+	-
	2A	LJ	1,47	++	+	-
	2A/1	LJ	1,12	/	+	+/-
	3A	LJ	4,65	++	+	-
	3A/1	LJ	1,57	/	+	-
	4A	LJ	0,11	++	-	-
	8A	LJ	1,74	++	+	-
	8A/1	LJ	0,83	/	+	-
	10A	LJ	-0,77	++	-	-

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge B: Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir iz zbirke laboratorija

Seroška identifikacija	Vzorec	Lab.	Konc. DNA [ng/µL]	LeptoA/ LeptoB	Lepat1/ Lepat2	Sapro1/ Sapro2
ICTEROHAEMORRHAGIAE, Copenhageni, Wijnberg	10A/1	LJ	2,23	/	+	-
	1B	LJ	0,72	++	+	-
	1B/1	LJ	1,37	/	++	+/-
	3B	LJ	0,59	++	+	-
	3B/1	LJ	6,69	/	++	-
	4B	LJ	0,57	++	+	-
	4B/1	LJ	1,32	/	++	+/-
	5B	LJ	0,05	++	-	-
	5B/1	LJ	1,63	/	+	+/-
	10D	LJ	-0,18	++	+	+/-
	10J	P	13,27	++	++	+/-
	6K	A	3,14	++	+	+
	6K/1	A	30,07	/	+/-	+
ICTEROHAEMORRHAGIAE, Icterohaemorrhagiae, RGA	5F	ZG	24,25	-,-,-,-	-,-,-,-	-
	3I	ZG	8,74	++	++	+
	5I	ZG	7,28	++	++	+/-
	9I	ZG	7,15	++	-, +, +, +	+/-
	9I/1	ZG	4,47	/	-	-
	1J	ZG	13,96	++	+	-
	2J	ZG	14,88	++	+	+
	16	ZG	2,56	/	+/-	-

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge B: Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir iz zbirke laboratorija

Serološka identifikacija	Vzorec	Lab.	Konc. DNA [ng/ µL]	LeptoA/ LeptoB	Lepat1/ Lepat2	Sapro1/ Sapro2
JAVANICA, Javanica, Poi	21	ZG	2,17	/	++	-
	23	ZG	2,25	/	+	-
JAVANICA, Javanica, Veldart Batavia 46	1F	LJ	0,67	++	++	-
	4L	A	-1,89	++	+	+
PANAMA, Panama, CZ214	10E	LJ	2,06	++	++	-
	5K	P	6,82	++	+	++
	7L	A	1,19	++	++	++
	7L/1	A	41,42	/	++	-
POMONA, Pomona, Pomona	5D	LJ	2,61	++	+	+/-
	8D	LJ	2,09	++	++	-
	8F	ZG	1,14	++	+	+
	10F	ZG	1,82	++	++	+/-
	2G	ZG	1,23	++	++	+/-
	4G	ZG	1,01	++	++	+/-
	5G	ZG	4,69	++	++	+/-
	6G	ZG	9,05	++	++	+/-
	7G	ZG	3,32	++	++	+/-
	8G	ZG	0,56	++	++	-
	10G	ZG	3,63	++	+	+/-
	1H	ZG	5,90	++	++	+/-

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge B: Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir iz zbirke laboratorija

Serološka identifikacija	Vzorec	Lab.	Konc. DNA [ng/ µL]	LeptoA/ LeptoB	Lepat1/ Lepat2	Sapro1/ Sapro2
POMONA, Pomona, Pomona	9H	P	3,11	+	++	++
	7I	ZG	7,56	++	++	+
	7I/1	ZG	1,31	/	+	-
	8I	ZG	7,36	++	+	+
	5J	A	8,13	++	+	++
	5J/1	A	9,46	++	+	+/-
	14	ZG	1,73	/	+	-
	4	A	27,57	/	-	-
PYROGENES, Pyrogenes, Salinem	6E	LJ	-0,95	++	+	-
	7K	P	8,41	++	+	+
	10K	A	3,75	++	+	++
	10K/1	A	34,11	/	-	-
SAXKOEING	4H	ZG	3,12	++	++	+/-
SEJROE, Hardjo, Hardjo bovis	3D	LJ	1,40	++	+	+
SEJROE, Hardjo, Hardjoprajitno	22	ZG	1,81	/	+	-
SEJROE, Sejroe, M84	10B	LJ	5,51	++	+/-	-
	10B/1	LJ	2,73	/	++	+
	8H	P	3,98	+	++	++
	6J	A	11,90	++	+	+/-
	6J/1	A	24,43	/	+	+
	18/1	ZG	40,16	/	+	-
	18/2	ZG	1,69	/	+	-

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge B: Rezultati pomnoževanja DNA sevov leptospir iz zbirke laboratorija

Serološka identifikacija	Vzorec	Lab.	Konc. DNA [ng/ µL]	LeptoA/ LeptoB	Lepat1/ Lepat2	Sapro1/ Sapro2
SEJROE, Sejroe, M84	18/3	ZG	40,37	/	+	-
	1C	LJ	-0,36	++	-	-
	1C/1	LJ	33,03	/	++	+
	9J	ZG	8,34	++	+/-	+/-
	8L	LJ	0,81	++	+	+
	43	LJ	24,82	/	++	++
	9G	ZG	0,66	++	++	-
SEJROE, Wolffi, 3705	4D	LJ	1,75	++	++	+
SEMARANGA, Patoc, Patoc 1	1E	LJ	-0,47	++	+	++
	2F		1,08	++	+	++
	3J	A	9,40	++	+	++
	3J/1	A	41,22	/	-	+
SOFIA, Sofia, Sofia 874	4I	ZG	10,27	++	++	+
	10I	ZG	10,29	++	++	+
TARASSOVI, Tarassovi, MJ	8E	LJ	1,90	++	++	-
	2I	P	9,72	++	++	++
	3K	ZG	7,40	++	+	+
	5L	A	1,47	++	+	+
	5L/1	A	43,74	/	++	-
	17/1	ZG	2,17	/	++	-
	17/2	ZG	36,58	/	++	-
Serološko neopredeljen	9L	ZG	-0,77	++	+	+
	10L	ZG	0,21	++	+	+
	33	LJ	-1,11	/	+	+/-

Močno pozitiven rezultat ++

Pozitiven rezultat +

Šibko pozitiven (mejni) rezultat +/-

Negativen resultat -