



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ**  
**ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**  
Департман за ветеринарску медицину



**Милош Лазовић**

**СЕРОПРЕВАЛЕНЦИЈА ЛЕПТОСПИРОЗЕ  
КОД КОЊА НА ПОДРУЧЈУ ВОЈВОДИНЕ**

**Дипломски рад**

**Нови Сад, 2024.**



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ**  
**ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**  
Департман за ветеринарску медицину



**Кандидат:**  
**Милош Лазовић**

**Ментор:**  
**др Александар Поткоњак,**  
**редовни професор**

# **СЕРОПРЕВАЛЕНЦИЈА ЛЕПТОСПИРОЗЕ КОД КОЊА НА ПОДРУЧЈУ ВОЈВОДИНЕ**

**Дипломски рад**

**Нови Сад, 2024.**

# КОМИСИЈА ЗА ОЦЕНУ И ОДБРАНУ ДИПЛОМСКОГ РАДА

---

**Др Александар Поткоњак, редовни професор, ментор**

*за ужу научну област Ветеринарска микробиологија и заразне болести  
животиња*

**Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду**

*Департаман за ветеринарску медицину*

---

**Др Вук Врачар, доцент, председник комисије**

*за ужу научну област Ветеринарска микробиологија и заразне болести  
животиња*

**Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду**

*Департаман за ветеринарску медицину*

---

**Др Сара Савић, научни саветник, трећи члан комисије**

*за ужу научну област Биотехничке науке – ветеринарство*

**Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“, Нови Сад**

## **КРАТАК САДРЖАЈ**

Лептоспироза је контагиозна бактеријска болест различитих домаћих и дивљих животиња, као и људи. Представља веома распрострањену болест у свету и спада у најважније болести на листи Светске организације за здравље животиња (енг. World Organisation for Animal Health – WOAH, OIE). Дивљи глодари су најважнији извори инфекције у природи. Путем урина долази до контаминације воде, хране и земљишта. Код коња болест најчешће протиче супклинички. У акутном току долази до анорексије, летаргије, пролазне грознице, па потом се појављују петехијална крварења и жутица на слузницама, као и репродуктивни поремећаји. У хроничном току за ову болест врло је карактеристична појава рекурентног увеитиса. Дијагностика лептоспирозе заснива се на анамнестичким и епизоотиолошким подацима, клиничком прегледу животиње са регистравањем клиничких знакова и/или симптома болести и примени лабораторијских метода (најчешће се користи микроскопски аглутинациони тест – МАТ за серолошку дијагностику). Терапија се своди како на лечење оболелог коња, тако и на сузбијање клицоноштва. Користе се антимикуробни лекови уз потпорну и симптоматску терапију.

Циљ и задатак истраживања је да се утврди вредност серопреваленције лептоспирозе код коња на подручју Војводине.

У ово истраживање је био укључен 61 коњ са подручја Војводине. Од ових коња применом асептичне венепункције узети су појединачни узорци пуне венске крви у вакутајнере са активатором коагулације. Узорци су узети у оквиру спровођења програма мера или редовне ветеринарске делатности у оквиру здравствене заштите коња. Од метода истраживања примењени су епизоотиолошки упитник и лабораторијска серолошка референтна дијагностика – микроскопски

аглутинациони тест (према ОИЕ приручнику за дијагностику). Од укупно 61 узорка два су дала позитивни резултат серолошког теста. Код првог позитивног узорка доказана су антитела против *L. icterohaemorrhagiae*, а код другог позитивног узорка антитела против *L. grippotyphosa* са граничним титром антитела од 1:100. Утврђена серопреваленција лептоспирозе код коња на подручју Војводине износила је 3,28%.

**Кључне речи:** лептоспироза, коњи, серопреваленција, микроскопски аглутинациони тест

## ABSTRACT

Leptospirosis is a bacterial infectious disease of various domestic and wild animals, as well as humans. It is very widespread and on the World Organization for Animal Health (WOAH, OIE) list of the most significant diseases. Wild rodents are the most important source of this disease in nature. Their urine leads to contamination of water, soil and food. In horses, the disease most often originates subclinically. In the acute form, the disease manifests itself through anorexia, lethargy, transient fever, then petechiae and icterus on the mucous membranes and reproductive disorders. In the chronic disease progression, recurrent uveitis is very characteristic. Diagnostics of leptospirosis is based on anamnestic and epizootiological data, clinical examination of the animal with the registration of clinical signs and/or symptoms of the disease and application of laboratory methods (for serology diagnostics the most frequently used test is microagglutination test – MAT). The therapy includes both the treatment of the sick horse and the suppression of the carrier. The therapy uses antimicrobial medicines along with supportive and symptomatic therapy.

The aim and the task of this research is to determine the seroprevalence value of leptospirosis in horses in the area of Vojvodina.

This research includes 61 horses from the area of Vojvodina. Samples of whole venous blood were collected from each horse by aseptic venipuncture in vacutainers with coagulation activators. The samples were taken as part of the implementation of a program of measures or regular veterinary practices within the horse health care. Among the research methods, epizootiological questionnaire and laboratory serological referential diagnostics – microagglutination test (according to OIE Manual of Diagnostic) were applied. Out of a total of 61 samples, two gave positive serological test results. Antibodies against *L. icterohaemorrhagiae* were proven in the first positive sample, and

antibodies against *L. grippotyphosa* in the second positive sample whose cut-off antibody titer is 1:100. The determined seroprevalence of leptospirosis in horses in the area of Vojvodina was 3,28%

**Key words:** leptospirosis, horses, seroprevalence, microagglutination test

**САДРЖАЈ:**

1.0.	УВОД.....	1
2.0.	ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	5
2.1.	ЕТИОЛОГИЈА.....	5
2.2.	ЕПИЗООТИОЛОГИЈА.....	9
2.3.	ПАТОГЕНЕЗА.....	11
2.4.	КЛИНИЧКА СЛИКА.....	14
2.5.	ПАТОМОРФОЛОШКИ НАЛАЗ.....	16
2.6.	ПАТОХИСТОЛОШКИ НАЛАЗ.....	16
2