

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**SEROLOŠKA DIAGNOSTIKA LEPTOSPIROZNIH
OKUŽB PRI BELEM DIHURJU (*Mustela putorius furo*)**

**SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF LEPTOSPIRAL
INFECTIONS IN DOMESTIC FERRETS (*Mustela*
putorius furo)**

Teja Rosa

Ljubljana, 2019

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

636.09:616–036.22:579.834:599.744.41:616.936–078:57.083.33 (043.2)

**SEROLOŠKA DIAGNOSTIKA LEPTOSPIROZNIH
OKUŽB PRI BELEM DIHURJU (*Mustela putorius furo*)**

**SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF LEPTOSPIRAL
INFECTIONS IN DOMESTIC FERRETS (*Mustela
putorius furo*)**

Teja Rosa

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom, pod mentorstvom doc. dr. Joška Račnika, dr. vet. med. in somentorstvom dr. Renate Lindtner Knific, dr. vet. med. iz Inštituta za perutnino, ptice, male sesalce in plazilce Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Ljubljana, 2019

POVZETEK

Ključne besede: leptosiroza – diagnostika – mikrobiologija; leptospire – imunologija; aglutinacijski testi; protitelesa proti bakterijam; dihurji – mikrobiologija; rezervoarji bolezni – veterina; zoonoze; seroepidemiološke študije.

Leptosiroza je zootifo, ki jo povzroča bakterija iz rodu *Leptospira*. O okužbi pri belem dihurju je zelo malo podatkov. Žeeli smo preveriti, kakšna je prevalenca protiteles proti različnim serovarom leptospire pri belih dihurjih ter kateri epidemiološki dejavniki predstavljajo tveganje za okužbo. V študijo smo vključili 154 vzorcev serumov belih dihurjev, ki so bili med letoma 2011 in 2019 kot pacienti sprejeti na Kliniko za ptice, male sesalce in plazilce Inštituta za zdravstveno varstvo perutnine ptic, malih sesalcev in plazilcev, Veterinarske fakultete. Za serološko diagnostiko leptospiroznih okužb smo uporabili mikroaglutinacijski test (MAT). Za testiranje smo uporabili žive kulture dvanajstih serovarov, ki se najpogosteje pojavljajo pri živalskih vrstah v Sloveniji. Test je bil pozitiven, kadar je bilo zlepiljenih ali liziranih najmanj 50 % leptospir. Pozitivne vzorce smo titrirali ter določili višino titra protiteles. Epidemiološke podatke smo zbrali s pomočjo ankete, ki so jo izpolnili lastniki. Izmed 154 pregledanih serumov jih je 25 reagiralo pozitivno. Večina pregledanih belih dihurjev je bila pozitivna na en serovar, ostali so bili pozitivni na dva, tri ali štiri serovare. Za statistično obdelavo smo izbrali 89 anket. Z anketami smo pridobili pomembne podatke o življenju belih dihurjev v Sloveniji. Rezultati so pokazali na statistično korelacijo med pozitivnimi živalmi instikom s tujimi dihurji ter prehranjevanjem z briquetirano hrano. Z raziskavo smo ugotovili, da se beli dihurji v Sloveniji okužijo z leptospirami ter da življenjski pogoji vplivajo na okužbo.

SUMMARY

Key words: leptospirosis – diagnosis – microbiology; leptospira – immunology; agglutination tests; antibodies, bacterial; ferrets – microbiology; disease reservoirs – veterinary; zoonoses; seroepidemiological studies.

Leptospirosis is a zoonosis caused by the bacterium from the *Leptospira* genus. Very little is known about leptospiral infection in domestic ferrets. The aim of the study was to determine the incidence of antibodies against *Leptospira* in ferrets and to investigate the risk factors for infection. The study includes 154 ferrets admitted to the Clinic for birds, small mammals and reptiles of the Institute for poultry, birds, small mammals and reptiles, between year of 2011 and 2019. The microscopic agglutination test (MAT) was used for the serological diagnosis. Living cultures of twelve serovars most commonly found in animals in Slovenia were used for testing. The positive reaction was evaluated as at least 50 % agglutination or lysis and the titration of positive samples was performed. Epidemiological data was provided by the owners. Out of 154 examined samples, 25 had antibodies against *Leptospira*. Most of the ferrets were positive to one serovar, some were positive to two, three or four serovars. 89 surveys were selected for statistical analysis. We obtained important data on the life of ferrets in Slovenia through the surveys. Results of the statistical analysis showed a correlation between positive ferrets and the contact with foreign ferrets and kibble feed. The results show that ferrets in Slovenia are in contact with *Leptospira*. Living conditions affect the possibility for infection.

KAZALO VSEBINE

1.	UVOD	1
1.1.	OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2.	CILJI RAZISKOVANJA.....	1
1.3.	DELOVNE HIPOTEZE	1
2.	PREGLED LITERATURE	2
2.1.	BELI DIHUR	2
2.2.	PREGLED ZGODOVINSKIH PODATKOV O POJAVLJANJU LEPTOSPIROZE 6	
2.2.1.	Prvi opis leptospiroze	6
2.2.2.	Pojavljanje okužbe z leptospiro pri domačih živalskih vrstah	8
2.2.3.	Pojavljanje okužbe z leptospiro pri ljudeh	9
2.3.	UGOTAVLJANJE POVZROČITELJA	11
2.3.1.	Morfologija leptospire	11
2.3.2.	Rast leptospir	12
2.4.	KLASIFIKACIJA LEPTOSPIR	13
2.5.	EPIZOOTOLOGIJA LEPTOSPIRE	14
2.5.1.	Okoljski pogoji	14
2.5.2.	Rezervoar leptospire	15
2.5.3.	Prenos leptospire	16
2.6.	PATOGENEZA IN KLINIČNI ZNAKI.....	16
2.6.1.	Patogeneza	16
2.6.2.	Klinični znaki	17
2.7.	DIAGNOSTIČNE METODE	19
2.7.1.	Klinična diagnostika	19

2.7.2. Direktne diagnostične metode	20
2.7.2.1. Bakterijska kultura	20
2.7.2.2. Mikroskopiranje v temnem polju	21
2.7.2.3. Inokulacija poskusnih živali.....	22
2.7.2.4. Verižna reakcija s polimerazo (PCR; angl. polymerase chain reaction)	23
2.7.3. Indirektne diagnostične metode.....	23
2.7.3.1. Serološka diagnostika.....	24
2.7.3.1.1. Metoda MAT	24
2.7.3.1.2. Druge serološke metode	26
2.8. DIREKTEN DOKAZ LEPTOSPIRE	26
2.8.1. Vzorci	26
2.8.2. Gojišče	27
2.8.3. Rast bakterij	28
2.8.4. Mikroskopska potrditev	28
2.9. ZDRAVLJENJE IN NADZOR	28
2.9.1. Terapija.....	28
2.9.2. Prognoza	30
2.9.3. Preventiva	30
2.9.3.1. Cepljenje.....	30
3. MATERIALI IN METODE	33
3.1. MATERIALI	33
3.1.1. Odvzem vzorcev krvi.....	33
3.1.2. Anketiranje lastnikov.....	34
3.2. METODE	35
3.2.1. Delo v laboratoriju za leptospirozo	35
3.2.1.1. Priprava vzorcev	36

3.2.1.2. Standardni materiali	36
3.2.1.3. Protokol: SEROLOŠKA DIAGNOSTIKA	36
3.2.1.3.1. Preliminarni testi	37
3.2.1.3.1.1. Makro metoda	37
3.2.1.3.1.2. Interpretacija rezultatov preliminarnega testa	37
3.2.1.3.2. Potrditveni test – titracija	37
3.2.1.3.2.1. Mikro metoda	37
3.2.1.3.2.2. Odčitanje in interpretacija rezultatov potrditvenega testa	39
3.2.2. Statistična obdelava podatkov	39
4. REZULTATI	40
4.1. SERUMSKI VZORCI	40
4.1.1. PREGLED POZITIVNIH VZORCEV GLEDE NA SEROVAR	41
4.1.2. POGOSTOST PROTITELES ZA POSAMEZNE SEROVARE	43
4.1.3. PREGLED ŠTEVILA VZORCEV PO LETIH	44
4.2. ANKETE	44
4.3. PREGLED POZITIVNIH VZORCEV NA PODLAGI ANKET	45
4.3.1. STATISTIČNA OBDELAVA PARAMETROV V ODVISNOSTI OD REZULTATA DETEKCIJE PROTITELES V SERUMU	47
4.4. ŽIVLJENJE BELIH DIHURJEV V SLOVENIJI	48
4.4.1. Sobivanje belih dihurjev z drugimi živalmi	48
4.4.2. Stik dihurjev z drugimi živalmi	48
4.4.3. Prehranjevalne navade belih dihurjev	49
4.4.4. Bivalno okolje belih dihurjev	49
4.5. CEPLJENJE PROTI KUŽNIM BOLEZNIM	50
5. RAZPRAVA	51
6. SKLEPI	64

7. ZAHVALA.....	65
8. LITERATURA.....	66
9. PRILOGE.....	74

KAZALO SLIK

Slika 1: Negativni MAT rezultat pod mikroskopiranjem v temnem polju.....25

Slika 2: Pozitiven MAT rezultat pod mikroskopiranjem v temnem polju25

KAZALO TABEL

Tabela 1: Pregled pozitivnih vzorcev glede na serovar	41
Tabela 2: Pogostost protiteles za posamezne serovare	43
Tabela 3: Pregled števila vzorcev v obdobju od 2011 do 2019	44
Tabela 4: Pregled opisnih podatkov iz anket za pozitivne vzorce.....	45
Tabela 5: Rezultati povezave med epidemiološkimi podatki in pozitivnimi titri protiteles....	47
Tabela 6: Sobivanje belih dihurjev z drugimi živalmi	48
Tabela 7: Stik dihurjev z drugimi živalmi	48
Tabela 8: Prehranjevalne navade belih dihurjev.....	49
Tabela 9: Bivanje belih dihurjev	49
Tabela 10: Cepljenje belih dihurjev proti kužnim boleznim	50

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

CPK: kreatinininska fosfokinaza, kreatinin kinaza; angl. creatine phosphokinase, creatine kinase

DNK: deoksiribonukleinska kislina; angl. deoxyribonucleic acid

ELISA: encimska imunoadsorpcijska preiskava; angl. The enzyme-linked immunosorbent assay

EMJH: Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harrisovo gojišče; angl. Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris culture medium

IU: internacionalne enote; angl. international unit

MAT: mikroaglutinacijski test; angl. microagglutination test

NNK: negativna nacionalna kontrola

PBS: fosfatni pufer s soljo; angl. phosphate-buffered saline

PCR: verižna reakcija s polimerazo; angl. polymerase chain reaction

SIRS: sindrom sistemskega vnetnega odziva; angl. systemic inflammatory response syndrome

1. UVOD

1.1. OPREDELITEV PROBLEMA

Za prostoživeče vrste iz družine Mustelidae se domneva, da so dovzetne za okužbo z leptospiro (Barros in sod., 2014). Protitelesa proti leptospiram so bila odkrita pri različnih vrstah mustelidov (Birtles, 2012), o okužbi z leptospiro pri belih dihurjih pa je le malo podatkov. Glede na način življenja in navade belih dihurjev se domneva, da je okužba z leptospiro lahko pristona tudi pri njih (Lewington, 2007; Mitchell in Tully Jr, 2009).

Med viri okužbe z leptospiro so najpogosteje omenjata stik s kontaminiranim urinom okužene živali ter izpostavljenost vodnemu okolju, kjer se nahajajo leptospire (Moinet in sod., 2010). Nekateri plenilci so lahko leptospiri izpostavljeni tudi preko prehrane z malimi sesalci, ki so pogosti prenašalci patogenih leptospir (Ayral in sod., 2016).

1.2. CILJI RAZISKOVANJA

Cilj raziskovanja je bil, da na podlagi serološke študije naključnih vzorcev ugotovimo, če se beli dihurji lahko okužijo z leptospiram. Poleg tega smo tudi žeeli ugotoviti, ali način življenja in prehrana belih dihurjev vplivata na možnost okužbe.

1.3. DELOVNE HIPOTEZE

- Beli dihurji se okužijo z leptospiram in razvijejo imunski odgovor s protitelesi.
- Večje tveganje za okužbo je povezano z načinom življenja (npr. življenje v zunanjem okolju, stik z zunanjimi viri vode – luže, jezera, ...).
- Večje tveganje za okužbo je povezano s hrano (npr. hranjenje s surovim mesom, hranjenje s celim plenom).
- Metoda MAT je primerna metoda za ugotavljanje protiteles proti Leptospiri v serumu belih dihurjev.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. BELI DIHUR

Beli dihur ali vretica, *Mustela putorius furo*, je bil udomačen že pred približno 2000-3000 let (Powers in Brown, 2011). Domnevajo, da je bil udomačen iz navadnega (*M. putorius*) (Gustafson in sod., 2018) ali sibirskega dihurja (stepskega) dihurja (*M. eversmanni*) (Powers in Brown, 2011; Mitchell in Tully Jr, 2009).

Družina kun (Mustelidae), v katero spadajo tudi beli dihurji, sicer obsega 67 vrst v 26 rodovih in se deli na poddružine podlasic (Mustelinae), skunkov (Mephitinae), vider (Lutrinae), jazbecev (Melinae) in medarskega jazbeca (Mellivorinae). Dihurje uvrščamo v poddružino podlasic (Mustelinae), ki obsega 10 rodov s 33 vrstami. Predstavniki poddružine podlasic so: mala podlasica (*Mustela nivalis*), hermelin (*M. erminea*), navadni dihur (*M. putorius*), dolgorepa podlasica (*M. frenata*), sibirska podlasica (*M. sibirica*), mink (*M. vison*), kuna belica (*Martes foina*), kuna zlatica (*M. martes*), sobolj (*M. zibellina*), ribja kuna (*M. pennati*) in rosomah (*Gulo gulo*) (Macdonald, 1996).

Družina Mustelidae je razširjena na vseh celinah, z izjemo Antarktike in Avstralije, na Novo Zelandijo pa so bile vrste iz te družine naseljene. Njihov habitat sega od arktične tundre do tropskega deževnega gozda. Živijo na tleh, na drevesih, v sladkih vodah in na odprttem morju (Macdonald, 1996).

Bele dihurje so sprva uporabljali za lov na kunce in za nadzor glodavcev, zlasti na Britanskem otočju, Avstraliji in Novi Zelandiji, v zadnjem času pa so predvsem zaradi svoje narave, majhne velikosti ter dokaj enostavne oskrbe in namestitve (Mitchell in Tully Jr, 2009) postali pogosti hišni ljubljenčki (Gustafson in sod., 2018).

Ime *Mustela putorius furo* izhaja iz latinskih besed »*putoe*« in »*furonem*«, ki pomenita »smrdljivi tat«, kar ustrezno opiše njihovo »nagajivo« obnašanje in za mnoge neprijetni mošusni vonj (Mitchell in Tully Jr, 2009). Značilni mošusni vonj izvira iz izločka žlez lojnic, ki se v velikem številu nahajajo v koži, katerega izločanje pa se pri spolno aktivni živali v obdobju razmoževanja še poveča. Posledično se pojavi še močnejši telesni vonj, rumeno

razbarvano/obarvano in mastno krvno. Močen, oster vonj proizvajajo tudi z izločkom žlez ob anusu, vendar se ta vonj redko izrazi, razen če se živali močno prestrašijo in iztisnejo z izločkom napolnjene analne mešičke (Mitchell in Tully Jr, 2009).

Za bele dihirje je značilno dolgo vitko telo s kratkimi mišičnimi nogami, dolgim tankim repom, majhnimi očmi in kratkimi ušesi. Od nosu do konice repa merijo od 44 do 46 cm. Samci so večji od samic, s povprečno telesno maso 1-2 kg, samice so manjše, telesne mase 0,5-1 kg. Telesna masa je pri kastriranih samcih lahko nižja, pri steriliziranih samicah pa višja. Njihova pričakovana življenjska doba znaša med 5 in 8 let (Mitchell in Tully Jr, 2009), po navedbah nekaterih avtorjev pa tudi 8 do 10 let, največ pa 15 let (Meredith in Redrobe, 2002). So zelo živahni in aktivni, za igro in hranjenje porabijo približno 25 % dneva, preostalih 75 % pa izkoristijo za spanje (Mitchell in Tully Jr, 2009).

Beli dihirji so lahko nastanjeni posamično ali v skupinah (Mitchell in Tully Jr, 2009). Pod nadzorom lahko sobivajo tudi s psi ali mačkami, ne pa s kunci ali glodavci (Meredith in Redrobe, 2002). Bivajo lahko znotraj ali zunaj hiše (Mitchell in Tully Jr, 2009). Velikost kletke ni pomembna, dokler lastniki poskrbijo, da se živali lahko igrajo pod nadzorom zunaj kletke (Meredith in Redrobe., 2002). Sicer uživajo v majhnem temnem prostoru, kjer se lahko skrivajo in spijo. Radi imajo igrače, vendar se je potrebno izogibati mehkim gumijastim in penastim igračam, saj take predmete pogosto zgrizejo in koščke pojedo. Če imamo živali na prostem, jih je potrebno zaščititi pred ekstremnimi vremenskimi vplivi (Mitchell in Tully Jr, 2009).

Beli dihirji so striktni mesojedi in potrebujejo temu primerno prehrano. Svetuje se dieta z visoko kakovostnimi živalskimi beljakovinami (30-40 %) in maščobami (18-30 %) ter z nizko vsebnostjo ogljikovih hidratov in vlaknin. Lahko se jim ponudi visokokakovostno hrano za mačje mladiče ali pa komercialno pripravljeno hrano za dihirje (Mitchell in Tully Jr, 2009). Nekateri svetujejo hrano na osnovi surovega mesa z zelo nizko vsebnostjo ogljikovih hidratov (Blanchard in sod., 2018). Hranjenje s celim plenom (miši, podgane) je za dihirje najprimernejša dieta (Johnson-Delaney, 2014). Paziti moramo pri prehrani z jajci, saj nekateri lastniki belih dihirjev opisujejo povezavo med uživanjem jajc in drisko; vzrok za to je lahko sestava jajčnega beljaka, ki vsebuje nekatere snovi, ki zmanjšujejo prebavljinost jajčnega beljaka (Blanchard in sod., 2018). Komercialni hrani za mačke in pse se je potrebno izogibati,

saj nimajo ustreznega razmerja beljakovin, pogosto pa vsebuje tudi beljakovine rastlinskega izvora, ki pa za bele dihirje niso primerne in povzročajo zdravstvene težave (npr. sečne kamne). Novejša raziskava je pokazala, da je verjetnost, da beli dihirji, hranjeni s komercialno pripravljeno hrano, postanejo letargični in/ali obolijo z inzulinom in/ali hipoglikemijo trikrat večja kot pri ustrenejši prehrani. Nevarnost pri komercialno pripravljeni hrani je tudi pojav prebavnih težav z drisko, kar je lahko posledica koncentracij ogljikovih hidratov v tovstni hrani. V naravni dieti navadnih, prostoživečih dihirjev škroba namreč ni (Blanchard in sod., 2018). Vodo morajo imeti vedno na voljo (Mitchell in Tully Jr, 2009), lahko jo ponudimo v skledi ali preko napajalnika. Večina lastnikov ima raje napajalnike, saj dihirji sklede z vodo med igro hitro prevrnejo (Meredith in Redrobe, 2002).

Bele dihirje rutinsko cepimo proti virusu pasje kuge in steklini. Virus pasje kuge namreč pri necepljenih belih dihirjih povzroča hudo vročinsko obolenje z visoko smrtnostjo. Tudi proti steklini je smiselno cepiti vse dihirje. Priporočila za cepljenje proti pasji kugi so različna; najpogosteje uporabljeni časovni razpored je prvič pri 6-8 tednih, drugič pri 10-12 tednih. Cepivo proti steklini apliciramo pri starosti 14-16 tednov. Cepivo apliciramo subkutano na interskapularnem delu telesa. Za obe bolezni se priporoča redna letna revakcinacija (Mitchell in Tully Jr, 2009).

Prostoživeče vrste iz družine Mustelidae so tudi med živalmi, za katere se smatra, da so dovzetne za okužbo z leptospiro (Barros in sod., 2014). Njihova vloga v epidemiologiji leptospiroze se zdi pomembna, saj te vrste predstavljajo potencialne izločevalce in gostitelje za razmoževanje leptospir (Moinet in sod., 2010).

Leptospire oziroma protitelesa proti leptospiram so bila odkrita pri različnih vrstah mustelidov, vključno z evropskim (*Mustela lutreola*) in ameriškim minkom (*Mustela vison*), navadnim dihirjem, kuno zlatico in kuno belico (Birtles, 2012).

Vir okužbe z leptospiro je običajno neposreden ali posreden stik z okuženo živaljo ali njenim urinom, večje tveganje pa je povezano z izpostavljenostjo vodnemu ali vlažnemu okolju, kjer se leptospire nahajajo (Moinet in sod., 2010). Nekatere živali so leptospiri izpostavljene tudi preko prehrane, če je slednja sestavljena iz malih sesalcev, ki so pogosto prenašalci različnih serovarov leptospir (Ayral in sod., 2016).

V Evropi je bilo opravljenih nekaj študij o pojavnosti leptospire pri Mustelidih (Moinet in sod., 2010; Fennestad in Borg-Petersen, 1972; Ayral in sod., 2016; Hartskeerl in Terpstra, 1996; Slavica in sod., 2007), sicer pa je o leptospirozi pri teh vrstah le malo podatkov.

Na območju Francije so študije pokazale visoko prevalenco protiteles za *L. interrogans* pri majhnih zvereh, zlasti pri prostoživečih predstavnikih mustelidov. Ugotovili so, da imajo predvsem kune visoko prevalenco protiteles za leptospiro (Moinet in sod., 2010). V vzorcih kun belic so našli DNK dveh vrst leptospir, in sicer *L. kirschneri* in *L. borgpetersenii* (Ayral in sod., 2016). Te vrste leptospir imajo sicer raje suhe kopenske habitate, zato so sklepalni, da je tveganje za izpostavljenost leptospiri bolj povezano z njihovo prehrano kot z življenskim prostorom (Moinet in sod., 2010).

Leptospiro so pri kunah belicah našli tudi v Belgiji, in sicer so tam poročali o odkritem serovaru *Grippoorthyphosa* (Desmecht, 1990-1991).

Prostoživeče mustelidne vrste so pregledali tudi na Danskem, kjer so preiskali populacije malih podlastic, hermelinov in navadnih dihirjev. Serološka preiskava vzorcev malih podlastic je pokazala šibko pozitivno reakcijo pri dveh živalih, in sicer v titru 1:30, za serovar Saxkoebing. Iz vzorcev 37 hermelinov so uspešno izolirali tri seve serovarov Poi, Pomona in Sejroe. Poskus izolacije leptospir iz enajstih vzorcev navadnih dihirjev je bil sicer neuspešen, je pa serološka preiskava pokazala šibko pozitivno reakcijo pri dveh živalih, in sicer v titru 1:30 za serovar Saxkoebing (Fennestad in Borg-Petersen, 1972).

O prevalenci protiteles leptospire pri nekaterih vrstah prostoživečih živali so poročali tudi na Hrvaškem, kjer so v obdobju med leti 1996 in 2005 opravili raziskavo, v kateri so med drugim vzorčili tudi 7 kun belic. Med njimi je bilo 62,5 % pozitivnih. Z metodo MAT so v serumu ugotovili protitelesa proti štirim serovarom, in sicer Australis, Pomona, Sejroe in Icterohaemorhagiae. Rezultatov se zaradi nizkega števila vzorcev ne more aplicirati na celotno populacijo na Hrvaškem, kljub temu pa gre za pomemben pokazatelj, da se kuna belica lahko okuži z leptospiro (Slavica in sod., 2007).

Glede na to, da je bila okužba z leptospiro opisana pri drugih vrstah iz družine Mustelidae (Barros in sod., 2014) ter glede na življenske navade belih dihirjev (Mitchell in Tully Jr, 2009) se domneva, da je leptospiroza lahko prisotna tudi pri njih. Včasih so bele dihirje

uporabljali za lovjenje podgan in miši na senikih ter drugje, kjer so lahko bili izpostavljeni mišemu in podganemu urinu, ki je lahko vseboval leptospire (Lewington, 2007). Beli dihirji, ki so bili izpostavljeni z leptospiro okuženim psom, so bolj izpostavljeni tveganju za nastanek bolezni. Domneva se, da se beli dihirji, ki so vzrejeni za namene krznarske industrije, prav tako lahko okužijo z leptospiro (Pignon in Mayer, 2011).

Kot lahko še dodatno razberemo iz zelo skopih in razdrobljenih literarnih podatkov, sta bila v preteklosti iz asimptomatskih belih dihirjev izolirana serovara *Grippoorthyphosa* in *Icterohaemorrhagiae*. V serološki študiji na prostoživečih belih dihirjih na Novi Zelandiji niso našli pozitivnih živali, kljub temu da je v tej državi prevalenca okužbe z leptospiro pri miših in podganah visoka. Miši in podgane so glavna hrana prostoživečih dihirjev na Novi Zelandiji. V drugi študiji so poskusili tudi izolirati leptospire iz ledvičnega tkiva prostoživečih dihirjev, vendar so bili rezultati negativni. Leta 2011 je bila opravljena raziskava, v kateri so poročali, da še ni dokazov in podatkov o prenosu leptospiroze iz dihirja na človeka (Pignon in Mayer, 2011). Novejših raziskav na to temo nismo našli.

2.2. PREGLED ZGODOVINSKIH PODATKOV O POJAVLJANJU LEPTOSPIROZE

2.2.1. Prvi opis leptospiroze

Prvi je leptospirozo kot bolezen pri ljudeh opisal Adolf Weil, leta 1886 (WHO, 2003). Weil je opisal vrsto zlatenice, za katero so bile značilne splenomegalija, motnje v delovanju ledvic, konjunktivitis in kožni izpuščaji. Bolezen so poimenovali Weilova bolezen. Kljub temu, da je bila etiologija bolezni neznana, so domnevali, da je bolezen nalezljivega značaja, pogosto so jo povezovali z aktivnostmi na prostem, pri katerih so osebe prišle v stik z vodo .

Zgodovina leptospiroze sicer sega tisočletja nazaj. Težko je trditi z gotovostjo, vendar se zdi, da so bili nekateri zgodnji izbruhi bolezni, opisani v starodavnih besedilih, pravzaprav leptospiroza. Na Kitajskem tovrstna besedila govorijo o »zlatenici riževih polj«, na Japonskem pa so simptome, ki jih danes poznamo kot leptospirozo, opisali kot »jesenska mrzlica« ali »sedem dnevna mrzlica«. V Evropi in Avstraliji so znake bolezni imenovali kot

»bolezen delavcev na sladkornih plantažah« (ang. cane-cutter's disease), »bolezen prašičje črede«, »blatna vročica/mrzlica«, še preden je bila etiologija sploh poznana.

Za prvi dokaz leptospire je zaslužen Stimson (Adler, 2015), ki je leta 1907 opisal mikroorganizem v ledvičnih tubulih pacienta, umrlega zaradi t.i. rumene mrzlice (Dutta in Christopher, 2005). Simson je za dokaz uporabil takrat nedavno opisano tehniko obarjanja srebra za opazovanje spirohet. Opazili so jih le v tkivu ledvic, ne pa tudi v jetrih ali srcu. Stimson je odkriti organizem poimenoval *Spirocheta interrogans*.

Leptospira je bila pri ljudeh skoraj istočasno, vendar popolnoma neodvisno, izolirana na Japonskem in v Evropi (Adler, 2015). Spirohete so izolirali Inada in sodelavci na Japonskem leta 1915 (Dutta in Christopher, 2005). Morskemu prašičku so intraperitonealno injicirali kri pacienta z Weilovo boleznijo, nakar je morski prašiček razvil tipično obliko akutne leptospiroze, ki je značilna za živali. Klinični znaki, ki so jih opisali pri okuženih budrah, so bili zlatenica, konjunktivitis, neješčnost, anemija, krvavitve in albuminurija. Spirohete so opazili v različnih tkivih, največ v jetrih in ledvicah. Ta odkritja so primerjali z raziskavami, opravljenimi postmortem na ljudeh, in ugotovili podobne rezultate .

Ime Leptospira je leta 1918 predlagal Noguchi z namenom, da bi lahko ločevali spirohete, ki so povzročale Weilovo bolezen, od drugih spirohet, ki so jih poznali takrat. Razlikovanje je temeljilo na morfoloških značilnostih.

V dvajsetih letih 19. stoletja so Japonci izvedli prve študije v zvezi s cepivi. Raziskave so delali na morskih prašičkih. Ugotovili so tudi, da bolhe in komarji niso prenašalci okužbe ter da so boljše možnosti ozdravitve, če terapijo začneš, še preden se pojavi zlatenica.

Ugotovili so tudi, da Weilova bolezen z značilno hudo klinično sliko ni najpogostejša oblika okužbe z leptospiro. V naslednjih desetletjih je postalo jasno, da se leptospiroza tako pri ljudeh kot tudi živalih lahko kaže kot bolezen z blagimi znaki, podobnimi gripi, ali pa kot resna, pogosto smrtna oblika bolezni, za katero so bili značilni odpoved jeter in ledvic ter hude krvavitve v pljučih.

Ugotovili so, da je izid okužbe odvisen od serovara, s katerim je bil okužen pacient. Serovar Hardjo na primer pri ljudeh nikoli ne povzroči smrtne oblike.

Leta 1982 je prišlo do spremembe v taksonomiji; sklenili so, da obstajata dve vrsti leptospire, in sicer *L. interrogans*, ki vključuje patogene serovare, in *L. biflexa*, v katero so zajeti predstavniki saprofitskih serovarov (Adler, 2015). Ta klasifikacija je bila v veljavi do leta 1989, zatem pa so rod Leptospire klasificirali na podlagi genetskega sorodstva (Greene, 2006).

Po letu 2000 je na področju leptospire sledilo mnogo raziskav. Ponovno je prišlo do sprememb v taksonomiji in identifikaciji, odkrite so bile nove vrste, pomembna odkritja so sledila tudi pri razumevanju delovanja leptospire na celičnem in molekularnem nivoju. Napredek v odkrivanju se je še izboljšal z možnostjo sekvenciranja celotnega genoma (Adler, 2015).

Danes je ime Adolfa Weila povezano s hudo obliko leptospiroze, ki ji pravimo Weilova bolezen. Vzrok zanjo je najpogosteje okužba s serovaroma Icterohaemorrhagiae in Copenhageni (WHO, 2003).

Leptospire so bile do danes izolirane pri skoraj vseh vrstah sesalcev na vseh kontinentih, z izjemo Antarktike (Adler, 2015).

2.2.2. Pojavljanje okužbe z leptospiro pri domačih živalskih vrstah

Leptospire najdemo tudi pri domačih vrstah živali, in sicer pri govedu, prašičih, psih, konjih, ovcah, malih glodavcih (Markey in sod., 2013) ter pri mačkah (Beaudu-Lange in Lange, 2014). Med njimi najpogosteje zbolijo prav govedo, prašiči, psi in ovce (Kruljc, 2010), okužba je pri njih pogosto subklinična (Markey in sod., 2013). Prisotni so lahko tudi klinični znaki, kot so vročina, zlatenica, anoreksija, abortusi, pri govedu lahko opazimo padec mlečnosti (Markey in sod., 2013).

Pri konjih se običajno pojavi subakutna ali latentna oblika leptospiroze (Kruljc, 2010). Zanje je značilen ponavljamajoči se iridociklitis, ki pogosto vodi v slepoto (Markey in sod., 2013). Možno je tudi, da do pojava kliničnih znakov sploh ne pride, lahko je le povišan titer protiteles (Kruljc, 2010).

Klinična leptosiroza je pri psih pogosta (Schuller in sod., 2015). V primerjavi s starejšimi, so mlade živali bolj prizadete (Greene, 2006). Okužba se lahko kaže kot perakutna (Greene, 2006), akutna (Markey in sod., 2013) ali subakutna (Greene, 2006). Za akutno okužbo so značilni visoka vročina, bruhanje (Markey in sod., 2013), dehidracija, tahipneja, periferni vaskularni kolaps, pohitren nepravilni pulz, hematemiza, petehije, ikterus (Greene, 2006). Smrt običajno nastopi zgodaj (Markey in sod., 2013). Za subakutno bolezen so značilni vročina, neješčnost, bruhanje, polidipsija in poliurija, odpor do gibanja, paraspinalna hipertenzija zaradi vnetja mišic, meningitisa ali vnetja ledvic. Pojavijo se lahko tudi petehije in podplutbe, konjunktivitis, uveitis, oligurija in anurija. Lahko se pojavita tudi kašelj in dispneja, ki običajno spremljata konjunktivitis, rinitis in tonsilitis (Greene, 2006). Lahko pride do neplodnosti in abortusov (Markey in sod., 2013).

Pri mačkah se klinična oblika bolezni redko izrazi (Schuller in sod., 2015). Mačke so lahko kronični prenašalci, lahko pa razvijejo tudi klinično obliko leptosiroze, ki lahko vodi v kronično odpoved ledvic. Najpogostejsi klinični znaki, ki jih opisujejo pri mačkah, so poliurija, polidipsija, vročina, zlatenica. Bolezen lahko sprembla visoka smrtnost. Na pojav kliničnih znakov povezanih z leptosirozo moramo biti še posebej pozorni pri zunanjih mačkah, ki lovijo plen; najpogosteje različne male glodalce (Beaudu-Lange in Lange, 2014).

2.2.3. Pojavljanje okužbe z leptosiro pri ljudeh

Leptospira je najbolj razširjena zootonoza na svetu (Barros in sod., 2014). Zelo pogosta je v tropskih področjih, kjer so razmere za prenos najugodnejše (Bharti in sod., 2003). Za endemično področje najpogosteje veljajo ruralna področja, kjer je večja možnost posrednega ali neposrednega stika med človekom, okuženimi glodalci in njihovimi izločki (Pal in Prelog, 2003).

Število humanih primerov leptosiroze na celi svetu ni točno znano. Poročila pravijo, da je pojav bolezni med 0,1-1/100,000 prebivalcev na leto v toplih klimatskih območjih in 10-100/100,000 prebivalcev v tropskih vlažnih predelih (WHO, 2003).

Leptosiroza je leta 2010 v državah Evropske unije veljala za redko bolezen (Dupouey in sod., 2014). Največja pojavnost leptosiroze v preteklih letih je bila v srednje evropskih in

vzhodno evropskih državah (Pappas in sod., 2008). Najvišje število okužb je bilo v Romuniji (0,84/100,000 prebivalcev), v Sloveniji je to število znašalo 0,44/100,000 prebivalcev. Najpogostejši serovar je bil Icterohemorrhagiae (Dupouey in sod., 2014).

V Sloveniji je endemično območje v Pomurju. Med leti 1945 in 2001 je bilo pri nas prijavljenih 756 primerov leptosiroze, največ jih je bilo prav v Pomurju, in sicer 658 (87 %) (Pal in Prelog, 2003).

Podatki kažejo na velik razkorak med razširjenostjo leptosiroze pri ljudeh in živalih po posameznih območjih Slovenije (Bedernjak, 1995).

Leptosiroza je bila razglašena za najpogostejo poklicno pridobljeno bolezen, najbolj izpostavljeni so lovci, veterinarji in delavci v mesni industriji (Slavica in sod., 2010), sicer pa se večina okužb pojavlja pri mladih odraslih moških in otrocih (Dutta in Christopher, 2005).

Ljudje se najpogosteje okužijo direktno preko kontakta z urinom okužene živali, lahko pa tudi preko kontaminirane vode ali zemlje (Adler in De la Pena Moctezuma, 2010). Prenos s človeka na človeka je zelo redek (Dutta in Christopher, 2005).

Bolezen lahko varira od blage oblike, ki je podobna gripi in mine sama po sebi, do resne okužbe z multiorgansko odpovedjo in celo smrtjo (Adler in De la Pena Moctezuma, 2010). V 85-90 % primerov bolezen poteka blago in spontano izzveni (Pal in Prelog, 2003).

Pri človeku so za akutno leptosirozo značilni povišana telesna temperatura, mrzlica, glavobol, bolečine v mišicah, odsotnost apetita, slabost, bruhanje in izčrpanost. Glavobol je pogosto zelo hud. Aseptični meningitis se lahko pojavi pri do 25 % vseh primerov bolezni. Za nevrološko obliko leptosiroze je v prvi fazi značilna t.i. zamegljenost čutil (ang. clouded sensorium) in meningizem, za drugo fazo pa so značilni tipični nevrološki znaki, kot so glavobol, bruhanje in drugi znaki obolenja centralnega živčnega sistema. Je pa neobičajno, da bi se leptosiroza primarno izrazila kot nevrološka bolezen (Bharti in sod., 2003).

Najhujšo obliko leptospire imenujemo Weilova bolezen. Zanjo je značilna zlatenica, odpoved ledvic (Bharti in sod., 2003), akutna dihalna stiska, prizadetost srčne mišice in krvavitve. Smrtnost je lahko visoka, običajno med 5 in 40 % (Pal in Prelog, 2003), največ bolnikov umre ob koncu drugega tedna bolezni (Bedernjak, 1995).

Akutna odpoved ledvic se pojavi pri 16-40 % vseh primerov in zanjo običajno ni značilna oligurija. Pojav oligurije je pomemben pokazatelj, da se bolezen lahko konča s smrtno pacienta (Bharti in sod., 2003).

Kronična leptosiroza se pri ljudeh lahko kaže kot glavobol, bolečina v očeh, uveitis (Chu in sod., 1998), utrujenost in pomanjkanje energije. Opisan je bil pojav depresije, ki se je v različni intenzitvosti kazala tudi več let. Pacienti so poročali o psiholoških spremembah, nihanju razpoloženja, razdraženosti ter o spremembah v odnosih do drugih. Opisan je bil tudi parainfekcijski encefalomielitis (Pasternak in sod., 1980).

Leptospire so občutljive na številne antibiotike. Da je zdravljenje uspešno, je potrebno s terapijo začeti zgodaj, svetuje se celo profilaktično zdravljenje ob primeru znane izpostavljenosti (Hirsh in Zee, 1999). Pri zdravljenju je pomembno, da redno spremljamo stanje bolnika ter morebitne simptomatske spremembe zdravimo sproti (Bedernjak, 1995).

Preventivno se priporoča skrb za dobro osebno higieno, zaščitna oblačila, izogibanje stika z urinom živali ali vodo (Adler in De la Pena Moctezuma, 2010).

2.3. UGOTAVLJANJE POVZROČITELJA

2.3.1. Morfologija leptospire

Leptospire so tanke spiralne bakterije (Hirsh in Zee, 1999), ki spadajo v red Spirochaetales (Markey in sod., 2013). Njihovo ime izvira iz grških besed »leptos«, ki pomeni tanek, in »spira,« ki pomeni spirala (Dutta in Christopher, 2005). Tipične celice imajo na eni ali obeh strani kljukico (Markey in sod., 2013), zaradi česar delujejo, kakor da so v obliki črke S ali C (Hirsh in Zee, 1999) – prav zaradi te podobnosti z znakom »?«, ki predstavlja vprašaj, jih je Stimson leta 1907 poimenoval *Spirochaeta interrogans* (Sellon in Long, 2014).

Bakterije so gram negativne, vendar so v rutinsko fiksiranih razmazih neprepoznavne. Pozitivne so na oksidazo in katalazo, številne imajo lipazno aktivnost, nekatere proizvajajo ureazo (Hirsh in Zee, 1999).

Vse leptospire so si med seboj zelo podobne, z le manjšimi razlikami, zato njihova morfologija ne pripomore k ločevanju med patogenimi in saprofitskimi oblikami (WHO, 2003).

Celice so dolge 6-20 µmetrov, široke pa 0,1-0,3 µmetra (Sellon in Long, 2014). Imajo 2 periplazemska flagela in 3-5 ploščatih diskov (Markey in sod., 2013). Leptospire so zelo gibljive (Bharti in sod., 2003). Aktivno premikanje v tekočini jim omogoča periplazemski biček (Kruljc, 2010). Možne so 3 vrste gibanja, in sicer: 1) vrtenje okrog centralne osi, 2) progresivno gibanje v smeri ravnega konca in 3) krožni gibi. Njihov videz in gibljivost se spreminja glede na naravo medija/gojišča (Bharti in sod., 2003).

Bakterijska celica leptospire je sestavljena iz zunanjega plašča, aksialnih fibril (endoflagela) in citoplazmatskega cilindra. Zunanji ovoj združuje značilnosti kapsule in zunanje membrane (Hirsh in Zee, 1999). Kot pri drugih spirohetah, imajo tudi leptospire dvojno membransko strukturo, v kateri sta citoplazemska membrana in celična stena iz peptidoglikana tesno povezane. Ta struktura prekriva citoplazemski cilinder in aksialne fibrile. Zunanja membrana je bogata z liposaharidi (Sellon in Long, 2014). V celični steni je prisoten endotoksin. Hemolizin (sfingomielinaza C) je povezan z nekaterimi serovari, njegova citotoksičnost je bila dokazana *in vivo* (Hirsh in Zee, 1999).

2.3.2. Rast leptospir

Leptospire so obligatorni aerobi (Hirsh in Zee, 1999).

Bakterije ne prenesejo izsuševanja ali hipertoničnosti, občutljive so na topoto, kisline, baze in osnovna dezinfekcijska sredstva (Mohammed in sod., 2011).

Optimalna temperatura za njihovo rast znaša 28-30 °C (Bharti in sod., 2003). Temperatura 45-50 °C jih uniči v 10-60 minutah, temperatura 56 °C jih uniči v 5 minutah, pri temperaturi 60 °C pa propadejo že v 10 sekundah (Kruljc, 2010).

Preživijo lahko v nevtralnem ali nekoliko alkalnem pH, njim ugodna pH vrednost znaša med 6,8-7,4 (Bharti in sod., 2003). V pH, ki je višji od 8 ali nižji od 6, hitro propadejo (Witmer in sod., 2004).

Mehanizmi preživetja leptospire v okolju so še vedno slabo raziskani (Casanovas-Massana in sod., 2018). Bakterije so sposobne preživeti v alkalni zemlji, blatu, močvirju, rekah, organih in tkivih živih ali mrtvih živali, preživijo tudi v razredčenem mleku (Mohammed in sod., 2011). V zemlji in izvirski vodi lahko preživijo več kot tri tedne (Casanovas-Massana in sod., 2018). Zunaj gostitelja se ne razmnožujejo (Mohammed in sod., 2011), zato se domneva, da okolje ne predstavlja rezervoarja iz epidemiološkega vidika, temveč je zgolj začasni nosilec patogena. Okolje je tudi bistvenega pomena, da se patogen razprši/razširi (Casanovas-Massana in sod., 2018).

Rezultati raziskave Casanovas-Massana in sod. so pokazali, da lahko *L. interrogans* v okolju preživi od nekaj dni, do najmanj 4 tedne v izvirski vodi. Kljub temu, da v okolju ne preživi v velikih koncentracijah, lahko majhne populacije bakterij vztrajajo pri koncentracijah manj kot 100 celic/g ali ml dlje časa. Infektivna doza je pri ljudeh in živalih neznana, zato se ne sme podcenjevati vloge, ki jo imajo te majhne populacije bakterij pri prenašanju okužb na ljudi in pri vzdrževanju patogena v živalskih rezervoarjih. Domneva se, da je lahko daljsa obstojnost bakterije pri nizkih koncentracijah dovolj za prenos bolezni (Casanovas-Massana in sod., 2018).

V slani morski vodi lahko najdemo saprofitske halofilne leptospire (WHO, 2003), načeloma pa velja, da leptospire v slani vodi ne morejo preživeti (Dutta in Christopher, 2005). Bakterije prav tako ne morejo preživeti v rečni vodi v naravnih pogojih (Mohammed in sod., 2011).

Ne rastejo na krvnem agarju ali na ostalih gojiščih, ki se jih uporablja rutinsko. Večina gojišč, na katerih letospire rastejo, je tekočih ali poltekočih (0,1 % agar). Z večanjem gostote spirohet se v teh gojiščih pojavi blaga motnost. V poltekočih/poltrdnih gojiščih je rast koncentrirana v disku (Hirsh in Zee, 1999), približno 0,5 cm pod površino medija, ki tekom inkubacije postaja vse bolj motno. Značilno rast imenujemo Dingerjev prstan ozziroma Dingerjev disk (Mohammed in sod., 2011).

2.4. KLASIFIKACIJA LEPTOSPIR

Leptospire spadajo v red Spirochaetales, ki poleg družine *Leptospiraceae* vključuje še *Spirochaetaceae* in *Brachyspiraceae*. Rod *Leptospira* je bil sprva razdeljen na dve vrsti, in

sicer *L. interrogans* in *L. biflexa* (Markey in sod., 2013). *Leptospira interrogans* je sestavljena iz patogenih oblik leptospir, *Leptospira biflexa* pa iz saprofitskih (WHO, 2003).

Po DNK–DNK hibridizaciji so bile leptospire najprej razvrščene v 16 genomospeciesov (Levett, 2003), trenutno pa je opisanih že 22 genomospeciesov, ki so razdeljeni na patogene in nepatogene leptospire ter na vmesno skupino (Fisher in sod., 2018).

Poleg tehnik DNK pa se serološko zasnovan sistem taksonomije, ki uporablja celične antogene, uporablja za razdelitev genomske vrste *Leptospira* spp. v serovare. Na ta način je bilo opredeljenih preko 200 serovarov (Faine in sod., 1999).

Poleg fenotipske klasifikacije je torej na voljo tudi genotipska klasifikacija (Markey in sod., 2013), vendar se ta manj uporablja (Mohammed in sod., 2011). Oba sistema za razvrščanje nista vedno skladna. Sevi, ki spadajo v isti serovar, lahko tako pripadajo različnim vrstam leptospir (WHO, 2003).

L. biflexa združuje okrog 60 serovarov, pod *L. interrogans* pa jih spada več kot 225. Na podlagi seroloških metod je bilo dokazano več kot 300 serovarov leptospir, več kot 200 jih je patogenih (Mohammed in sod., 2011). Serovari se razlikujejo v gostitelju, geografski distribuciji in patogenosti. (Hirsh in Zee, 1999) Serovar predstavlja osnovno enoto za ločevanje patogenih leptospir med seboj. Serovari, ki jih odlikujejo antigenske podobnosti, se združujejo v serološke skupine. Več kot 200 opisanih serovarov patogenih leptospir se tako deli na 25 seroloških skupin (WHO, 2003).

Serovari so bistvenega pomena iz epidemiološkega vidika, saj lahko nekateri razvijejo blago patogeno razmerje z določeno vrsto živalskega gostitelja, ki ga imenujemo komenzalizem ali priskledništvo (WHO, 2003). Številni serovari imajo za naravnega gostitelja neko specifično živalsko vrsto, čeprav se lahko živali in ljudje okužijo z različnimi serovari. Serovari, ki povzročajo bolezni pri živalih, se razlikujejo med posameznimi državami, saj se določeni serovari pojavljajo le v določenih geografskih regijah (Markey in sod., 2013).

2.5. EPIZOOTIOLOGIJA LEPTOSPIRE

2.5.1. Okoljski pogoji

Leptosiroza velja za sezonsko bolezen (Schuller in sod., 2015), čeprav se lahko okužbe pojavljajo preko celega leta (Bedernjak, 1993). Te na severni polobli vrh dosežejo v pozнем poletju in trajajo do zgodnje jeseni (avgust-oktober) (Hartskeerl in Terpstra, 1996). V tropskem in subtropskem pasu je sezonsko nihanje manjše (Bedernjak, 1993), izbruhi leptospiroznih okužb pa so tam največji. V zmernih klimatskih pogojih leptospire običajno povzročajo sporadične epidemije (Fisher in sod., 2018). Okužbe so pogosto vezane na različne dejavnike, kot so hudo deževje (Schuller in sod., 2015), poplave (Silva in sod., 2008), kmetijska opravila (Bedernjak, 1993). V raziskavi, ki so jo opravili v Švici, so ugotovili, da je mesečno število akutnih primerov leptospiroze povezano s povprečno mesečno temperaturo in povprečno količino padavin (Schuller in sod., 2015).

2.5.2. Rezervoar leptospire

Številni serovari leptospire so se prilagodili na specifičnega gostitelja, ki mu pravimo rezervoar bolezni (Slavica in sod., 2010). Najpogostejši rezervoar leptospir predstavljajo glodalci, sledijo jim divji mesojedi (Hirsh in Zee, 1999). Raziskava, ki so jo opravili v Sloveniji, je pokazala, da so lahko tudi plazilci potencialni rezervoar leptospire (Lindtner Knific in sod., 2013).

Med glodalci za najpogostejšega gostitelja velja navadna rjava podgana (*Rattus norvegicus*) (Dutta in Christopher, 2005).

Živali, ki predstavljajo rezervoar bakterij, običajno kažejo minimalne klinične znake, lahko pa znaki okužbe sploh niso prisotni (Hirsh in Zee, 1999). Mehanizmi, ki so podlaga za tako prilagoditev serovarov na specifičnega gostitelja, so nejasni (Birtles, 2012).

Leptospire so prisotne v ledvičnih tubulih in se izločajo z urinom, pogosto tudi več mesecev. Nekateri serovari lahko ostanejo tudi v genitalnem traktu okužene živali (Markey in sod., 2013).

Okužba se lahko prenese na druge živali, ki jim rečemo naključni gostitelji (Markey in sod., 2013).. Nobena vrsta sesalcev ne more biti izključena kot morebitni gostitelj (Hirsh in Zee, 1999). Okužbo z leptospiro so odkrili pri skoraj vseh toplokrvnih živalih, vključno z

morskimi levi, medtem ko za ptice ni znano, da bi se lahko okužile v naravi (Higgins, 2004). Pomembnega prenašalca leptospire in onesnaževalca okolja z bakterijo predstavljajo potepuški psi, ki preko urina izločajo leptospire v okolico (Satbige in Patil, 2018).

2.5.3. Prenos leptospire

Leptospire za prenos ne potrebujejo nobenih vektorjev, kot so npr. členonožci (Markey in sod., 2013). Okužba je možna na dva načina, in sicer kongenitalno ali pa preko urina okužene živali. Kongenitalni okužbi sledita ozdravitev in dolgo izločanje patogenov z urinom (Bedernjak, 1993). Leptospira se med divjimi in domačimi sesalci ter ljudmi običajno prenaša preko kontaminirane vode (Barros in sod., 2014), kontaminirane krme (Hirsh in Zee, 1999) ali pa z neposredno izpostavljenostjo urinu okuženih živali (Barros in sod., 2014), ki velja za primarni vir okužbe (Kruljc, 2010). Glodavci predstavljajo naravni rezervoar za mnoge serovare leptospire, obenem pa so plen za nekatere mesojede živali. Za mačke se domneva, da bi se lahko okužile preko odnosa plen-plenilec, zato se domneva, da je tak prenos okužbe možen tudi pri belih dihurjih (Hartmann in sod., 2013). Posredna izpostavljenost je odvisna od blagih in mokrih/vlažnih pogojev, ki ugodno vplivajo na preživetje leptospire v okolju (Hirsh in Zee, 1999).

2.6. PATOGENEZA IN KLINIČNI ZNAKI

2.6.1. Patogeneza

Patogeneza leptospiroze ni popolnoma pojasnjena (Dutta in Christopher, 2005).

Leptospire vstopijo v telo preko majhnih ran ali odrgnin, preko sluznic, lahko tudi preko mokre kože (Adler in De la Pena Moctezuma, 2010). Za to so potrebni posebni mehanizmi, ki omogočajo adhezijo in transmembranske prehode (Mohammed in sod., 2011). Bakterije se ne zadržujejo na mestu vdora (Bedernjak, 1993), temveč jih lahko v krvnem obtoku najdemo že v nekaj minutah (Van de Maele in sod., 2008). Verjetno je, da širjenje leptospir skozi tkiva olajša njihova gibljivost (Van de Maele in sod., 2008).

Poznamo dve fazi okužbe, in sicer prva je bakteriemična, druga pa imunska (Dutta in Christopher, 2005).

Bakterije v krvnem obtoku krožijo tudi do 7 dni. To fazo imenujemo bakteriemična faza (Adler in De la Pena Moctezuma, 2010). Ko število leptospir v krvi in tkivih doseže kritično raven, se pojavijo poškodbe zaradi delovanja toksinov ali toksičnih celičnih komponent. Aktivnost endotoksina je bila opisana pri več serovarov leptospir (Mohammed in sod., 2011). Širjenje spirohet v različnih tkivih povzroča sistemsko bolezen, ki ima širok in nespecifičen spekter kliničnih znakov (Dutta in Christopher, 2005). Leptospire kolonizirajo predvsem ledvice in jetra (Hirsh in Zee, 1999). Primarno nastanejo poškodbe endotelija majhnih krvnih žil, kar vodi do lokalizirane ishemije v organih, in posledične nekroze ledvičnih tubulov, poškodbe jetrnih celic, poškodbe pljuč, meningitisa, miozitisa in placentitisa. Krvavitve in zlatenica se pojavijo v hujših primerih. Običajno je prisotna blaga granulocitoza in splenomegalija (Adler in De la Pena Moctezuma, 2010). Spremembe, ki jih povzročajo leptospire, so odvisne tudi od serovara (Hirsh in Zee, 1999).

V drugi, imunski fazi bolezni, lahko imunski odziv gostitelja igra vlogo pri poškodbah endotelija (Dutta in Christopher, 2005). Ko se v obtoku pojavijo protitelesa, le-ta odstranijo leptospire iz krvnega obtoka in tkiv s fagocitozo (Adler in De la Pena Moctezuma, 2010), z izjemo ledvic, kjer lahko leptospire vztrajajo še dolge tedne (Hirsh in Zee, 1999). Dolgotrajna poškodba tkiv lahko vodi do komplikacij in brazgotinjenja (Adler in De la Pena Moctezuma, 2010).

Inkubacijska doba je bila v eksperimentalnih študijah približno 7 dni, vendar se lahko spreminja glede na gostitelja in serovar (Schuller in sod., 2015), odvisna je tudi od infektivnega odmerka, hitrosti rasti organizmov, njihove toksičnosti in imunosti gostitelja (Mohammed in sod., 2011).

2.6.2. Klinični znaki

Leptosiroza se lahko kaže kot akutna, subakutna in kronična oblika (Lindtner, 1994).

Klinično izražanje znakov je v literaturi različno opisano. Larson in sod. opisujejo dva tipa leptospiroze pri psih, in sicer klinično obliko, ki se izrazi brez zlatenice in tisto, pri kateri je zlatenica prisotna (Larson in sod., 2017). Lewington pa v svoji knjigi poroča o štirih opisanih sindromih pri psih, in sicer o ikteričnem, hemoragičnem, uremičnem in reproduktivnem (Lewington, 2007). Prevladujoči klinični znaki akutne leptospiroze so pri psih povezani z akutno poškodbo ledvic in jetrno okvaro. Klinični znaki, povezani z ledvičnim obolenjem, vključujejo polidipsijo in poliurijo, ki se lahko razvijeta sočasno z azotemijo ali brez nje. Vročina se lahko pojavi v zgodnji fazi bolezni (Schuller in sod., 2015). Pri odraslih živalih se telesna temperatura dvigne na 39,5-40,0 °C, pri mladih pa na 40,5-41 °C (Birtles, 2012). Vročino lahko spremljajo bolečine, odpor do gibanja, šibkost in togost hoje. Bolečine lahko povzročijo miozitis, meningitis in/ali vnetje v drugih organih, kot so ledvice in trebušna slinavka. Možen je pojav respiratornih znakov, kot so tahipneja in blaga do huda dispnea, zaradi pljučnega edema, aspiracijske pljučnice, bolečine ali acidoze. Kot nadaljevanje akutne bolezni se lahko razvije pankreatitis, kar lahko pojasni akutno neugodje v trebuhu, ter tudi anoreksijo in bruhanje pri psih. Pri psih in pri ljudeh so možne tudi poškodbe miokarda, kar nam pokažejo elektrokardiografske anomalije in zvišanje koncentracij troponina v serumu pri nekaterih živalih (Greene, 2006). Do smrti lahko pride tudi brez pojava kliničnih znakov (Lewington, 2007).

Pri mačkah so klinični znaki redki, okužbe so običajno klinično nezaznavne. Klinični znaki so lahko prisotni pri nekaterih okuženih živalih, najpogosteje se kažejo kot intersticijski nefritis, ki ga neposredno povzročajo spirohete (Hartmann in sod., 2013).

Če klinične zname pri psu povežemo z možnimi kliničnimi znaki pri belem dihurju, opazimo, da gre za zelo širok spekter. Lewington je poročal o kliničnem primeru belega dihurja s hudo zlatenico, ki se je pojavila potem, ko je dihur zaužil miš. Omenjeni dihur je poginil kljub zdravljenju (Lewington, 2007).

Živali, ki si opomorejo od okužbe, lahko postanejo asimptomatski nosilci, ki kužne leptospire dlje časa zadržujejo v ledvičnih tubulih in jih izločajo v okolje (Adler in De la Pena Moctezuma, 2010).

2.7. DIAGNOSTIČNE METODE

2.7.1. Klinična diagnostika

Za leptosirozo je značilno, da so klinični znaki zelo različni. Enake klinične zname pogosto vidimo pri drugih okužbah, noben izmed znakov ni patognomoničen. V primeru večjega števila kliničnih znakov, ki se lahko pojavijo pri okužbi z leptospirami, lahko postavimo sum, da gre za leptosirozo (Bedernjak, 1993).

Za diferencialno diagnostiko moramo pomisliti na različne kužne bolezni, odvisno od tega, kateri organski sistemi so prizadeti. Med diferencialnimi diagnozami so tako različne virusne in bakterijske okužbe. V primeru, da gre za lažji potek bolezni, brez izrazitejših znakov o prizadetosti organov, je klinično težko ločiti virusno okužbo od leptosiroze (Bedernjak, 1993).

Večina rutinskih laboratorijskih testov, ki se jih izvaja, nam poda nespecifične ugotovitve, ki jih ponavadi povezujemo z delovanjem leptospir ali drugih dejavnikov bolezni na posamezni organ (Dutta in Christopher, 2005).

❖ Krvna slika

Število levkocitov je lahko nizko, normalno ali povišano, običajno je povezano s premikom v levo (Dutta in Christopher, 2005). V bakteriemični fazi se lahko pojavi levkopenija (Schuller in sod., 2015). Pri ljudeh so bile višje vrednosti belih krvničk in nevtrofilcev dokazane pri bolnikih s hudo obliko bolezni (De Silva in sod., 2014).

Pri psih je pogosta blaga do huda trombocitopenija (Schuller in sod., 2015). Nekateri avtorji trdijo, da stopnja le-te ne kaže povezave z resnostjo bolezni (Van de Maele in sod., 2008), drugi pa trdijo, da je pomembno povezana z odpovedjo ledvic (Dutta in Christopher, 2005).

Pri približno polovici psov z leptosirozo je prisotna anemija. Ta je lahko blaga do zmerna, vzroki zanjo pa so lahko izguba krvi preko dihal ali prebavil ali pa anemija zaradi vnetnih procesov (Schuller in sod., 2015).

❖ Biokemijska preiskava krvi

Vpletenost jeter, ledvic in centralnega živčnega sistema je lahko prisotna v kateri koli kombinaciji (Dutta in Christopher, 2005). Pri biokemijski preiskavi krvi lahko najdemo povišane vrednosti sečnine in kreatinina (Schuller in sod., 2015). Vrednosti so odvisne od resnosti bolezni (Van de Maele in sod., 2008). Vpletenost jeter je lahko blaga ali močna (Dutta in Christopher, 2005), lahko pride do hiperbilirubinemije in izrazitega povečanja alkalne fosfataze ter drugih jaternih encimov. Pri leptosirozi pri psih se pogosto pojavijo anomalije v elektrolitskem ravnovesju, kot so hipo- in hiperkaliemija, hipo- in hiperfosfatemija, hiponatriemija in hipokloremija (Schuller in sod., 2015). Vrednost serumske kreatininske fosfokinaze (CPK) se običajno poviša zaradi vključenosti prizadetosti mišic (Dutta in Christopher, 2005). Zaradi odpovedi ledvic in dehidracije se lahko razvije metabolna acidoza (Van de Maele in sod., 2008).

❖ Urinska analiza

Pri analizi urina najpogosteje opazimo glukozurijo, proteinurijo, cilindre, kot posledico poškodbe ledvic, nizko specifično težo in aktivni urinski sediment (Van de Maele in sod., 2008). Kljub odsotnosti motenj v delovanju ledvic, lahko pogosto najdemo tudi piurijo in hematurijo (Dutta in Christopher, 2005).

2.7.2. Direktne diagnostične metode

Metode so namenjene odkrivanju leptospiralni njihove nukleinske kisline v živalskih tkivih ali telesnih tekočinah (OIE, 2014).

2.7.2.1. Bakterijska kultura

Za bakterijsko kulturo lahko odvzamemo vzorec polne krvi, urina, vzorce organov, ki jih odvzamemo pri postmortem pregledu, ali cerebrospinalno tekočino (WHO, 2003). Pomembno je, da vzorce odvzamemo pred uvedbo antibiotikov.

Kri odvzamemo v bakteriemični fazi bolezni (Musso in La Scola, 2013). Odvzamemo jo v epruveto s heparinom (WHO, 2003), idealno pa je, da jo inokuliramo naravnost v epruvete z gojiščem za leptospire (Musso in La Scola, 2013).

Urin lahko kot vzorec uporabimo zgolj takrat, ko lahko dobimo čist vzorec in ga na primerno gojišče nanesemo največ 2 uri po odvzemu. Leptospire v urinu hitro propadejo (WHO, 2003). Vzorec urina lahko odvzamemo od drugega tedna bolezni dalje (Musso in La Scola, 2013).

Pri postmortem pregledu povzorčimo čim več organov (WHO, 2003). Najverjetneje bomo leptospire našli v ledvicah (Hirsh in Zee, 1999).

Gojišča inkubiramo pri 28-30 °C (Musso in La Scola, 2013). Leptospire običajno rastejo vsaj 17 tednov (OIE, 2014), vsak teden pa jih pregledujemo z mikroskopiranjem v temnem polju (Musso in La Scola, 2013).

Izolacija patogenih leptospir je dokaz okužbe. Izolirane leptospire se lahko uporabijo tudi za identifikacijo serovarov (WHO, 2003). Slabost metode je, da je delo naporno in zamudno, potrebujemo posebne medije in ustrezno osebje (Larson in sod., 2017). Bakterijske metode so tudi slabo občutljive ¹(Woodward, 1997).

Metoda je podrobo opisana v poglavju 2.8.

2.7.2.2. Mikroskopiranje v temnem polju

Za vzorec lahko uporabimo urin (Markey in sod., 2013), kri (Musso in La Scola, 2013), vzorce, odvzete postmortem (Markey in sod., 2013), ali cerebrospinalno tekočino (Musso in La Scola, 2013). Če uporabimo urin, vzamemo srednji curek (Markey in sod., 2013). Pri vzorcih, odvzetih pri postmortem pregledu, bomo leptospire najverjetneje našli v vzorcu

¹ Uspešnost bakterijske kulture je nizka, približno 30 %, in sicer problem predstavlja to, da veterinarji začnejo obolele živali že takoj zdraviti z antibiotiki, v laboratorij pogosto prispe star material, ki ni primeren za obdelavo, poleg tega pa se leptospire v organih ne nahajajo diseminirano, zato ni nujno, da se ob nasajjanju materiala odvzame primeren vzorec, saj lahko leptospire v tkivu hitro zgrešimo (Lindtner Knific, 2019, ustni vir).

The success of the bacterial culture is low, about 30%, the problem being that veterinarians begin to treat diseased animals with antibiotics immediately, in the laboratory often comes an old material that is not suitable for treatment, and in addition, leptospires in the organs are not disseminated, so it is not necessary that a suitable sample be taken from the material, as leptospires in the tissue can be quickly erred (Lindtner Knific, 2019, oral source).

ledvic (Hirsh in Zee, 1999). Uporabimo sterilno odvzet vzorec ledvic, ki ga zmešamo z destilirano vodo (Markey in sod., 2013).

Vzorce pregledamo pod mikroskopom v temnem polju (Markey in sod., 2013).

Prednosti metode so, da je poceni, uporabna je za opazovanje leptospir v kulturi, še posebej, če so prisotne v velikem številu. Metoda je uporabna tudi za opazovanje aglutinacije pri testu MAT (Mousavi in sod., 2017).

Tehnika kljub temu ni najboljša, saj ima metoda nizko senzitivnost (Mousavi in sod., 2017). V vzorcu mora biti prisotnih vsaj 10^4 organizmov/mL, da lahko bakterije sploh vidimo v vidnem polju (Markey in sod., 2013). Metoda je tehnično zahtevna. Artefakte, kot je npr. fibrin, lahko hitro zamenjamo za leptospire. Test je uporaben le za tiste, ki imajo izkušnje s tovrstnim opazovanjem leptospir (WHO, 2003).

2.7.2.3. Inokulacija poskusnih živali

Vzorec običajno predstavlja kri (WHO, 2003), urin (Bedernjak, 1993) ali drug material (WHO, 2003).

Kot poskusne živali se uporabljam budre, gerbili, kunci, psi, bele laboratorijske miši, podgane, činčile (Lindtner, 1994), najpogosteje pa zlati hrčki (WHO, 2003), ki veljajo za najobčutljivejše živali za okužbo z različnimi serovari leptospire. Najbolj uporabne so mlade živali, saj so bolj dovezne za okužbo kot odrasli osebki (Lindtner, 1994). Postopek poteka tako, da poskusni živali intraperitonealno vbrizgamo kri ali drug material (WHO, 2003). Živali dnevno merimo telesno temperaturo, da ugotovimo, kdaj pride do bakteriemične faze bolezni (Lindtner, 1994). Nato vzorce tekocine iz trebušne votline zbiramo v rednih časovnih presledkih. Odvzeto tekocino pogledamo z mikroskopiranjem v temnem polju. Pozorni smo na pojav kliničnih znakov (WHO, 2003). V primeru pogina živali lahko direktno nasajamo organe na ustrezni medij (Lindtner, 1994).

Pri inokulaciji gre za biološki poskus, ki zahteva nekaj tednov, da vidimo rezultate (Bedernjak, 1993). Poskusi na živalih se lahko izvajajo le pod pogojem, da ni druge možnosti in je za živali primerno poskrbljeno v skladu s pravnimi, strokovnimi in etičnimi smernicami. Biološki poskus mora biti v skladu z načeli 3R: v kolikor je mogoče, je potrebna zamenjava

ali alternativa poskusu na živalih (ang. replacement), število živali, ki so v poskus vključene, mora biti najmanjše možno (ang. reduction), trpljenje živali pa mora biti zmanjšano na najmanjšo možno mero (ang. refinement) (Perše in Perše, 2016). Metoda se zato v zadnjem času redkeje uporablja, saj s kultiviranjem in vitro dobimo primerljive rezultate ter se tako izognemo trpljenju živali (WHO, 2003).

2.7.2.4. Verižna reakcija s polimerazo (PCR; angl. polymerase chain reaction)

Vzorce predstavljajo telesne tekočine, vključno s krvjo in urinom. Zaradi visoke koncentracije leptospir v urinu, se kot vzorec najbolj priporoča prav urin (Harmann in sod., 2013). Uporablja se lahko tudi DNK izvlečki iz svežega ali fiksiranega tkiva, za katerega obstaja sum okužbe (Birtles, 2012). Uporabimo lahko le vzorce živali, ki še niso bile zdravljene (Harmann in sod., 2013).

Metoda PCR temelji na podvojevanju specifičnih segmentov DNK do zaznavne ravni (WHO, 2003). Verižna reakcija s polimerazo v realnem času je hitrejša od običajnega PCR in je manj občutljiva na kontaminacijo (OIE, 2014). Prisotnost leptospire se potrdi z detekcijo in identifikacijo specifičnih segmentov leptospirozne DNK (WHO, 2003).

Metoda se vse pogosteje uporablja zaradi občutljivosti in možnosti zgodnje diagnoze (OIE, 2014). Prednosti so, da lahko hitro potrdi diagnozo že v zgodnji fazi bolezni, še preden so titri protiteles zaznavne višine (WHO, 2003). Metoda nadomešča serološke metode v endemičnih območjih zaradi svoje občutljivosti in zmožnosti zgodnje diagnoze (Mousavi in sod., 2017). PCR ne identificira serovara (OIE, 2014). Slabosti metode so tudi posebna oprema ter izurjeno osebje (WHO, 2003). Veliko PCR primerjev je bilo zasnovanih in ocenjenih za uporabo v humani medicini in ne za živalske vzorce (OIE, 2014). Metoda lahko da lažno pozitivne rezultate, če pride do kontaminacije delovnega območja s prisotnostjo majhnih količin tujih DNK. Rezultati so lahko tudi lažno negativni, ker so v materialih, ki se pregledujejo, prisotni inhibitorji (WHO, 2003).

2.7.3. Indirektne diagnostične metode

Metode se uporabljam za detekcijo protiteles proti leptospiram v živalskih tkivih ali telesnih tekočinah (OIE, 2014).

2.7.3.1. Serološka diagnostika

Serologija je najpogosteje uporabljeni diagnostični metoda za okužbe z leptospiro (WHO, 2003). Protitelesa se pojavijo v nekaj dneh po začetku bolezni in vztrajajo tedne ali mesece, v nekaterih primerih tudi leta. Problem je, ker lahko titri protiteles padejo do nezaznavnih ravni, medtem ko živali ostanejo kronično okužene. Metoda, ki se najpogosteje uporablja, je MAT (OIE, 2014).

Za serološko diagnostiko se uporablja vzorec serum (WHO, 2003). Zaželeno je, da pacientu odvzamemo parne vzorce: po prvem odvzemu krvi počakamo še 2 tedna in nato ponovno odvzamemo kri (Hirsh in Zee, 1999) Testiranje parnega vzorca serum je nujno, saj porast titra protiteles kaže na akutno okužbo. Negativen rezultat v zgodnji fazи bolezni ne izključuje leptospiroze (WHO, 2003).

2.7.3.1.1. Metoda MAT

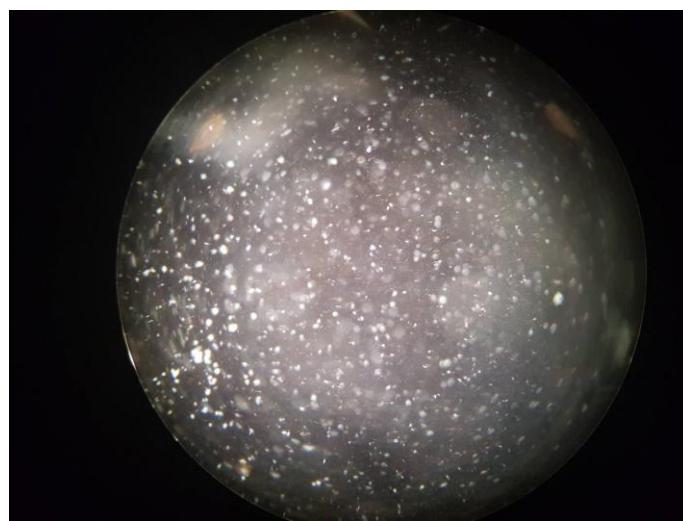
Mikroaglutinacijski test je referenčna metoda za serološko diagnostiko leptospiroze (Markey in sod., 2013). Antigeni, ki se uporabljajo v testu, morajo vključevati reprezentativne serološke skupine, za katere se ve, da so prisotne v določeni regiji, ter tiste, za katere se ve, da se lahko pojavljajo pri gostiteljski vrsti, ki jo testiramo (OIE, 2014).

Test je sestavljen iz inkubacije serijskih razredčitev preiskovanega serum z različnimi sevi leptospir. Serum se šteje kot pozitiven, če je pri določeni razredčini in za testiran antigen v vidnem polju mikroskopa vsaj 50 % leptospir aglutiniranih ali liziranih v primerjavi s kontrolnim antigenom brez serum (Picardeau, 2013). Kot antigen se v testu najpogosteje uporabljajo žive leptospire (Markey in sod., 2013).



Slika 1: Negativni MAT rezultat pod mikroskopiranjem v temnem polju

Figure 1: Negative result of MAT under darkfield microscopy



Slika 2: Pozitiven MAT rezultat pod mikroskopiranjem v temnem polju

Figure 2: Positive result of MAT under darkfield microscopy

Občutljivost in specifičnost testa sta zelo visoki (Adler in De la Pena Moctezuma, 2010). Metoda je zelo uporabna za testiranje individualnih živali na akutno okužbo, manj pa na kronično, saj lahko titri pri kronični okužbi padejo do nezaznavnih ravni (OIE, 2014). Slabost testa je, da potrebujemo žive kulture različnih serovarov leptospir, ki prevladujejo na določenem geografskem območju (Adler in De la Pena Moctezuma, 2010). Metoda velja za drago in težko izvedljivo. Za izvedbo in interpretacijo rezultatov zahteva veliko strokovnega znanja in izkušenj (Picardeau, 2013). Zavedati se moramo tudi tega, da lahko imajo živali, ki so bile cepljene proti leptospirozi, protitelesa proti serovarom, ki so prisotni v uporabljenem cepivu. Zato je še posebej pomembno, da pri interpretaciji rezultatov upoštevamo zgodovino cepljenja testiranih živali (OIE, 2014).

2.7.3.1.2. Druge serološke metode

Ostale serološke metode, ki se lahko uporabljajo predvsem pri drugih živalskih vrstah in človeku, so encimska imunoadsorpcijska preiskava (ELISA) (WHO, 2003), makro aglutinacija (Bedernjak, 1995), reakcija fiksacije komplementa (Picardeau, 2013), imunokemijske metode (OIE, 2014), hemaglutinacija, test lateks aglutinacije (Picardeau, 2013), t.i. immuno-dipstick in immunocomb (Woodward, 1997).

2.8. DIREKTEN DOKAZ LEPTOSPIRE

Izolacija leptospir velja za eno izmed najbolj specifičnih metod za dokaz prisotnosti teh bakterij. Pogoji za to so, da v vzorcih niso prisotni ostanki antibiotikov, da avtoliza tkiva ni napredovala, da se tkiva po odvzemu hitro obdelajo za kulturo in da je v primeru, ko je vzorec urin, pH le-tega ustrezen (OIE, 2014). Izolacija patogenih leptospir je dokaz okužbe. Izolirane leptospire se lahko uporabijo tudi za identifikacijo serovarov (WHO, 2003).

2.8.1. Vzorci

Kot vzorec lahko uporabimo vzorce notranjih organov, kot so jetra, pljuča, možgani, ledvice, ter telesnih tekočin, kot so kri, mleko, cerebrospinalna, abdominalna ali torakalna tekočina

(OIE, 2014). Pomembno je, da vzorce odvzamemo pred uvedbo antibiotikov (Musso in La Scola, 2013).

Polno kri odvzamemo v epruveto s heparinom, ki prepreči nastajanje strdkov (WHO, 2003). Idealno bi sicer bilo, da bi kri neposredno inokulirali/nacepili v epruvete, ki vsebujejo gojišče za leptospire. Kri naj bo odvzeta v zgodnji fazi bolezni, v prvih 10 dneh (Musso in La Scola, 2013).

Urin uporabimo za vzorec zgolj takrat, ko lahko dobimo čist vzorec in ga lahko na primerno gojišče nanesemo največ 2 uri po odvzemu. Zavedati se moramo, da leptospire v urinu hitro propadejo (WHO, 2003). Vzorec urina odvzamemo od drugega tedna bolezni dalje (Musso in La Scola, 2013).

Pri postmortem pregledu povzorčimo čim več organov. Vzorce odvzamemo aseptično in v najkrajšem možnem času po peginu (WHO, 2003). Najverjetneje je, da bomo leptospire našli v ledvicah (Hirsh in Zee, 1999).

Cerebrospinalno tekočino kot vzorec za bakterijsko kulturo uporabljam v humani medicini (WHO, 2003). Vzorec mora biti odvzet v prvih 10 dneh bolezni (Musso in La Scola, 2013).

2.8.2. Gojišče

Kulturo gojimo v tekočem ali poltrdem mediju (0,1-0,2 % agar) (OIE, 2014). Najpogosteje se kot medija uporablja tekoči gojišči Ellinghausen McCullough modificirano gojišče Johnson in Harris (EMJH) (Musso in La Scola, 2013) in Korthof (Lindtner, 1994). Kontaminacijo lahko nadzorujemo z dodajanjem različnih selektivnih sredstev, kot so npr. 5-fluorouracil, nalidiksična kislina, fosfomicin in zmes rifamicina, polimiksina, neomicina, bacitracina in aktidiona (OIE, 2014).

Problem je, ker lahko uporaba selektivnih sredstev zmanjša možnosti za izolacijo, če je leptospir v vzorcih malo. Poleg tega nekateri sevi leptospir ne bodo rasli v selektivnih medijih, ki vsebujejo več antibiotikov. Dodajanje 0,4-5 % kunčjega seruma v poltrdo gojišče povečuje možnosti za izolacijo serovarov, ki so za rast zahtevnejši (OIE, 2014)

2.8.3. Rast bakterij

Kulture inkubiramo pri 28-30 °C vsaj 17 tednov, še raje pa 26 tednov. Čas, ki je potreben za inkubacijo, je odvisen od posameznega serovara in števila organizmov, ki so pristotni v vzorcu(OIE, 2014).

2.8.4. Mikroskopska potrditev

Kulture enkrat tedensko pregledujemo z mikroskopiranjem v temnem polju (Musso in La Scola, 2013). Pomembno je, da za mikroskopiranje uporabimo kvaliteten mikroskop (OIE, 2014). Senzitivnost mikroskopiranja pod temnim poljem je približno 10^4 leptospir/mL. Leptospire so v vidnem polju mikroskopa vidne kot tanki, spiralno zaviti in hitro premikajoči se organizmi (Musso in La Scola, 2013).

Slabost postopka je, da gre za naporno, zamudno in tehnično zahtevno metodo, ki je uporabna le za strokovnjake, ki imajo izkušnje z opazovanjem leptospir (WHO, 2003; Larson in sod., 2017).

2.9. ZDRAVLJENJE IN NADZOR

2.9.1. Terapija

Večina primerov humane leptosiroze lahko mine sama po sebi, kljub temu je zdravljenje običajno sestavljeno iz podporne terapije in antibiotikov (Higgins, 2004). Podporno zdravljenje je odvisno od resnosti bolezni, izraženih kliničnih znakov in morebitne disfunkcije ledvic ali jeter ter drugih dejavnikov (Hartmann in sod., 2013). Pri psih opisujejo, da je čim bolj zgodnje zdravljenje pri akutni leptosirozi pomembno, saj omogoča boljšo uspešnost terapije, poleg tega pa tako tudi zmanjšamo tveganje za zoonotsko okužbo (Lizer in sod., 2018) in zmanjšamo možnost klicenoštva, torej izločanja patogenov z urinom (Van de Maele in sod., 2008). Najpomembnejše je zdravljenje akutne odpovedi ledvic (Hartmann in sod., 2013). Terapija s tekočino je ključnega pomena. Oceniti moramo količine izločenega urina in

po potrebi uporabiti diuretike. Pomembno je, da spremljamo tudi višino krvnega tlaka, saj lahko akutno ledvično odpoved spremlja hipertenzija (Van de Maele in sod., 2008).

Leptospire so občutljive na številne antibiotike, in sicer na peniciline, fluorokinolone, tetracikline, kloramfenikol, streptomycin in eritromycin (Hirsh in Zee, 1999). Antibiotiki, ki se uporablajo za zdravljenje tako pasje, kot tudi humane leptospiroze, običajno vključujejo derivate penicilina (penicilin G, ampicilin, amoksicilin) ali doksiciklin. Doksiciklin odpravi dlje časa trajajočo persistenco in s tem dolgotrajno klicenoštvo pri okuženih živalih (Schuller in sod., 2015) Penicilin G in ampicilin sta indicirana pri hudi obliki bolezni, pri blagi pa se priporoča zdravljenje z doksiciklinom, ampicilinom in amoksicilinom (Higgins, 2004). Svetuje se, da se zdravljenje leptospiroze pri psih prične s 14-dnevno terapijo z amoksicilinom, naslednjih 14 dni pa svetujejo aplikacijo doksiciklina ter podpora zdravila za jetra in ledvica.

Psi z leptospirozo pogosto kažejo gastrointestinalne znake, kot je npr. bruhanje. Pacienti s tovrstnimi kliničnimi znaki običajno slabo tolerirajo aplikacijo doksiciklina per os, zato se pri njih za začetno terapijo priporoča uporaba derivatov penicilina, ki jih apliciramo i/v. Ko se gastrointestinalni znaki izboljšajo, terapijo nadaljujemo z doksiciklinom (Schuller in sod., 2015).

Po starejših literaturnih podatkih se za zdravljenje leptospiroze pri dihurjih najpogosteje uporablja penicilin G, ki se ga aplicira v mišičnino, 40.000 IU/kg na 24 ali 12 ur, dokler se delovanje ledvic ne izboljša. Priporoča se tudi uporaba streptomicina, v kolikor pacient nima odpovedi ledvic. Avtorji opozarjajo, da je potrebno biti pazljiv z uporabo tega zdravila pri dihurjih, saj je streptomycin v velikih odmerkih zanje toksičen. Lewington je v svoji knjigi svetoval uporabo največ 50 mg streptomicina, če belemu dihurju dajemo zdravilo v 12-urnih presledkih (Lewington, 2007). Po našem mnenju je najbolje, da ob pojavu klinične oblike leptospiroze pri belem dihurju upoštevamo trenutna priporočila zdravljenja leptospiroze pri psu.

Zdravljenje z antibiotiki je pri živalih lahko uspešno tudi pri odpravljanju kroničnih okužb (Birtles, 2012).

2.9.2. Prognoza

Pri ljudeh in živalih načeloma velja, da je prognoza odvisna od tega, kako ohranjena je ledvična funkcija (Harmann in sod., 2013) ter kako huda je oblika bolezni. V kolikor zlatenica ni prisotna, je bolezen redko smrtna (Dutta in Christopher, 2005).

2.9.3. Preventiva

Preventivni ukrepi vključujejo zmanjšanje dostopa do potencialnih virov okužbe, kot so vodni viri na prostem, in zmanjšanje izpostavljenosti prostoživečim živalim s pomočjo ograj in nadzorom glodavcev (Schuller in sod., 2015). Za mačke velja, da so protitelesa proti leptospiri pogosteje detektirana pri zunanjih živalih, pri tistih, ki živijo v mestih in pri mačkah, ki svojo hrano (male glodalce) lovijo. Zanje se svetuje, da jim preprečimo hranjenje s potencialno okuženimi glodalci (Hartmann in sod., 2013), kar lahko morda glede na podoben način življenja trdimo tudi za bele dihurje. Svetuje se zatiranje glodavcev, deratizacija (Bedernjak, 1993). Živali, ki ves čas živijo v zaprtih prostorih, imajo manjše možnosti za okužbo (Hartmann in sod., 2013). Pri stiku z okuženimi živalmi se svetujejo strogi higienski ukrepi, da ne bi prišlo do širjenja okužbe (Van de Maele in sod., 2008). Idealno je, da se okužene živali izolira (Birtles, 2012). Pri psih, ki so imeli neposreden ali posreden stik z živalmi, za katere je potrjena okužba z leptospiro, svetujejo profilaktično zdravljenje z antibiotiki (Van de Maele in sod., 2008). Redno odstranjevanje urina in vzdrževanje živali v čistih, suhih pogojih pomagata, da se možnost prenosa okužbe zmanjša (Birtles, 2012).

2.9.3.1. Cepljenje

Cepiva proti leptospirozi se za živali uporabljam že od dvajsetih let devetnajstega stoletja (Adler in De la Pena Moctezuma, 2010), vendar razvoj učinkovitega cepiva še vedno ostaja izziv. Zmožnost patogena, da lahko naseli več organskih sistemov, predstavlja veliko grožnjo gostitelju in je glavni razlog za potrebo po razvoju varnega in učinkovitega cepitva proti leptospirozi (Bashiru in Bahaman, 2018).

Cepiva proti leptospirozi za veterinarsko uporabo so suspenzije enega ali več serovarov patogenih Leptospir, ki so inaktivirane na tak način, da ohranijo imunogensko aktivnost (OIE,

2014). Običajno vsebujejo dva ali več lokalno prevladujočih serovarov (Adler in De la Pena Moctezuma, 2010). Imunost je specifična za serološke skupine. Med različnimi serološkimi skupinami ni navzkrižne zaščite (Hartmann in sod., 2013).

Cepiva se uporablajo tako za zaščito živali, kakor tudi ljudi, ki so v stiku z njimi. So ključnega pomena pri programih nadzora in izkoreninjenja bolezni. Cepiva ne bodo odstranila okužbe pri že okuženem gostitelju, zato jih je potrebno aplicirati še pred izpostavljenostjo patogenu (OIE, 2014).

Komercialna cepiva so na voljo po celem svetu za govedo, prašiče in pse (OIE, 2014). Za pse v Evropi se priporoča, da se jih namesto z bivalentnimi cepivi cepi s štirivalentnimi, ki zagotavljajo širši spekter zaščite (Schuller in sod., 2015). Programi cepljenja morajo biti prilagojeni ciljni populaciji in učinkovitosti cepiva (OIE, 2014).

Zaščita je začasna (Hirsh in Zee, 1999). Izkazalo se je, da cepiva nudijo zaščito vsaj dvanajst mesecev (Klaasen in sod., 2003). V državah, kjer hladne zimske temperature inaktivirajo leptospire v okolju, se priporoča, da se spomladi opravi letno revakcinacijo, da se tako zagotovi najboljša zaščita proti leptospiri v mesecih z največjo pojavnostjo okužbe (Schuller in sod., 2015).

Cepljenje je lahko učinkovito proti akutni obliki leptospiroze (Birtles, 2012) in običajno prepreči bolezen (Hirsh in Zee, 1999), ne prepreči pa možnosti okužbe s serovari, ki jih vakcina ne zajema (Bharti in sod., 2003), ter kroničnega prenosa leptospir (Birtles, 2012).

Za bele dihurje se cepljenje zoper leptospirozo predvsem zaradi domneve, da niso doveztni za tovrstne okužbe ne svetuje in izvaja (Chitty in Delaney Johnson, 2017). Po izkušnjah avtorjev pa kljub temu obstaja možnost, da so v Sloveniji nekateri beli dihurji izpostavljeni leptospiram, ki se nahajajo v pasjih cepivih. V Sloveniji in tudi drugod po Evropi specifičnega cepiva zoper pasjo kugo za cepljenje belih dihurjev ni, zato se pri njih rutinsko uporablja cepiva, ki so registrirana za pse. V takih cepivih je v tekoči fazи poleg ostalih antigenov pogosto prisotna tudi leptospira. Serovara leptospire, ki se najpogosteje nahajata v cepivih pri nas, sta *Canicola* in *Icterohaemorrhagiae*, prisotna pa sta lahko tudi serovara *Grippotyphosa* in Bratislava (Uradni list RS, 2014a; Uradni list RS, 2014b; Uradni list RS, 2014c; Uradni list RS, 2014d). Če se tekoče faze predhodno ne menja z vodo za injiciranje ali s kakšnim drugim

priporočenim topilom, se bele dihurje cepi tudi zoper leptosirozo. Podatkov o tem koliko belih dihurjev je pri nas izpostavljenim cepnim antigenom leptospire in ali razvijejo imunski odgovor na cepljenje, žal nimamo. Svetuje se, da se ob cepljenju belih dihurjev cepivo/del cepiva, ki vsebuje antigene leptospire, ne uporabi.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Serumske vzorce smo pridobili med belimi dihirji, ki so bili med aprilom 2011 in marcem 2019 pacienti na Kliniki za male sesalce, ptice in plazilce, Inštituta za perutnino, ptice, male sesalce in plazilce, Veterinarske fakultete v Ljubljani. Del seruma, ki je ostal neporabljen po rutinskih hematoloških in biokemijskih preiskavah krvi z namenom diagnosticiranja različnih obolenj, smo z dovoljenjem lastnikov uporabili v namene serološkega testiranja na leptospirozo.

3.1.1. Odvzem vzorcev krvi

Belim dihirjem smo kri odvzeli v splošni anesteziji. Za indukcijo in vzdrževanje anestezije smo uporabili hlapno anestezijo z izofluoranom (Foran®), in sicer v 4 % mešanici s 100 % kisikom za indukcijo ter v 2,5 % mešanici s 100 % kisikom za vzdrževanje. Z gelom Lacryvisc® smo jim med anestezijo zaščitili površino oči.

Dihirji so pri odvzemu krvi ležali na hrbtni, ves čas smo nadzorovali njihove življenske funkcije. Kri smo jemali iz leve ali desne *vene cave cranialis*. Mesto vboda smo pred tem primerno razkužili. Za odvzem krvi smo uporabili sterilne 25G igle (25G KRUUSE Disposable Injection Needles) in 1 ml brizge (1 mL KRUUSE Disposable Syringes®). Kri smo nato prelili v serumsko epruveto ter vzorec označili s podatki o pacientu ter lastniku živali.

Vzorec smo pustili na sobni temperaturi, da se je izločil serum, nato pa smo ga 10 minut centrifugirali na 3000 obratov.

Tako pripravljene serume smo do preiskave shranili v zamrzovalniku na -20 °C.

3.1.2. Anketiranje lastnikov

Lastnike dihurjev smo prosili, da izpolnijo kratko anketo.

Starost:		
Spol: M/Ž		
Ali je bil cepljen proti kužnim boleznim?	DA	NE
Ali sobiva z ostalimi belimi dihurji?	DA	NE
Ali sobiva s psom?	DA	NE
Ali sobiva z mačko?	DA	NE
Ali sobiva z malimi glodavci (miši, podgane, hrčki, budre ...)?	DA	NE
Ali je v stiku s tujimi belimi dihurji?	DA	NE
Ali je v stiku s tujimi psi?	DA	NE
Ali je v stiku s tujimi mačkami?	DA	NE
Ali je v stiku z zunanjimi glodavci (podgane, miši, veverice)?	DA	NE

Ali se prehranjuje z briketirano hrano?	DA	NE
Ali se prehranjuje s surovo hrano? Če da, s kakšno?	DA	NE
Ali se prehranjuje z malimi glodavci?	DA	NE
Ali biva zgolj v stanovanju/hisi/notranjih prostorih?	DA	NE
Ali ima dostop do zunanjih površin (terasa, dvorišče, vrt)?	DA	NE
Ali ima dostop do vodnih površin (ribnik, potok, jezero)?	DA	NE

Vse podatke smo nato zbrali v tabelo.

3.2. METODE

3.2.1. Delo v laboratoriju za leptospirozo

Delo smo izvajali v Laboratoriju za leptospirozo na Inštitutu za perutnino, ptice, male sesalce in plazilce Veterinarske fakultete v Ljubljani. Delo smo izvajali po protokolu za laboratorij varnostne stopnje II. Pri izvajanju postopkov smo bili oblečeni v zaščitni plašč (belo haljo), uporabljali smo zaščitne rokavice in jih po potrebi večkrat zamenjali. Delali smo s sterilnim materialom (epruvete, steklovina). Bakteriološke zanke (eze) smo tekom dela sterilizirali nad plamenom. Delovne površine smo pred in po delu očistili in razkužili. Postopke pipetiranja smo izvajali s kalibriranimi pipetami. Pri pripravi vzorcev in pri pipetiranju smo upoštevali osnovne postopke za preprečevanje kontaminacija med vzorci.

3.2.1.1. Priprava vzorcev

Serumske vzorce, ki smo jih do obdelave hrаниli v zamrzovalniku, smo odmrznili. Tako pripravljeni vzorci so lahko ostali shranjeni v hladilniku na 2-8 °C do 3 dni.

3.2.1.2. Standardni materiali

Standardne materiale predstavljajo osnovne in delovne standardne raztopine, antigen in negativna kontrola.

Antigen predstavljajo kulture patogenih serovarov, stare 4-8 dni, z gostoto najmanj 100 leptospir v vidnem polju mikroskopa pri 160x povečavi oz. 60-70 % prepustnost svetlobe pri uporabi spektrofotometra. Osnovne kulture presajamo enkrat na mesec, delovne pa enkrat na teden. Za rutinsko testiranje se uporablja dobro izrasle kulture 12 serovarov, ki so najbolj značilni za naše geografsko področje, in sicer serovar Grippotyphosa – sev Moskva V, serovar Sejroe – sev Mallerdorf 84, serovar Icterohaemorrhagiae – sev Icterohaemorrhagiae RGA, serovar Saxkoebing – sev MUS 24, serovar Australis – sev Ballico, serovar Canicola – sev Hond Utrecht IV, serovar Pomona – sev Pomona, serovar Tarassovi – sev Mitis Johnson, serovar Autumnalis – sev Akyami A, serovar Bataviae – sev Van Tienen, serovar Hardjo – sev Hardjo Bovis in serovar Bratislava – sev Jež Bratislava.

Za negativno kontrolo (kontrolni serumi) smo uporabili nacionalni negativni serum (NNS) ali referenčni kontrolni negativni serum, ki je negativni vzorec seruma ene izmed med-laboratorijskih kontrol.

3.2.1.3. Protokol: SEROLOŠKA DIAGNOSTIKA

Za serološko diagnostiko leptospiroze smo uporabili metodo MAT, ki velja za zlati standard.

Mikroaglutinacijski test je akreditirana metoda, sestavljena iz preliminarnega (makro metoda) in potrditvenega testa (mikro metoda). Rezultate smo odčitali z mikroskopiranjem v temnem polju mikroskopa pri 160x povečavi.

3.2.1.3.1. Preliminarni testi

3.2.1.3.1.1. Makro metoda

Makro metoda je del preliminarnega testa, s katerim smo ugotavljali, prisotnost specifičnih protiteles v preiskovanem serumu.

Preiskovani serum smo razredčili s PBS v razmerju 1:25 (960 µL pufra + 40 µL seruma). Pripravili smo tudi negativni serum.

V postopku smo uporabili 12 epruvet. Število epruvet je enako številu uporabljenih serovarov, saj v vsako epruveto dodamo le en serovar. V epruvete smo dali 0,03 mL razredčenega preiskovanega seruma in 0,03 mL vsake kulture. Končna razredčitev, ki smo jo dosegli, je bila 1:50.

Epruvete smo pretresli in jih inkubirali 2 uri na 37 °C.

3.2.1.3.1.2. Interpretacija rezultatov preliminarnega testa

Preparate za mikroskopiranje smo pripravili tako, da smo z zanko vzeli po eno kapljico (3-5 µL) iz vsake epruvete in jo nanesli na predmetno stekelce. Vzorce smo preiskali v temnem polju mikroskopa, pri 160x povečavi.

Pozitivno reakcijo smo ocenili kot aglutinacijo ali/in liza najmanj 50 % v vidnem polju prisotnih živih leptospir, negativno pa kot odsotnost sprememb ali nižji odstotek aglutiniranih leptospir.

Serume, ki so v preliminarnem testiranju reagirali pozitivno, smo nato titrirali, da smo ugotovili višino specifičnih protiteles.

3.2.1.3.2. Potrditveni test – titracija

3.2.1.3.2.1. Mikro metoda

V postopku mikro metode preiskovani serum razredčimo na način, opisan v poglavju 3.2.1.3.1.1.

Kulturo smo razredčili v razmerju 1:1. Enemu mL pufra smo dodali 1 mL dobro izrasle kulture. Test smo izvajali na mikrotitrirni plošči.

Postopek:

- V prvo luknjico mikro plošče smo vnesli 25 µL pripravljene kulture leptospir za kontrolo in 25 µL razredčenega NNS.
- V tretjo do deveto luknjico smo vnesli 25 µL pufra.
- V drugo in tretjo luknjico smo dodali 25 µL predhodno razredčenega seruma (1:25).
- Iz tretje luknjice smo prenesli 25 µL razredčenega seruma v četrto in v vsako naslednjo luknjico. Iz devete luknjice smo neškodljivo zavrgli 25 µL razredčenega seruma.
- Vzorcem seruma od druge do devete luknjice smo nato dodali še po 25 µL pripravljene kulture.

Št. luknjice na mikrotiterski plošči	Končna razredčitev seruma
1	Kontrola
2	1:50
3	1:100
4	1:200
5	1:400
6	1:800
7	1:1600
8	1:3200
9	1:6400

Tako pripravljeno mikrotitrirno ploščo smo inkubirali 45-60 minut na 37 °C.

3.2.1.3.2.2. Odčitanje in interpretacija rezultatov potrditvenega testa

Preparate za mikroskopiranje smo pripravili tako, da smo s pipeto vzeli 3 µL iz vsake luknjice na mikroplošči in jo nanesli na predmetno stekelce. Vzorec smo preiskali v temnem polju mikroskopa, pri 160x povečavi.

Pozitivni rezultat smo ocenili kot aglutinacijo ali/in lizo najmanj 50 % v vidnem polju prisotnih živih leptospir, negativni rezultat pa kot odsotnost sprememb ali kot nižji delež aglutiniranih leptospir.

3.2.2. Statistična obdelava podatkov

Epidemiološke podatke, ki smo jih dobili s pomočjo anket, smo zbrali v tabeli in jih statistično obdelali.

Statistično analizo smo opravili v računalniškem programu R Commander i386, verzija 3.5.1. Podatke zbrane s telefonskim in osebnim anketiranjem lastnikov smo analizirali v povezavi z iskano spremenljivko, in sicer prisotnost protiteles v serumu dihurjev. Statistično značilno povezavo med preučevanimi spremenljivkami smo ugotavljali pri stopnji značilnosti $p = 0.05$. V primeru ugotovljenih odstopanj od ničelne hipoteze smo parametre nadalje analizirali z ustrezнимi parametričnimi ali neparametričnimi testi.

4. REZULTATI

4.1. SERUMSKI VZORCI

Skupno smo preiskali 154 serumov, od tega je 60 serumov pripadalo samicam (39,0 %), 94 serumov pa samcev (61,0 %).

Med temi vzorci so se v daljšem časovnem razmiku štirikrat ponovili isti pacienti. Prvi izmed teh, rojen leta 2011, je bil serološko pozitiven, ko je bil testiran leta 2012 (pod vpisno številko 64s), leta 2018 (vzorec 33) pa je bil negativen. Drugi, rojen leta 2014, je bil prvič pregledan leta 2018 (vzorec 59) in je reagiral negativno, v letu 2019 (vzorec 76) pa je bil serološko pozitiven. Tretji, rojen leta 2012, je bil ob pregledu leta 2014 (vzorec 19s) serološko pozitiven, ob naslednjem testiranju leta 2018 (vzorec 48) pa nismo več ugotovili prisotnosti protiteles. Četrти je bil v letu 2018 testiran dvakrat (vzorca 34 in 46), obakrat je bil serološko negativen.

Med vsemi 154 vzorci smo ugotovili 16,2 % (25/154) serološko pozitivnih živali, in sicer 10 samic in 15 samcev. Ostali vzorci so bili negativni (50 samic in 79 samcev).

Serume smo pregledali na prisotnost protiteles za serovare, ki se v Sloveniji najpogosteje pojavljajo; ti so Icterohaemorrhagiae, Pomona, Grippothyposa, Tarassovi, Sejroe, Saxkoebing, Bataviae, Australis, Canicola, Hardjo, Autummalis in Bratislava.

4.1.1. PREGLED POZITIVNIH VZORCEV GLEDE NA SEROVAR

Tabela 1: Pregled pozitivnih vzorcev glede na serovar

Table 1: Examination of positive samples according to serovar

št. vzorca	spol	starost ob odvzemenu vzorca	leto odvzema vzorca	Icterohaemo rrhagiae	Pomona	Grippothypo sa	Tarassovi	Sejroe	Saxkoebing	Bataviae	Australis	Canicola	Hardjo	Autummalis	Bratislava
48s	ž	<1	2011	50	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
53s	ž	2	2012	50	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
57s	m	2	2012	50	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
61s	m	3	2012	N	N	N	N	N	N	N	N	50	N	N	N
64s	m	1	2012	N	N	N	N	N	N	50	N	N	N	N	N
70s	ž	3	2012	100	N	N	N	N	N	100	N	N	N	N	N
74s	ž	2	2012	50	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
54s	m	5	2013	N	N	N	N	N	N	N	200	N	N	N	N
83s	m	7	2013	N	N	N	N	N	N	100	N	N	N	N	N
1s	m	<1	2014	N	N	N	N	N	N	N	50	N	N	N	N
5s	ž	6	2014	200	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
10s	m	7	2014	50	N	N	N	N	N	N	N	50	N	N	N
12s	m	5	2014	N	N	N	N	N	N	N	50	N	N	N	N
14s	ž	5	2014	50	N	N	N	N	N	N	N	50	N	N	N
16s	ž	5	2014	N	N	N	N	N	N	100	N	N	N	N	N
17s	m	3	2014	50	N	N	N	N	100	N	50	N	50	N	N
19s	m	2	2014	N	N	N	N	N	N	N	N	50	N	N	N
23s	m	7	2014	N	200	N	N	50	50	N	100	N	N	N	N

32s	m	3	2014	200	N	N	N	N	N	N	N	100	N	N	N
3s	m	5	2015	N	N	N	N	N	50	N	N	N	N	N	N
30s	m	1	2015	N	100	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
40s	ž	5	2015	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	50
46s	ž	4	2015	50	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
87	ž	5	2019	N	N	N	N	N	N	N	100	N	N	N	N
76	m	5	2019	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	50

Legenda: N – negativno, 50 – titer 1:50, 100 – titer 1:100, 200 – titer 1:200

Legend: N - negative, 50 – titer 1:50, 100 – titer 1: 100, 200 – titer 1: 200

4.1.2. POGOSTOST PROTITELES ZA POSAMEZNE SEROVARE

Tabela 2: Pogostost protiteles za posamezne serovare

Table 2: Frequency of antibodies for individual serovars

SEROVAR	ŠT. POZITIVNIH VZORCEV	DELEŽ POZITIVNIH VZORCEV	TITER 1:50	TITER 1:100	TITER 1:200
Icterohaemorrhagiae	11	31,4 %	8	1	2
Pomona	2	5,7 %	0	1	1
Grippotyphosa	0	0,0 %	/	/	/
Tarassovi	0	0,0 %	/	/	/
Sejroe	1	2,9 %	1	0	0
Saxkoebing	3	8,6 %	2	1	0
Bataviae	4	11,4 %	1	3	0
Australis	6	17,1 %	3	2	1
Canicola	5	14,3 %	4	1	0
Hardjo	1	2,9 %	1	0	0
Autumnalis	0	0,0 %	/	/	/
Bratislava	2	5,7 %	2	0	0

Iz tabele je razvidno, da se najpogosteje pojavljajo protiteesa proti serovaru Icterohaemorrhagiae (11/35, 31,4 %), sledita mu serovar Australis (6/35, 17,1 %) in Canicola (5/35, 14,3 %). Protiteesa proti serovarom Grippotyphosa, Tarassovi in Autumnalis znotraj pregledane populacije belih dihurjev niso bila ugotovljena.

Kombinacije serovarov, ki so se skupaj pojavile pri 25 pozitivnih vzorcih dihurjev, so bile naslednje: Icterohaemorrhagiae in Bataviae pri enem vzorcu (1/25), Icterohaemorrhagiae in Canicola pri dveh vzorcih (2/25), Icterohaemorrhagiae, Sejroe, Australis in Hardjo pri enem vzorcu (1/25), Pomona, Sejroe in Saxkoebinig pri enem vzorcu (1/25) ter Icterohaemorrhagiae in Australis prav tako pri enem vzorcu (1/25). Pri ostalih pozitivnih vzorcih smo ugotovili prisotnost protiteles le proti enemu serovaru.

4.1.3. PREGLED ŠTEVILA VZORCEV PO LETIH

Tabela 3: Pregled števila vzorcev v obdobju od 2011 do 2019

Table 3: Overview of the number of samples in the period from 2011 to 2019

Leto odvzema vzorcev	Pozitivni vzorci	Negativni vzorci	Skupno št. vzorcev
2011	1	2	3
2012	6	22	28
2013	2	0	2
2014	10	19	29
2015	4	7	11
2016	0	0	0
2017	0	0	0
2018	0	68	68
2019	2	11	13

4.2. ANKETE

Epidemiološke podatke smo pridobili s pomočjo predhodno pripravljene ankete.

Za statistično obdelavo smo izbrali podatke 23 anket iz retrospektivnega dela študije ter 66 anket iz prospektivnega dela študije. Skupno smo tako statistično pregledali 89 anket (57,8 %). Med 23 anketami iz retrospektivnega dela je bilo 6 anket pomanjkljivo izpolnjenih, vendar smo jih zaradi pozitivnega serološkega rezultata pripadajočih vzorcev vseeno vključili v statistično obdelavo.

Iz retrospektivnega in prospektivnega dela študije je bilo 65 anket (42,2 %) manjkajočih ali pomanjkljivo izpolnjenih.

V retrospektivnem delu študije je bilo skupno 73 vzorcev. Za negativne vzorce, odvzete med 2011 in 2017, nimamo prilagajočih anket. Teh vzorcev je bilo 50/154 (32,5 %). V retrospektivnem delu je bilo 23 pozitivnih vzorcev. Z lastniki serološko pozitivnih dihurjev v obdobju med 2011 in 2017 smo naknadno stopili v stik ter pridobili potrebne podatke.

V prospektivnem delu študije je bilo skupno 81 vzorcev, od tega 2 serološko pozitivna, ostali pa so bili negativni. Nekateri lastniki so anketo izpolnili v ambulanti ob pregledu dihurja, z nekaterimi pa smo naknadno opravili razgovor po telefonu.

4.3. PREGLED POZITIVNIH VZORCEV NA PODLAGI ANKET

Tabela 4: Pregled opisnih podatkov iz anket za pozitivne vzorce

Table 4: Overview of descriptive data from positive sample surveys

Št. vzorca	Spol	Starost ob odvzemuh vzorca	Leto odvzema vzorca	Cepljene kužne bolezni	Sobivanje dihurji	Sobivanje pes	Sobivanje mačka	Stik malih glodavci	Stik tuji dihurji	Stik tuji psi	Stik tuje mačke	Stik zunanjih glodavci	Briketirana hrana	Surova hrana	Kakšna surova hrana	Pprehrana malih glodavci	Brez dostopa do zunanjih površin	Dostop do zunanjih površin	Dostop do vodnih površin
48s	ž	<1	2011	ne	da	ne	ne	/	ne vem	ne vem	ne vem	ne vem	da	Da	jajca	ne	ne vem	ne vem	ne vem
53s	ž	2	2012	da	da	ne	ne	ne	da	da	ne	ne	da	Da	piščanec, puran (jetra, srčki)	ne	ne	ne	ne
57s	m	2	2012	da	ne	ne	ne	ne	ne	da	ne	ne	da	Da	jajca	ne	da	da	ne
61s	m	3	2012	da	da	da	da	ne	ne	ne	ne	ne	da	Da	jajca	ne	da	ne	ne
64s	m	1	2012																
70s	ž	3	2012																
74s	ž	2	2012	da	da	ne	da	ne	ne	ne	ne	ne	da	Ne	/	ne	ne	da	ne
54s	m	5	2013	da	da	da	da	ne	da	da	ne	ne	da	Ne	/	ne	ne	da	ne
83s	m	7	2013	da	da	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	da	Ne	/	ne	da	ne	ne
1s	m	<1	2014	ne	da	da	da	ne vem	da	ne	ne	ne vem	da	Da	perutnina, govedina, svinjina	ne	ne	da	ne
5s	ž	6	2014	da	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne	da	Ne	/	ne	ne	da	ne
10s	m	7	2014	da	da	da	ne	ne	da	ne	ne	ne	da	Ne	/	ne	ne	da	da
12s	m	5	2014																
14s	ž	5	2014	da	da	da	da	ne	da	ne	ne	ne	da	Ne	/	ne	da	ne	ne
16s	ž	5	2014	da	ne	ne		ne	ne	ne	ne	ne	da	Ne	/	ne	ne	da	ne
17s	m	3	2014	da	da	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	da	ne	/	ne	da	ne	ne

19s	m	2	2014	da	da	ne	ne	da	ne	ne	ne	da	ne	/	ne	ne	da	da		
23s	m	7	2014	da	da	da	ne	ne	da	da	da	da	da	jajca	ne	ne	da	ne		
32s	m	3	2014																	
3s	m	5	2015		da	ne	ne	ne	ne	ne	ne	da	ne	/	ne	da	ne	ne		
30s	m	1	2015																	
40s	ž	5	2015	da	ne	da	da	ne	ne	ne	ne	da	da	prepelič a jajca	ne	ne	da	ne		
46s	ž	4	2015																	
87	ž	5	2019	da	da	ne	ne	ne	ne	ne	ne	da	ne	/	ne	ne	da	ne		
76	m	5	2019	ne	da	ne	ne	ne	da	ne	ne	ne	da	piščanec, prepelica , govedina , zajec, , jajca, , kosti, , kostna moka, , drobovin a	ne	da	ne	ne	da	ne

4.3.1. STATISTIČNA OBDELAVA PARAMETROV V ODVISNOSTI OD REZULTATA DETEKCIJE PROTITELES V SERUMU

Nabor podatkov iz ankete lastnikov živali smo statistično vrednotili in na ta način določali povezavo med rezultatom izida serološke preiskave detekcije protiteles in različnih parametrov s potencialnim vplivom nanj. Za osnovno analizo smo uporabili test t za neodvisne vzorce za številske spremenljivke in test deležev za opisne spremenljivke. Meja za statistično značilne razlike je postavljena pri $p = 0.05$.

Tabela 5: Rezultati povezave med epidemiološkimi podatki in pozitivnimi titri protiteles

Table 5: Results of the link between epidemiological data and positive antibody titers

Epidemiološki podatki	P	N	p-vrednost	korelacija
Starost ob odvzemu	5,03	3,8	0,01	*
Cepljenje			0,5	
Sobivanje z dihurji			0,1	
Sobivanje z mačko			0,5	
Sobivanje s psom			0,5	
Spol			0,5	
Stik z zunanjimi glodavci			0,01	*
Surova hrana			<0,0001	*
Stik s tujimi dihurji			0,02	*
Stik s tujimi psi			0,06	
Stik s tujimi mačkami			0,7	
Briketirana hrana			0,05	*
Prehranjevanje z malimi glodavci			0,1	
Brez dostopa do zunanjih površin			0,72	
Dostop do zunanjih površin			0,7	
Dostop do vode			0,4	

*kaže na statistično korelacijo med epidemiološkimi podatki in pozitivnimi titri protiteles

* indicates a statistical correlation between epidemiological data and positive antibody titers

4.4. ŽIVLJENJE BELIH DIHURJEV V SLOVENIJI

Z anketami, ki smo jih uporabili za ugotavljanje epidemioloških podatkov o belih dihurjih, vzorčenih za pregled na protitelesa proti leptospiri, smo pridobili tudi pomembne podatke o življenju dihurjev pri nas.

Za obdelavo podatkov o načinu življenja belih dihurjev v Sloveniji smo uporabili anketne vprašalnike, ki so bili odbrani že za statistično obdelavo parametrov v odvisnosti od rezultata detekcije protiteles v serumu. Teh je bilo 89.

4.4.1. Sobivanje belih dihurjev z drugimi živalmi

Tabela 6: Sobivanje belih dihurjev z drugimi živalmi

Table 6: Cohabitation of ferrets with other animals

Beli dihur			Pes			Mačka			Mali glodavci			Št. pregledanih vzorcev
DA	NE	Ni podatk a	DA	NE	Ni podatk a	DA	NE	Ni podatk a	DA	NE	Ni podatk a	
59	24	6	32	53	4	34	47	8	0	81	8	89
66,29 %	22,97 %	6,74 %	35,96 %	59,55 %	4,48 %	38,20 %	52,81 %	8,99 %	0 %	91,01 %	8,99 %	100 %

4.4.2. Stik dihurjev z drugimi živalmi

Tabela 7: Stik dihurjev z drugimi živalmi

Table 7: Contact with other animals

Tuji dihurji			Tuji psi			Tuje mačke			Zunanji glodavci			Št. pregledanih vzorcev
DA	NE	Ni podatk a	DA	NE	Ni podatk a	DA	,NE	Ni podatk a	DA	NE	Ni podatk a	
22	58	9	9	72	8	6	76	7	0	78	11	89
24,72 %	65,17 %	10,11 %	10,11 %	80,90 %	8,99 %	6,74 %	85,39 %	7,87 %	0 %	87,64 %	12,36 %	100 %

4.4.3. Prehranjevalne navade belih dihurjev

Tabela 8: Prehranjevalne navade belih dihurjev

Table 8: Eating habits of ferrets

Briketirana hrana			Surova hrana			Mali glodavci			Št. pregledanih vzorcev
DA	NE	Ni podatka	DA	NE	Ni podatka	DA	NE	Ni podatka	
65	18	6	60	23	6	6	77	6	89
73,03 %	20,22 %	6,74 %	67,42 %	25,84 %	6,74 %	6,74 %	86,52 %	6,74 %	100 %

Najpogostejša surova hrana, ki so jo navajali lastniki, so bila jajca, prepeličja jajca, perutnina (meso, drobovje), govedina, svinjina, kune, konj, Natures menu, Frankenprey diet (Prey Model Diet; meso kupljeno v trgovini), jagnjetina, ovčje meso, raca, kostna moka, divjačina, prepelica.

4.4.4. Bivalno okolje belih dihurjev

Tabela 9: Bivanje belih dihurjev

Table 9: The living environment of ferrets

Brez dostopa do zunanjih površin			Dostop do zunanjih površin			Dostop do vodnih površin			Št. pregledanih vzorcev
DA	NE	Ni podatka	DA	NE	Ni podatka	DA	NE	Ni podatka	
28	51	10	53	29	7	14	68	7	89
31,46 %	57,30 %	11,24 %	59,55 %	32,58 %	7,87 %	15,73 %	76,40 %	7,87 %	100 %

4.5. CEPLJENJE PROTI KUŽNIM BOLEZNIM

Za obdelavo podatkov o cepnem statusu dihurjev proti pasji kugi (v nadaljevanju besedila: proti kužnim boleznim) v Sloveniji smo uporabili anketne vprašalnike, ki so bili odbrani že za statistično obdelavo parametrov v odvisnosti od rezultata detekcije protiteles v serumu. Teh je bilo 89.

Tabela 10: Cepljenje belih dihurjev proti kužnim boleznim

Table 10: Immunization of ferrets against infectious diseases

Cepljenje DA	Cepljenje NE	Neznan cepni status	Št. pregledanih vzorcev
70	8	11	89
78,65 %	8,99 %	12,36 %	100 %

5. RAZPRAVA

Stik belih dihurjev z leptospirami je bil obravnavan v majhnem številu študij (Lewington, 2007; Pignon in Mayer, 2011) in na splošno velja, da so beli dihurji slabo oz. niso dovzetni za leptospirozo (Chitty in Delaney-Johnson, 2017). Za Slovenijo do sedaj podatka o seroprevalenci pri belih dihurjih še nismo imeli.

Pri raziskavi smo za serološko diagnostiko uporabili test MAT, ki je referenčna metoda za diagnostiko leptospiroze (Markey in sod., 2013) in še vedno velja za zlati standard (WHO, 2003; Mastorilli in sod., 2007; OIE, 2014). Metoda se je za našo raziskavo izkazala kot primerna.

V raziskavi smo 154 serumskih vzorcev belih dihurjev pregledali na prisotnost protiteles proti leptospiri. Izmed 154 vzorcev jih je bilo 16,2 % pozitivnih, 83,8 % pa negativnih. Izmed pozitivnih vzorcev je bilo 40 % samic in 60 % samcev, kar sovpada s podatki iz raziskav, ki poročajo, da je pri psih večji delež okuženih pri samcih. Povečano tveganje za okužbo pri psih moškega spola lahko posledica večje aktivnosti na prostem in specifičnega vedenja, ki je zanje značilno, vključno z vohanjem in lizanjem urina (Major in sod., 2014). Domnevamo, da lahko tako pojasnimo tudi večjo prevalenco pozitivnih vzorcev pri belih dihurjih moškega spola. Samci belih dihurjev, predvsem nekastrirani, pogosto označujejo okolje z urinom, z izločki analnih žlez ter z drgnjenjem urogenitalnega področja po različnih predmetih (Meredith, 2017). Večja okuženost z leptospiro pri moškem spolu se pojavlja tudi pri ljudeh. Izpostavljenost leptospiri se pogosto pripisuje poklicem, ki so povezani z moškim spolom, kot so npr. delo v gozdu, na polju, v rudnikih (Bedernjak, 1995). Možno je, da so razlike med okuženostjo žensk in moških tudi zaradi bioloških razlik med spoloma (Skufca in Arima, 2012).

Največje število pozitivnih vzorcev se je pojavilo med letoma 2012 in 2015. Leta 2018 je bilo vzorčenih 68 dihurjev, vsi so bili negativni. Možno je, da je do take distribucije pozitivnih in negativnih vzorcev prišlo zaradi odvzema vzorcev v različnih sezонаh leta. Okužba z leptospiro je namreč povezana z lokalnimi temperaturami in vzorcem padavin (Major in sod., 2014), ki je lahko v različnih sezona različna.

V naši raziskavi je imelo 63,0 % (22/35) titer protiteles 1:50, 27,3 % (9/35) 1:100 in 11,4 % (4/35) belih dihurjev 1:200.

Na podlagi višine titrov ne moremo trditi, če so bile okužbe pri živalih akutne ali kronične, saj bi za to določitev namreč potrebovali parne serume odvzete v razmaku 14 dni. V primeru, da bi se višina titra v parnem serumu povečala za štirikratno vrednost, bi lahko govorili o akutni okužbi (Amilasan in sod., 2012). Pri kroničnih okužbah lahko titri padejo tudi do povsem nezaznavnih ravni (OIE, 2014).

Epidemiološke podatke smo zbirali s pomočjo ankete. Skupno smo za statistično obdelavo zbrali 89 anket, od tega je bilo 25 vzorcev dihurjev (28,1 %) iz ankete serološko pozitivnih. Del anketne študije je bil retrospektiven, zato nismo imeli anketnih podatkov o vseh belih dihurjih. V tem delu smo se osredotočili na serološko pozitivne živali, zato smo z lastniki serološko pozitivnih dihurjev naknadno stopili v stik. Še ena težava, s katero smo se soočili pri anketiranju lastnikov iz retrospektivnega dela študije je bila, da je bilo večje število pacientov že poginulih in se lastniki ob podajanju podatkov med pogovorom niso dobro spominjali navad svojih dihurjev.

Statistična obdelava je večinoma temeljila na primerjavi epidemioloških podatkov zbranih s pomočjo anket. Pokazala je, da prisotnost protiteles proti leptospiri naj ne bi bila povezana z večino vprašanj, ki smo jih zastavili v anketah, dejstvo pa je, da je število vzorcev, ki smo jih lahko uporabili za statistično primerjavo, majhno; to je 89 anket, kar oslabi statistično ovrednotenje in nam ne predstavi popolnoma realnega/objektivnega prikaza epidemiološkega stanja v populaciji belih dihurjev pri nas. Kljub velikim omejitvam/nejasnosti v statistični raziskavi, smo nekatere rezultate predstavili v nadaljevanju naloge, seveda z veliko mero znanstvene kritičnosti.

Statistična analiza je pokazala povezavo med serološko pozitivnimi belimi dihurji in njihovo starostjo ob odvzemu vzorca ($p=0,01$). Pozitivne živali so bile načeloma starejše (povprečje 5,03 let), negativne pa mlajše (3,8 let). Podatek je zanimiv, saj načeloma velja, da naj bi bile mlajše živali bolj dovtetne za okužbo (Greene, 2006). Razlagamo si ga lahko tako, da je bilo pri starejših belih dihurjih več priložnosti za stik s patogenom in možnostjo okužbe.

Nadalje je bila statistična korelacija ugotovljena med pozitivnimi dihurji in stikom z zunanjimi glodavci ($p=0,01$), vendar moramo upoštevati, da smo imeli na voljo zelo omejeno

količino podatkov. Pri stiku z zunanjimi glodavci podatek o vrsti glodalca in načinu stika največkrat ni znan. Na vprašanje, če je bil beli dihur v kontaktu z zunanjimi glodavci, ni nikče izmed lastnikov odgovoril pritrdilno; večina jih je izbrala negativen odgovor, le dva anketiranca, katerih dihurja sta imela protitelesa proti leptospiri, sta odgovorila »ne vem«. Glede na zelo omejen nabor podatkov in nejasno opredelitev lastnikov glede dotičnega parametra, moramo domnevno statistično pomembno korelacijo med parametromoma ovrednotiti zelo previdno. Tako kot mačke, so tudi dihurji po naravi plenilci. Raziskava pri mačkah je pokazala, da je za mačke, ki svoj plen lovijo, večja možnost da postanejo okužene ob stiku z malimi glodavci (Schuller in sod., 2015).

Podatki naše raziskave o prehrani belih dihurjev kažejo, da se večina dihurjev pri nas prehranjuje z briketirano hrano (73,0 % oz. 65/89). Gre za najenostavnnejši način prehrane, ki pa ni vedno najprimernejši. Samo nekatere kvalitetnejše hrane za mačke in briketirana hrana posebej za dihurje zadoščajo prehranskim potrebam dihurjev. Pozorni moramo biti, da je dieta bogata s proteini in maščobo (Johnson-Delaney, 2014), delež ogljikovih hidratov in vlaknin naj bo nizek (Mitchell in Tully Jr, 2009). Hrana mora biti primerno shranjena.

Glede prehrane je zanimivo dejstvo, da je bila večina dihurjev, pri katerih smo ugotovili prisotnost specifičnih protiteles, izključno na dieti z briketirano hrano (statistično mejna vrednost, $p=0,05$). Izmed 25 belih dihurjev z ugotovljenimi protitelesi, je za 19 živali znan podatek o prehrani z briketirano ali surovo hrano. Za 6 živali podatka nimamo.

Statistično povezavo med prisotnostjo specifičnih protiteles in briketirano hrano je težko obrazložiti. Lahko se sklicujemo na majhno število vzorcev, ki so bili zajeti v raziskavi, in tako ne predstavljajo reprezentativne slike populacije dihurjev. Možno je, da je statistična povezava med parametromoma zato zgolj naključna. Zavedati se moramo, da je briketirana hrana najenostavnješa priprava obroka za bele dihurje in se je poslužuje večina (78,3 %) lastnikov belih dihurjev, za katere imamo podatke. Statistično povezavo bi morda pojasnili s tem, da si v gospodinjstvu z več belimi dihurji isto posodo s hrano pogosto deli več živali, torej bi bil pravzaprav lahko problematičen stik z morebitno okuženimi drugimi belimi dihurji. Če so briketi v prostoru, kjer lahko do njih dostopajo tudi druge živali (psi, mačke), je možno, da letete občasno jedo hrano dihurjev ter s tem na posodi oz. na hrani pustijo patogene. Poleg tega obstaja velika možnost kontaminacije, če lahko do hrane dostopajo mali glodavci. Žal z anketo nismo pridobili podatka, kje in kako lastnikih hranijo briketirano hrano za bele dihurje.

S surovo hrano svoje bele dihurje prehranjuje 72,3 % lastnikov (60/83), mnogi jo v prehrano vključijo zgolj kot priboljšek. Lastniki so kot surovo hrano, s katero hranijo bele dihurje, navajali perutnino, govedino, svinjino, meso kunca in konja, divjačino, jagnjetino, prepeličje in rače meso ter kokošja in prepeličja jajca. Statistični podatki v naši raziskavi so pokazali povezavo med serološko pozitivnimi belimi dihurji in uživanjem surove hrane ($p<0,0001$). Podatek je nenavaden, sploh zato, ker se je izključno s surovo prehrano prehranjeval le 1/25 serološko pozitivnih dihurjev. Možno je, da je statistična povezava zgolj naključje, tako kot pri prehranjevanju z briketirano hrano, zaradi majhnega števila vzorcev.

Povezave med hranjenjem belih dihurjev s celotnim plenom in prisotnostjo protiteles proti leptospiri nismo ugotovili. Podatek nakazuje, da mali glodavci (miši, podgane), ki se uporablajo za prehrano belih dihurjev v Sloveniji, niso okuženi z leptospiro. Hranjenje s celim plenom je najprimernejša prehrana za dihurje. Če lastniki dihurjev nočejo hraniti svojih ljubljenčkov samo s celim plenom, se vseeno svetuje, da jim občasno ponudijo miš ali en starega piščanca kot priboljšek za pomembno obogatitev diete. Iztrebki dihurja so pri prehrani s celim plenom zelo čvrsti, imajo majhen volumen, pa tudi vonj je manj zaznaven (Johnson-Delaney, 2014). Po anketnih podatkih je delež belih dihurjev, ki jih lastniki prehranjujejo z malimi glodavci, pri nas nizek (6,7%), kar lahko še dodatno pojasni odsotnost seropozitivnih dihurjev v tej skupini.

Statistična analiza je pokazala tudi povezavo pri serološko pozitivnih belih dihurjih v stiku s tujimi dihurji ($p=0,02$). Izmed 89 anketiranih, se jih je na anketno vprašanje o stiku belih dihurjev s tujimi dihurji, odzvalo 80 lastnikov. Izmed teh je 22/80 (27,5 %) lastnikov stik svojih belih dihurjev s tujimi dihurji potrdila, večina belih dihurjev pa stika s tujimi dihurji nima (58/80 oz. 72,5 %). Glede na to, da lahko rezervoar leptospire predstavlja katera koli vrsta sesalcev (Hirsh in Zee, 1999), lahko domnevamo, da lahko tudi tuji dihurji predstavljajo možnost okužbe.

Z anketami, ki smo jih uporabili za ugotavljanje o epidemioloških podatkov o dihurjih, vzorčenih za pregled na protitelesa proti leptospiri, smo pridobili tudi pomemben vpogled v življenje belih dihurjev pri nas. Gre za pomemben podatek, saj za Slovenijo do sedaj tovrstnih informacij ni bilo na voljo. Po rezultatih ankete beli dihurji v Sloveniji najpogosteje sobivajo z drugimi belimi dihurji (66,3 % oz. 59/89) ali mačkami (38,2 % oz. 34/89), sobivanje s psi je nekoliko redkejše (36,0 % oz. 32/89), z malimi glodavci pa ne sobiva noben. Najboljše je, da

imamo vsaj dva dihurja, ki živita skupaj, da si delata družbo (Brennand, 2011), saj se zelo radi družijo in igrajo (Carver-Carpenter, 2004). Zavedati pa se moramo, da je v primeru sobivanja možnost prenosa kužnih bolezni večja (Huber in sod., 2017). To je še posebej pomembno, ko lastniki pridobijo novega dihurja in ga brez predhodnih pregledov in kratke karantene združijo z do tedaj že prisotnimi dihurji. Pod nadzorom lahko dihurji sobivajo tudi s psi ali mačkami (Meredith, 2017)², mali glodavci ali kunci pa zanje niso primerna družba (Meredith in Redrobe, 2002; Meredith, 2017). Beli dihurji v Sloveniji večinoma nimajo stika s tujimi živalmi. Največ izmed anketiranih ima stik s tujimi dihurji (24,7 % oz. 22/89). Po naših podatkih se lastniki dihurjev in njihovi dihurji občasno srečajo na organiziranih in tudi naključnih srečanjih. Pomembno je, da se teh druženj udeležujejo zgolj klinično zdrave živali. Beli dihurji se manj družijo s tujimi psi (10,1 % oz. 9/89) ali mačkami (6,7 % oz. 6/89).

Izmed anketiranih lastnikov ni nihče poročal o stiku svojega belega dihurja stiku z zunanjimi glodavci, 12,4 % lastnikov na vprašanje ni odgovorilo. Lastniki so se odločali predvsem med odgovoroma »ne« in »ne vem«. Zaradi premajhnega števila podatkov o stiku pozitivnih dihurjev z zunanjimi glodavci, tega dela populacije nismo mogli statistično ustrezno primerjati z deležem negativnih dihurjev iz ankete.

Bivalno okolje belih dihurjev smo v anketi opredelili kot bivanje brez dostopa do zunanjih površin, bivanje z dostopom do zunanjih površin ter bivanje z dostopom do vodnih površin. Zgolj v notranjih prostorih biva le 31,5 % dihurjev pri nas. Večina (59,6 %) jih ima dostop do zunanjih površin, kamor smo šteli tudi dvorišče, balkone, terase, sprehode. Dostopa do naravnih vodnih površin večina nima; le 15,7 % lastnikov je poročalo, da imajo njihovi beli dihurji dostop do vodnih površin, kot so potoki, reke, jezera, pa tudi luže na poti. Vodovje velja za pomemben okoljski dejavnik pri vzdrževanju leptospir. Ko je voda enkrat kontaminirana z urinom okuženih živali, postane pomemben dejavnik prenosa okužbe (Azocar-Aedo in sod., 2014). Za dihurje se svetuje, da so na sprehodu pod nadzorom in so privezani na dolg povodec (Huber in sod., 2017). Na takšnih sprehodih lahko pridejo v stik s

² Veliko je odvisno od pasme in značaja psa oz. mačke. Lovski psi lahko dihurja vidijo kot plen, zato je potrebna pazljivost. Belih dihurjev zato nikoli ne puščamo samih brez nadzora v družbi psov ali mačk (Čonč., 2019, ustni vir).

A lot depends on the breed and the character of a dog or a cat. Hunting dogs can see ferret as a prey, so owners need to be careful. Ferrets are therefore never left alone in the company of dogs or cats (Čonč., 2019, oral source)

kontaminirano dlako okužene prostoživeče živali, s kontaminirano vodo in drugimi površinami, kontaminirami rastlinami ter drugimi predmeti, ki so onesnaženi z urinom ali drugimi izločki okuženih prostoživečih in domačih živalih. Tudi pri zunanjih mačkah, mačkah, ki živijo na mestnih območjih, in mačkah, ki svoj plen lovijo, so poročali o večji pozitivnosti na protitelesa proti leptospiri (Schuller in sod., 2015). Podobno kot pri mačkah, se je tudi pri psih, ki so pogosto izpostavljeni vodi, in tistih, ki veliko časa preživijo na prostem, pokazalo večje tveganje za okužbe, podobno pa velja tudi za ljudi (Major in sod., 2014). Statistična obdelava podatkov iz naših anket tega ni potrdila. Kljub temu lahko domnevamo, da je možnost okužbe višja pri dihurjih, ki imajo dostop do zunanjih površin v primerjavi s tistimi, ki takega dostopa nimajo. Menimo, da je v prihodnosti potrebno narediti še natančnejše epidemiološko poizvedovanje za razjasnitev ogroženosti belih dihurjev, ki preživijo veliko časa na prostem, na sprehodu po parkih, gozdnih poteh in drugod zaradi nevarnosti za okužbo z leptospiro.

Za obdelavo podatkov o precepljenosti belih dihurjev proti kužnim boleznim v Sloveniji smo uporabili istih 89 anketnih vprašalnikov. Rezultati so pokazali, da je večina belih dihurjev pri nas (78,7 %) cepljena proti pasji kugi. Med vzorčeno populacijo jih 9,0 % ni cepljenih, za ostale pa žal nimamo podatka. V Sloveniji tako kot v večini evropskih držav za cepljenje dihurjev proti pasji kugi uporabljam cepiva za pse, saj pri nas ni na voljo cepiva, ki bi bilo registrirano za dihurje (Račnik in Zadravec, 2013). Preko osebne komunikacije z veterinarji, ki delajo na klinikah za male živali v Sloveniji smo izvedeli, da se za cepljenje belih dihurjev uporablja cepiva različnih proizvajalcev, namenjena psom, v katerih poleg antigena pasje kuge najdemo še antigene drugih kužnih bolezni psov, med katerimi je tudi leptospira, in sicer lahko cepiva vsebujejo serovara Canicola in Icterohaemorhagiae ali pa serovare Canicola, Icterohaemorhagiae, Grippotyphosa in Bratislava (Uradni list RS, 2014a; Uradni list RS, 2014b; Uradni list RS, 2014c; Uradni list RS, 2014d). Najpogosteje se cepiva, ki jih uporabljam pri nas, nahajajo v dveh oblikah, in sicer v liofiliziranem/prašnem delu ter v delu, raztopljenem v tekočini, ki ju je pred aplikacijo cepiva potrebno združiti in premešati. Antigen posameznih serovarov leptospire se praviloma nahaja v tekoči fazni cepiva. Na Kliniki za ptice, male sesalce in plazilce, Inštituta za perutnino, ptice, male sesalce in plazilce, VF, pri pripravi cepiva za cepljenje belih dihurjev proti pasji kugu tekočo fazo cepiva vedno nadomestimo z vodo za injiciranje ali s topljencem, ki ga komercialno doda/priporoča proizvajalec, zato lahko zagotovo trdimo, da dihurji, ki so bili pri nas cepljeni proti kužnim

boleznim, niso bili cepljeni proti leptospiri. Žal pa je nemogoče izvedeti, če tudi na drugih klinikah tekočo fazo cepiva zamenjajo z destilirano vodo. Veliko število belih dihurjev, ki so med pacienti Klinike za ptice, male sesalce in plazilce, je bilo uvoženih iz drugih držav, in sicer iz Hrvaške, Makedonije, Češke, Rusije, veliko jih je tudi iz Slovaške. V novejšem času je na tržišču tudi individualno cepitvo proti leptospiri, ki ga veterinar uporabi individualno ali ga doda cepivu proti pasji kugi in drugim bolezenskim povzročiteljem pri cepljenju psa.

Razpon ugotovljenih titrov serološko pozitivnih dihurjev v raziskavi je bil med 1:50 in 1:200. Če vzorec pozitivno reagira na več serovarov iz iste serološke skupine velja, da je pozitiven na serovar, pri katerem je bil titer najvišji (Azocar-Aedo in sod., 2014).

Proti serovaru Icterohaemorrhagiae je imelo osem vzorcev titer 1:50, en vzorec 1:100 ter dva 1:200. Titri proti serovaru Pomona so bili pri enem dihurju 1:100, pri drugem pa 1:200. Proti serovaru Sejroe je reagiral en vzorec s titrom 1:50. Titri proti Saxkoebing so znašali 1:50 pri dveh dihurjih in 1:100 pri tretjemu. Proti Hardjo je bil seropozitiven en vzorec, titer je znašal 1:50. Višine titrov proti serovaru Batavie so znašale 1:50 pri enem dihurju, pri drugih treh pa 1:100. Proti serovaru Bratislava sta bila pozitivna dva vzorca, oba višine titra 1:50. Titri proti serovaru Canicola so znašali 1:50 (štirje vzorci) in 1:100 (en vzorec). Proti serovaru Australis so reagirali trije dihurji s titrom 1:50, dva 1:100 in eden 1:200. Skupno je 62,9 % (22/35) vzorcev reagiralo v titru 1:50, 22,9 % (9/35) v titru 1:100 in 11,4 % (4/35) v titru 1:200.

Serovar, proti kateremu smo najpogosteje ugotavljali protitelesa, je bil serovar Icterohaemorrhagiae, ki je bil prisoten kar pri 31,4 % testiranih belih dihurjih. Sledila so protitelesa proti serovaru Australis (17,1 %) in Canicola (14,3 %), nato Bataviae (11,4 %), Saxkoebing (8,6 %), Pomona in Bratislava (vsak 5,7 %) ter Sejroe in Hardjo (2,9 %).

Serovar Icterohaemorrhagiae je najpogostejši povzročitelj okužbe pri psih (Markey in sod., 2013, Schuller in sod., 2015), tudi pri mačkah (Schuller in sod., 2015). Pri psih se okužba kaže kot akutna hemoragična bolezen z visoko vročino, bruhanjem, pogosto sledi zgodnja smrt (Markey in sod., 2013). Primarni rezervoar predstavljajo podgane (Greene, 2006). Serovar je bil izoliran tudi pri asimptomatskih dihurjih (Pignon in Mayer, 2001), med prostoživečimi vrstami pa so nanj serološko pozitivno odreagirale različne vrste iz družine Mustelidae, in sicer evropski mink, navadni dihur, ameriški mink, kuna belica in kuna zlatica (Moinet in sod., 2010). Izmed ostalih prostoživečih vrst, so študije pokazale tudi seropozitivnosti pri divjih prašičih (*Sus scrofa*), navadnem jelenu (*Cervus elaphus*), navadni

lisici (*Vulpes vulpes*), rjavem medvedu (*Ursus arctos*) (Slavica in sod., 2007), evropskih bobrih (*Castor fiber*) in pižmovkah (*Ondatra zibethicus*) (Hartskeerl in Terpstra, 1996). Raziskava leptosiroze med mesojedi v Španiji je poročala tudi o serološko prevalenci serovara Icterohaemorrhagiae pri iberskem risu (*Iberian lynx*), egiptovskem/egipčanskem mungu (*Herpestes ichneumon*), jazbecu (*Meles meles*) in nekaterih drugih (Millan in sod., 2008).

V naši raziskavi je proti serovaru Icterohaemorrhagiae pozitivno reagiralo enajst belih dihurjev, epidemiološke podatke imamo le za osem belih dihurjev, tri ankete žal niso bile ustrezeno izpolnjene. Izmed osmih belih dihurjev jih je sedem sobivalo z dihurji, dva z mačkami. V stiku s tujimi dihurji so bili širje beli dihurji, za enega nimamo podatka. Vseh osem se je prehranjevalo z briketirano hrano, trije tudi s surovo, in sicer s perutnino in jajci. Trije so bivali zgolj v notranjih prostorih, širje so imeli dostop do zunanjih površin. Lastnik enega belega dihurja je poročal o stiku z vodnimi površinami. Osem dihurjev je bilo cepljenih proti kužnim boleznim, žal pa nimamo podatka, o časovnem razmiku pred našim odvzemom vzorcev. Na podlagi epidemioloških podatkov je razvidno, da je večina pregledanih živali sobivala z drugim dihurjem ($n=7$), polovica pa je imela dostop na prosto, kjer je morda prišlo do okužbe. Do okužbe je lahko prišlo ob stiku z drugimi živalmi in njihovim urinom, možno pa je tudi, da so bili dihurji serološko pozitivni zaradi postvakcinalnih protiteles proti serovaru Icterohaemorrhagiae. Na žalost nimamo podatkov o možni uporabi cepiva proti leptosirozi pri teh živalih. Raziskava za bivalentna cepiva pri psih, s serovaroma Icterohaemorrhagiae in Canicola, je pokazala, da lahko imunost proti obema serovaroma vztraja največ eno leto (Klaasen in sod., 2003), zato se načeloma po preteku enega leta ne more detektirati cepnih protiteles v serumskem vzorcu.

Serovar Australis najdemo tudi pri psih, kjer se odraža kot sindrom SIRS (ang. systemic inflammatory response syndrome), diseminirana intravaskularna koagulacija, v okužbo so vpleteni številni organi (Mastorilli in sod., 2007). Pri prostoživečih vrstah so serovar Australis našli pri divjih prašičih, navadnem jelenu, navadni lisici, rjavemu medvedu in srni (*Capreolus capreolus*) (Slavica in sod., 2007) ter pri mustelidnih vrstah, kot so evropski mink, navadni dihur, ameriški mink, kuna belica in kuna zlatica (Moinet in sod., 2010).

V naši raziskavi je proti serovaru Australis pozitivno reagiralo šest belih dihurjev, za večino imamo tudi epidemiološke podatke (5/6). Vsi serološko pozitivni beli dihurji so sobivali z

dihurjem, s psom in mačko sta sobivala dva dihurja. S tujimi dihurji sta imela stike dva dihurja, z mačkami eden. Dva lastnika sta poročala o prehrani s surovo hrano, in sicer pri enem z jajci, drugega pa so hrаниli s perutnino, govedino in svinjino. Eden izmed dihurjev se je zadrževal samo v notranjih prostorih, širje so imeli dostop do zunanjih površin. Do okužbe bi lahko prišlo zaradi stika z drugimi belimi dihurji, mačko ali psom, možnost okužbe pa obstaja tudi v zunanjem okolju, ker bi lahko dihurji prišli v stik s kontaminirano vodo, dlako ali pa z urinom okuženih prostoživečih živali.

Tudi serovar Canicola se pojavlja predvsem pri psih (Azocar-Aedo in sod., 2014), ki predstavljajo njegov primarni rezervoar (Greene, 2006). Omenjajo ga tudi pri okužbi mačk (Schuller in sod., 2015), domnevajo pa, da bi lahko bil pri mačkah za okužbo vzrok stik z okuženim psom (Azocar-Aedo in sod., 2014). Okužba je pri psih običajno subklinična, pogosto je prisotna leptospiruria (Markey in sod., 2013). Raziskava o prevalenci protiteles proti leptospiri pri plazilcih in želvah v Sloveniji je opisala protitelesa proti serovaru Canicola pri leopardjem gekonu (*Eublepharis macularius*) in pri močvirski sklednici (*Emys orbicularis*) (Lindner-Knific in sod., 2013).

Proti serovaru Canicola je med belimi dihurji, ki smo jih v raziskavi preiskali, pet živali reagiralo pozitivno. Epidemiološke podatke imamo za štiri živali; širje dihurji so sobivali z drugimi dihurji, trije s psom, dva z mačko. S tujimi dihurji so imele stik tri živali. En izmed dihurjev je kot dodatek v prehrani dobival surova jajca. Dva lastnika sta poročala, da živali bivajo zgolj v notranjih prostorih, dva dihurja sta imela dostop do zunanjih površin ter tudi dostop do vode. Vsi širje dihurji so bili cepljeni proti kužnim boleznim. Vzrok za okužbo je bil morda stik s tujimi živalmi. Tista dva dihurja, ki sta imela dostop do zunanjih in tudi do vodnih površin, bi se lahko okužila tudi ob stiku z kontaminirano vodo ali pa v stiku s prostoživečimi živalmi oz. njihovim urinom. Možno je, da so bili dihurji serološko pozitivni zaradi cepljenja s pasjim cepivom zoper pasjo kugo, ki ji je bila dodana tekoča faza cepiva z antigeni proti serovaru Canicola. To je mogoče le v primeru, da je bila žival cepljena največ leto dni pred odvzemom vzorca (Klaasen in sod., 2003), če domnevamo, da prisotost protiteles po cepljenju pri dihurjih vztraja enako dolgo kot pri psih. Glede na to, da ta podatek ni potrjen, ne moremo z gotovostjo trditi, da je serološka pozitivnost posledica cepljenja, je pa malo verjetno.

Serovar Bataviae se pojavlja pri psih, podganah in miših (Azocar-Aedo in sod., 2014), našli pa so ga tudi pri divjem prašiču (Slavica in sod., 2007), tudi v Sloveniji (Vengust in sod., 2008). Za mačke se domneva, da bi lahko prišlo do okužbe s tem serovarem zaradi stika s psi, podganami ali mišmi. Glede na podobnosti v načinu življenja mačk in dihurjev lahko domnevamo, da bi bil tudi za serološko pozitivne dihurje lahko vzrok stik s psi.

V naši raziskavi so bili na ta serovar pozitivni širje dihurji, epidemiološke podatke pa imamo žal za samo dva izmed njih. En izmed njiju je sobival z dihurjem, drugi ne. Eden je imel dostop do zunanjih površin, en je bival le v notranjih prostorih. Pri dihurju, ki je imel dostop do zunanjih površin je možno, da je lahko prišel do stika s kontaminirano vodo, s kontaminirano odpadlo dlako okuženih živali, možno je tudi, da bi prišlo do stika z urinom okužene prostoživeče živali.

Serovar Saxkoebing omenjajo pri prostoživečih vrstah, kot sta navadna lisica rjavi medved (Slavica in sod., 2007), v Sloveniji so bili na ta serovar pozitivni divji prašiči (Vengust in sod., 2008). Pozitivno je proti temu reagiral tudi prostoživeči dihurj, čigar titer je znašal 1:300 (Fennestad in Borg-Petersen, 1972).

Proti serovaru Saxkoebing so bili v naši raziskavi seropozitivni trije dihurji. Vsi so sobivali z drugimi dihurji, dva izmed njih tudi s psom. En lastnik je poročal o stiku s tujimi dihurji, drugi pa o stiku s psi in mačkami. En beli dihur je kot dodatek k briketirani hrani dobival še jajca. Dva izmed dihurjev sta bivala samo v notranjih prostorih, eden je imel dostop do zunanjih površin. Seropozitivni dihurji bi se lahko okužili ob stiku z drugimi dihurji ali z drugimi živalskimi vrstami, kot so psi in mačke. Dihur, ki je imel dostop do zunanjih površin, bi se lahko okužil ob stiku s kontaminirano dlako okuženih živali, s kontaminirano vodo ali pa z urinom okuženih živali.

Serovar Pomona se pojavlja pri psih (Markey in sod., 2013) in tudi pri mačkah (Schuller in sod., 2015). Primarni rezervoar sicer predstavljajo govedo, prašiči, skunki in oposumi (Greene, 2006; Van de Maele in sod., 2008). Okužba s serovarem je bila opisana tudi pri prostoživečih vrstah, in sicer pri divjem prašiču, navadni lisici, navadnemu jelenu, rjavem medvedu in srni. Med mustelidnimi vrstami je bila seropozitvnost proti serovaru Pomona opisana pri kuni belici (Slavica in sod., 2008). Protitelesa proti serovaru Pomona so našli v raziskavi o prevalenci protiteles proti leptospiri pri plazilcih in želvah v Sloveniji, in sicer pri

rjavi peščeni boi (*Eryx johnii*) in pri mavrski želvi (*Testudo graeca*) (Lindtner-Knific in sod., 2013).

V naši raziskavi sta bila na Pomono seropozitivna dva dihurja. Eden izmed njiju je sobival z drugimi dihurji, psom in mačko, prav tako je imel stik s tujimi dihurji, psi in mačkami. Prehranjeval se je tudi s surovo hrano. Lastnik je poročal o dostopu do zunanjih površin. Za drugega dihurja epidemioloških podatkov nimamo. Na podlagi epidemioloških podatkov za enega izmed pozitivnih dihurjev na serovar Pomona lahko sklepamo, da je do okužbe lahko prišlo ob stiku s tujimi živalmi oz. njihovim urinom, zaradi dostopa do zunanjih površin je možen stik tudi s prostoživečimi živalmi oz. odpadlo kontaminirano dlako okuženih živali, njihovimi urinskimi izločki, možen je tudi stik s kontaminirano vodo.

Primarni rezervoar serovara Bratislava predstavljajo podgane, prašiči (Greene, 2006) in konji (Van de Maele in sod., 2008; Schuller in sod., 2015), najpogosteje pa serovar povezujejo s prostoživečimi ježi (Birtles, 2012). Pojavlja se tudi pri psih (Hirsh in Zee, 1999), kjer opisujejo klinične znake kot so neplodnost, abortus in mrtvorojeni mladiči (Markey in sod., 2013). V nasprotju s starejšimi poročili (Greene, 2006) so ugotovili, da se okužba s serovaram vendarle pojavlja tudi pri mačkah (Schuller in sod., 2015). Serovaram Bratislava je bil opisana tudi pri podlasici (Greene, 2006) in pri prostoživečih zajcih iz družine *Leporidae* (Hartskeerl in Terpstra, 1996).

Na serovar Bratislava sta bila seropozitivna dva dihurja. En izmed njiju je sobival z drugimi dihurji, en pa z mačko in psom. S tujimi dihurji je imel stik en izmed njiju. Enega dihurja so hranili zgolj s surovo hrano, drugi pa je surovo hrano (prepeličja jajca) dobival kot priboljšek. Eden izmed dihurjev je bival samo v notranjih prostorih, drugi je imel dostop tudi do zunanjih površin. En dihur je bil cepljen proti kužnim boleznim, drugi pa ne. Možno je, da sta se dihurja okužila ob stiku z drugimi živalmi, in sicer eden zaradi sobivanja z dihurjem, drugi pa zaradi sobivanja s psom in mačko. Dihur, ki je bil cepljen proti kužnim boleznim in je cepivu bila dodana tekoča faza, je lahko bil antigenom leptospire izpostavljen ob cepljenju, kar bi povzročilo seropozitivnost njegovega vzorca. Dihur, ki je imel dostop do zunanjih površin bi se lahko okužil tudi ob stiku z izločki okuženih živali ali s kontaminirano vodo.

Serovar Sejroe je bil opisan pri prostoživečih vrstah, in sicer pri divjem prašiču, navadni lisici, navadnemu jelenu, rjavem medvedu in srni. Med mustelidnimi vrstami je bila seropozitivnost s serovaram Sejroe opisana pri kuni belici (Slavica in sod., 2007), kuni zlatici, evropskem

minku, navadnem dihurju, in ameriškemu minku (Moinet in sod., 2010), izoliran pa je bil pri hermelinih (Fennestad in Borg-Petersen, 1972). V raziskavi o leptospirozi pri prostoživečih mesojedih v Španiji so poročali o serološko pozitivni prevalenci serovara Sejroe tudi pri iberskem risu, egiptovskem mungu in jazbecu (Millan in sod., 2008).

Na Sejroe je bil v naši raziskavi seropozitiven en beli dihur. Ta je sobival z dihurji in s psom. Imel je stik s tujimi dihurji, psi in mačkami. Od surove hrane je jedel zgolj jajca kot dodatek. Lastnik je poročal o dostopu do zunanjih površin, zato je najverjetnejše, da se je tam dihur okužil ob stiku z drugimi okuženimi živalmi ali njihovim urinom, možno je, da bi do okužbe prišlo tudi ob stiku s kontaminirano vodo.

Okužba s serovarom Hardjo se pojavlja pri prežvekovalcih (Van de Maele in sod., 2008), kot so govedo in ovce (Schuller in sod., 2015), opisana je bila tudi pri divjih prašičih (Slavica in sod., 2007; Vengust in sod., 2008), psih (Greene, 2006) in mačkah (Schuller in sod., 2015). Raziskava o prevalenci protiteles proti leptospirozi pri plazilcih in želvah v Sloveniji je pokazala protitelesa proti serovaru Hardjo pri zelenemu legvanu (*Iguana iguana*), titer je pri tej vrsti dosegel višino 1:1000 (Lindtner-Knific in sod., 2013).

V naši raziskavi je bil na serovar Hardjo pozitiven le en dihur. Dihur je sobival z drugimi dihurji, bival je pa samo v notranjih prostorih. Glede na to, da je več dihurjev živilo skupaj, domnevamo, da so imeli enake navade, torej da nihče izmed njih ni imel dostopa do zunanjih površin. Okužbo bi morda lahko pojasnili, če je dihur prišel v stik npr. s kontaminirano dlako ali drugimi izločki, ki so se prijeli obleke oz. obuval lastnika.

Protitelesa proti serovarom Grippotyphosa, Tarassovi in Autummalis se znotraj populacije pregledanih dihurjev niso pojavila. V cepivih proti kužnim boleznim za pse se izmed teh nahaja le serovar Grippotyphosa (Uradni list RS, 2014a; Uradni list RS, 2014b; Uradni list RS, 2014c; Uradni list RS, 2014d). Možno je, da dihurji niso prišli v stik s temi serovari.

V daljšem časovnem razmiku smo štiri iste paciente vzorčili dvakrat. Zanimivo je, da sta bila dva izmed njih ob prvem testiranju serološko pozitivna (vzorca 64s in 19s), ko smo ju ponovno testirali čez nekaj let, pa sta bila njuna vzorca negativna. Življenski slog se jima v vmesnem času ni spremenil. Oba pacienta sta bila ob prvem testiranju mladi živali (stari 1-2 leti). Avtorji poročajo, da so pri psih mlade živali v primerjavi s starejšimi pogosteje seropozitivne (Greene, 2006), enako velja tudi za mačke (Azocar-Aedo in sod., 2014).

Podatki nasprotujejo rezultatom naše raziskave, ki so pokazali, da so starejše živali pogosteje okužene.

Vzorec 64s je bil serološko pozitiven na serovar Bataviae, 19s pa na serovar Canicola. Serovar Canicola se nahaja v cepivu proti kužnim boleznim (Uradni list RS, 2014a; Uradni list RS, 2014b; Uradni list RS, 2014c), zato bi bilo mogoče, da je pri vzorcu 19s prišlo do pozitivnega rezultata zaradi cepljenja. Zanimivo je, da dihur ni reagiral proti serovaru Icterohaemorrhagiae, ki se prav tako nahaja v cepivu (Uradni list RS, 2014a; Uradni list RS, 2014b; Uradni list RS, 2014c), zato je smiselno domnevati, da cepljenje zelo verjetno ni povzročilo serološko pozitivnega rezultata. Vzrok za okužbo bi lahko sicer bil tudi dostop do zunanjih površin ter dostop do vode. Za vzorec 64s lahko domnevamo, da bi bil vzrok za okužbo s serovarom Bataviae stik s psi ali prostoživečimi glodavci. Zopet pa ne moremo tega trditi z gotovostjo, saj za vzorec 64s nimamo ustrezno izpolnjene ankete o epidemioloških podatkih.

Naši rezultati so pokazali, da beli dihurji serološko odreagirajo na okužbo z leptospirami. Po dostopnih podatkih gre za prvi opis serološko pozitivnih belih dihurjev. Trdni dokaz, da so beli dihurji prišli v stik z leptospiro je, da smo med serološkim rezultati našli tudi vzorce dihurjev, ki so bili pozitivni na serovare, ki jih v cepivih proti kužnim boleznim (leptospirozi) ne najdemo.

Na Kliniki za ptice, male sesalce in plazilce, Inštituta za perutnino, ptice, male sesalce in plazilce, Veterinarske fakultete v Ljubljani, še vedno nadaljujemo z vzorčenjem belih dihurjev in testiranjem serumskih vzorcev proti leptospiro. Smiselna bi bila večja pozornost na morebitne klinične znake pri bodočih pacientih, ki bi kazali na sum leptospiroze. V primeru pozitivnega rezultata serološkega testiranja bo potrebno spremeljanje poteka bolezni s posebnim poudarkom na zdravljenju same okužbe. Za nadaljnje raziskave na tem področju bi bilo smiselno uporabiti precej večje število vzorcev, da dobimo boljši vpogled v stanje celotne populacije belih dihurjev pri nas. Smiselno bi bilo tudi ugotoviti, kakšne so možnosti prenosa na človeka, saj gre vendarle za zoonozo. Po naših podatkih so beli dihurji pogosti hišni ljubljenci, ki so v zelo tesnem stiku s človekom ter, sodeč po rezultatih anket, tudi z drugimi domaćimi živalmi, kot so psi in mačke.

6. SKLEPI

- Metoda MAT je primerna metoda za ugotavljanje protiteles proti Leptospiri v serumu belih dihurjev.
- Beli dihurji se okužijo z leptospirami in razvijejo imunski odgovor.
- Hipotezo, da je večje tveganje za okužbo lahko povezano s hranjenjem s surovim mesom, smo ovrgli.
- Ugotovili smo, da obstaja tveganje za okužbo, povezano s hranjenjem z briketirano hrano (mejna statistična vrednost, $p=0,05$), najverjetneje če ta ni pravilo shranjena in omogoča dostop drugim živalim.
- Hipoteze, ki izhaja iz literarnih podatkov, da je večje tveganje za okužbo povezano z načinom življenja (življenje v zunanjem okolju, stik z zunanjimi viri vode – luže, jezera ...) nismo uspeli statistično potrditi.
- Ugotovili smo, da je večje tveganje za okužbo povezano s stikom z drugimi živalmi, in sicer s stikom s tujimi dihurji.
- Ugotovili smo, da je prisotnost specifičnih protiteles pogostejša med starejšimi dihurji.
- Ugotovili smo, da je bilo več serološko pozitivnih živali moškega spola.

7. ZAHVALA

Največja zahvala gre seveda mentorju doc. dr. Jošku Račniku, dr. vet. med. in somentorici dr. Renati Lindtner Knific, dr. vet. med. za pomoč pri delu in pisanju te naloge, za predano znanje, za potrpežljivost ter vso podporo.

Za vsa pojasnila in pomoč pri delu se zahvaljujem tudi asist. dr. Nini Mlakar Hrženjak, dr. vet. med., ter vsem ostalim zaposlenim na Kliniki za ptice, male sesalce in plazilce.

Hvala Maji Čonč, za pomoč pri kontaktu z lastniki dihurjev.

Iz vsega srca se zahvaljujem tudi Manici, Janu, družini in vsem bližnjim za vse vzpodbudne besede, neizmerno podporo in razumevanje ter pomoč pri delu.

Nenazadnje bi se želela zahvaliti še Inštitutu za perutnino, ptice, male sesalce in plazilce, Veterinarske fakultete v Ljubljani, brez katerega izvedba te naloge ne bi bila mogoča.

Iskrena hvala!

8. LITERATURA

1. Adler B, De la Pena Moctezuma A. Leptospira and leptospirosis. *Vet Microbiol* 2010; 140 (3/4): 287–96.
2. Adler B. History of leptospirosis and leptospira. In: Adler B. *Leptospira and Leptospirosis*. Berlin: Springer. Berlin 2015: 1–9.
3. Amilasan AT, Ujiie M, Suzuki M, et al. Outbreak of leptospirosis after flood, the Philippines 2009. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18 (1): 91–4.
4. Ayral F, Djelouadji Z, Raton V, et al. Hedgehogs and mustelid species: major carriers of pathogenic leptospira, a survey in 28 animal species in France (2012–2015). *PLoS ONE* 2016; 11(9): e0162549. doi: 10.1371/journal.pone.0162549.
5. Azocar-Aedo L, Monti G, Jara R. Leptospira spp. in domestic cats from different environments: prevalence of antibodies and risk factors associated with the seropositivity. *Animals* 2014; 4: 612–26.
6. Barros M, Saenz L, Lapierre L, Nuñez C, Medina-Vogel G. High prevalence of pathogenic Leptospira in alien American mink (*Neovison vison*) in Patagonia. *Rev Chil de Hist Nat* 2014; 87: e19. DOI: 10.1186/s40693-014-0019-x.
7. Bashiru G, Bahaman AR. Advances & challenges in leptospiral vaccine development. *Indian J Med Res* 2018; 147: 15–22.
8. Beaudu-Lange C, Lange E. Unusual clinical presentation of leptospirosis in a cat. *Revue veterinaire clinique* 2014; 49: 115–22.
9. Bedernjak J. Leptospirose pri nas in v svetu. Murska Sobota: Pomurska Založba: 1993: 9–42.

10. Bedernjak J. Zdravljenje leptospiroz. Med Razgl 1995; 34: 529–34.
11. Bharti AR, Nally JE, Ricardi NJ, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Inf Dis, 2003; 3: 757–71.
12. Birtles R in: Gavier-Widén D, Duff JP, Meredith A, eds. Infectious deseases of Wild mammals and birds in Europe. Oxford: Blackwell Publishing, 2012: 402–8..
13. Blanchard G, Marsot M, Bourassin R, Paragon BM, Benet JJ, Linsart A. Characterisation of the French ferret population, husbandry, reported medical care and feeding habits. J Nutri Sci 2018; 7: e4 (1-7) doi:10.1017/jns.2017.51.
14. Brennand K. Ferrets – curious critters. Veterinary Nursing 2011; 26 (12): 451–53.
<https://doi.org/10.1111/j.2045-0648.2011.00124.x>
15. Carver-Carpenter BA. Exotics corner: the ferret. Veterinary Nursing 2004; 19 (3): 88.
<https://doi.org/10.1080/17415349.2004.11013258>
16. Casanovas-Massana A, Pedra GG, Wunder EA, Diggle PJ, Begon M, Koa AI. Quantification of Leptospira interrogans survival in soil and water microcosms. Appl Environ Microbiol 2018; 84 (13): e00507–18. doi: 10.1128/AEM.00507-18.
17. Chu KM, Rathinam R, Namperumalsamy P, Dean D. Identification of Leptospira species in the pathogenesis of uveitis and determination of clinical ocular characteristics in south India. J Infect Dis 1998; 177: 1314–21.
18. Chitty JR, Delaney Johnson CA. Ferret preventive care. In: Delaney - Johnson CA. Ferret medicine and surgery. Boca Raton: CRC Press, 2017: 85–93.
19. Desmecht M. Leptospirose bij in het wild levende dieren. Nationaal Instituut voor Diergeneeskundig Onderzoek. Activiteitenverslag, 1990-1991; 106-7.
20. De Silva NL, Niloofa MJR, Fernando N, et al. Changes in full blood count parameters in leptospirosis: a preospective study. Int Arch Med 2014; 7: e31 doi: 10.1186/1755-

- 7682-7-31.Dupouey J, Faucher B, Eduard S, et al. Human leptospirosis: an emerging risk in Europe? Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2014; 37: 77–83.
21. Dutta TK, Christopher M. Leptospirosis: an overview. J Assoc Physicians India 2005; 53: 545–51.
22. Faine S, Adler B, Bolin C, eds. *Leptospira and leptospirosis*. 2nd ed. Melbourne Vic Australia: MediSci: MedSci, 1999.
23. Fennestad KL, Borg-Petersen C. Leptospirosis in Danish wild mammals. J Wildl Dis 1972; 8: 343–51.
24. Fisher S, Mayer-Scholl A, Imholt C, et al. Leptospira Genomospecies and Sequence Type Prevalence in Small Mammal Populations in Germany. Vector Borne Zoonotic Dis 2018; 4: 188–99.
25. Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat. 3rd ed. St. Louis, Saunders Elsavier, 2006: 402–17.
26. Gustafson KD, Hawkins MG, Drazenovich TL, Church R, Brown SA, Ernest HB. Founder events, isolation, and inbreeding: Intercontinental genetic structure of the domestic ferret. Evolutionary Applications 2018; 11: 694–704.
27. Hartmann K, Egberink H, Pennisi MG et al. Leptospira species infection in cats, ABCD guidelines on prevention and management. J Feline Med Surg 2013; 15: 576–81.
28. Hartskeerl RA, Terpstra WJ. Leptospirosis in wild animals. Vet Q 1996; 18 (3): 149–50.
29. Higgins R. Emerging or re-emerging bacterial zoonotic diseases: Bartonellosis, leptospirosis, Lyme borreliosis, plague. Rev Sci Tech Off Int Epiz 2004; 23 (2): 569–81.

30. Hirsh DC, Zee YC. Veterinary Microbiology. Malden: Blackwell Science, 1999: 185–9.
31. Huber D, Dvornik-Gojsalić M, Artuković B, Beck A. Introduction of a new species, the ferret (*Mustela putorius furo*), in pathomorphological diagnostics - 7 years of Croatian experience. *Vet. arhiv* 2017; 87 (3): 317–31.
32. Johnson-Delaney CA. Ferret Nutrition. *Vet Clin Exot Anim* 2014; 17: 449–70.
33. Klaasen HL, Molkenboer MJ, Vrijenhoek MP, Kaashoek MJ. Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. *Vet Microbiol* 2003; 95 (1-2): 121–32.
34. Kruljc P. Kužne bolezni konj. Učbenik za študente veterinarske medicine. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2010: 114–21.
35. Larson CR, Dennis M, Nair RV. Isolation and characterization of *Leptospira interrogans* serovar Copenhaeni from a dog from Saint Kitts. *JMM Case Rep* 2017; 4 (10): e005120. doi: 10.1099/jmmcr.0.005120.
36. Levett PN. *Leptospira and leptospirosis*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaffer MA, et al, eds. *Manual of clinical microbiology*, 8th edn. Washington DC: ASM Press, 2003; 929–36.
37. Lewington JH. *Ferret Husbandry, Medicine and Surgery*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007; 90–91.
38. Lindtner R. Piščanci v diagnostiki leptospiroze. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1994: 9–35. Dizertacija.
39. Lindtner-Knific R, Vergles-Rataj A, Vlahović K, et al. Prevalence of antibodies against *Leptospira* sp. in snakes, lizards and turtles in Slovenia. *Acta Vet Scand* 2013, 55: e65. doi: 10.1186/1751-0147-55-65.

40. Lizer J, Veleneni S, Weber A, Krcic M, Meeus P. Evaluation of 3 serological tests for early detection of Leptospira-specific antibodies in experimentally infected dogs. *J Vet Intern Med* 2018; 32: 201–7.
41. Macdonald D. Velika enciklopedija: Sesalci. Ljubljana: Založba Mladinska knjiga, 1996: 108.
42. Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. Clinical veterinary microbiology. 2nd ed. Edinburgh: Mosby Elsevier, 2013: 381–8.
43. Meredith A. Ferret behaviour, housing and husbandry. In: Delaney - Johnson CA. Ferret medicine and surgery. Boca Raton: CRC Press, 2017: 31–64.
44. Meredith A, Redrobe S. BSAVA Manual of Exotic pets. 4th ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association, 2002: 93–9.
45. Mitchell MA, Tully Jr. TN. Manual of Exotic pet practice. St. Louis: Saunders Elsevier, 2009: 345–8.
46. Mohammed H, Cohen N, Hakim K, et al. Leptospira: morphology, classification and pathogenesis. *J Bacteriol Parasitol* 2011; 2 (6): e1000120. DOI: 10.4172/2155-9597.1000120.
47. Moinet M, Fournier-Chambrillon C, André-Fontaine G, et al. Leptospirosis in free-ranging endangered european mink (*Mustela lutreola*) and other small carnivores (Mustelidae, Viverridae) from southwestern France. *J Wildl Dis* 2010; 46 (4): 1141–51.
48. Mousavi MNS, Sadeghi J, Aghazadeh M, et al. Current advances in urban leptospirosis diagnosis. *Rev Med Microbiol* 2017; 28 (3): 119–23.
49. Musso D, La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. *J Microbiol Immunol Infect* 2013; 46: 245–52.

50. OIE terrestial manual. Leptospirosis. Paris: Office International Epizooties, 2014: 1-14
(dosegljivo na spletni strani:
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.12_LEPTO.pdf).
51. Pal E, Prelog I. Prikaz bolnikov z leptospiro, zdravljenih na oddelku za infekcijske bolezni in vročinska stanja Splošne bolnišnice Murska Sobota v letu 2002: pomen hemokultur pri njeni diagostiki. Zdrav Vestn 2003; 72: 275–7.
52. Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. Int J Infect Dis 2008; 12: 351–7.
53. Pasternak JF, De Vivo DC, Prensky AL. Steroid-responsive encephalomyelitis in childhood. Neurology 1980; 30 (5): 481–6.
54. Perše B, Perše M. Sodobna pravna ureditev in etična načela poskusov na živalih v EU. Zdrav Vestn 2016; 85: 354–66.
55. Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. Med Mal Infect 2013; 43: 1-9.
56. Pignon C, Mayer J. Zoonoses of ferrets, hedgehogs, and sugar gliders. Vet Clin North Am Exot Anim Pract 2011; 14 (3): 533–49.
57. Powers LV, Brown SA. Basic anatomy, physiology and husbandry. In: Quesenberry KE, Carpenter JW, eds. Ferrets, eabbits, and rodents: Clinical medicine and surgery. 3rd ed. St. Louis: Sounders Elsevier, 2012: 1-3..
58. Račnik J, Zadravec M. Preventivno cepljenje belega dihurja (*Mustela putorius furo*) proti virusu pasje kuge. V: Preventivna cepljenja v prihodnosti kot varna in učinkovita zaščita pred boleznimi, 12. Strokovno srečanje veterinarske zbornice, Laško, november 2013. Ljubljana: Veterinarska zbornica, 2013: 50–2.
59. Satbige AS, Patil NA. Diagnosis and Management of Leptospirosis in a dog. Intas Polivet 2018; 19 (1): 158–9.

60. Schuller S, Francey T, Hartmann K, et al. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. J Small Anim Pract 2015; 56: 159–79.
61. Sellon D, Long M. Equine infectious diseases, 2nd ed. St. Louis: Saunders Elsavier, 2014: 303–6.
62. Seznam zdravil za uporabo v veterinarski medicini, za katera je bilo izdano dovoljenje za promet. Uradni list RS 2014a; 24 (17): 12. (dosegljivo na spletni strani: <https://www.jazmp.si/fileadmin/datoteke/seznam/SRZV/26-4-2017.pdf>)
63. Seznam zdravil za uporabo v veterinarski medicini, za katera je bilo izdano dovoljenje za promet. Uradni list RS 2014b; 24 (17): 51–2. (dosegljivo na spletni strani: <https://www.jazmp.si/fileadmin/datoteke/seznam/SRZV/26-4-2017.pdf>)
64. Seznam zdravil za uporabo v veterinarski medicini, za katera je bilo izdano dovoljenje za promet. Uradni list RS 2014c; 24 (17): 90. (dosegljivo na spletni strani: <https://www.jazmp.si/fileadmin/datoteke/seznam/SRZV/26-4-2017.pdf>)
65. Seznam zdravil za uporabo v veterinarski medicini, za katera je bilo izdano dovoljenje za promet. Uradni list RS 2014d; 24 (17): 125. (dosegljivo na spletni strani: <https://www.jazmp.si/fileadmin/datoteke/seznam/SRZV/26-4-2017.pdf>)
66. Silva EF, Santos CS, Athanazio DA, et al. Characterization of virulence of Leptospira isolates in a hamster model. Vaccine 2008; 26: 3892–6.
67. Slavica A, Cvetnić Ž, Konjević D, et al. Detection of Leptospira spp. serovars in wild boar (*Sus scrofa*) from continental Croatia. Vet Arh 2010; 80 (2): 247–57.
68. Slavica A, Cvetnić Ž, Milas Z, et al. Incidence of leptospiral antibodies in different game species over a 10-year period (1996–2005) in Croatia. Eur J Wildl Res 2008; 54 (2): 305–11. DOI 10.1007/s10344-007-0150-y.
69. Van de Maele I, Claus A, Haesebrouck F, et al. Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. Vet Rec 2008; 163: 409–13.

70. Vengust G, Lindtner-Knific R, Zele D et al. Leptospira antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) in Slovenia. Eur J Wildl Res 2008; 54: 749–752.
71. Witmer GW, Martins H, Flor L. Leptospirosis in the Azores: the rodent connection. Proceedings of the 21st Vertebrate Pest Conference. Visalia: National wildlife Research Center, 2004: 217–20.
72. Woodward MJ, Swallow C, Kitching A et al. Leptospira hardjo serodiagnosis: a comparison of MAT, ELISA and Immunocomb. Vet Rec 1997; 141: 603–4.
73. World Health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneve: WHO, 2013: 1–83 (Dosegljivo na spletni strani: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42667/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf;jsessionid=0A120619206847873E9762255E12ABFE?sequence=1).

9. PRILOGE

Priloga 1: Kopija prispevka Serološka diagnostika leptospiroznih okužb pri belem dihurju na 7. Veterinarskem kongresu 2019;

ROSA, Teja, RAČNIK, Joško, MLAKAR, Nina e tal. Serološka diagnostika leptospiroznih okužb pri belem dihurju = Serological diagnosis of leptospirosis infections in domestic ferrets. In: MAJDIČ, Gregor ed. [7th Slovenian Veterinary Congress = 7. Slovenski veterinarski kongres : Portorož, Slovenia, 3 – 6 April 2019], 7. slovenski veterinarski kongres, Portorož, 3 – 6 April, 2019, (Slovenian veterinary research, ISSN 1580-4003, Vol. 56, suppl. 23, 2019). Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2019: 233–4.

Serološka diagnostika leptospiroznih okužb pri belem dihurju

Teja Rosa¹, Jožko Račnik ^{2*}, Nina Mlakar Hrženjak², Maja Čonč³, Marko Zadravec², Zoran Žlabravec² in Renata Lindtner Knific²

¹ Študentka Veterinarske fakultete, Gerbičeva 60 Ljubljana

² Inštitut za zdravstveno varstvo perutnine, ptic, malih sesalcev in plazilcev, Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60 Ljubljana,

³ Zverinice – društvo ljubiteljev belih dihurjev, Cesta na Brdo 85 Ljubljana

* josko.racnik@vf.uni-lj.si

Leptosiroza je zootroza in jo povzroča bakterija iz rodu *Leptospira* spp. Okužba z leptosiro je bila opisana pri sorodnih vrstah belega dihurja iz družine kun (Mustelidae), o okužbi pri belem dihurju pa je zelo malo podatkov. Želeli smo preveriti, kakšna je prevalenca protiteles proti leptosipri pri dihurjih ter kateri dejavniki predstavljajo tveganje za okužbo.

V študijo smo vključili 121 belih dihurjev, ki smo jih sprejeli na Kliniki za ptice, male sesalce in plazilce, VF. Za serološko diagnostiko leptospiroznih okužb smo uporabili test mikroskopske aglutinacije. Za testiranje smo uporabili žive kulture dvanajstih serovarov, ki se najpogosteje pojavljajo pri živalih v Sloveniji. Test je bil pozitiven, kadar je bilo zlepiljenih ali liziranih več kot 50 % leptosipir. Pozitivne vzorce smo naprej titrirali ter določili višino titra protiteles. Epidemiološke podatke smo zbirali s pomočjo ankete, ki so jo izpolnili lastniki.

Izmed 121 pregledanih dihurjev jih je 23 (19,0 %) reagiralo pozitivno in sicer na serovare Pomona (n=2), Icterohaemorrhagie (n=10), Canicola (n=5), Australis (n=6), Sejore (n=1), Bataviae (n=4), Saxkoebing (n=3), Hardjo (n=1) in Bratislava (n=1). Večina pregledanih dihurjev je bila pozitivna na eden serovar (17/23), na dva serovara so bili pozitivni štirje dihurji in na štiri serovare dva dihurja.

Z raziskavo smo ugotovili, da beli dihurji v Sloveniji prihajajo v stik z leptosiprami. Okuženi so z različnimi serovari med katerimi je najpogostejši Icterohaemorrhagie. Na podlagi epidemioloških podatkov nismo mogli dognati, kateri dejavniki predstavljajo večje tveganje za okužbo.

Ključne besede: leptosiroza; leptospira; beli dihur; zootroza.

Serological diagnosis of leptospirosis infections in domestic ferrets

Leptospirosis is zoonosis caused by a bacterium from the *Leptospira* spp. genus. The infection has been described in species related to ferrets from family Mustelidae, however, very little is known about this infection in domestic ferrets. The aim of the study was to determine the incidence of antibodies against *Leptospira* in ferrets and to investigate the risk factors for infection.

The study includes 121 ferrets admitted to the Clinic for Birds, Small Mammals and Reptiles. The microscopic agglutination test was used for the serological diagnosis. Living cultures of twelve serovars most commonly found in animals in Slovenia were used for testing. The positive reaction was evaluated as at least 50% agglutination or lysis and the titration of positive samples was performed. The epidemiologic data was provided by the owners.

Out of 121 examined ferrets, 23 (19,0 %) had antibodies against *Leptospira*. Positive serovars were Pomona (n=2), Icterohaemorrhagie (n=10), Canicola (n=5), Australis (n=6), Sejore (n=1), Bataviae (n=4), Saxkoebing (n=3), Hardjo (n=1) and Bratislava (n=1). Most of the ferrets were positive to one (17/23), some were positive for two (4/23) and 2 out of 23 ferrets were positive for four serovars. The results show that ferrets in Slovenia are in contact with *Leptospira*. They can be infected with different leptospiral serovars, however antibodies against *L.*

icterohaemorrhagie were most commonly detected. The source of infection remains unknown since epidemiologic data provided no additional information.

Key words: eptospirosis; Leptospira; domestic ferret; zoonosis.

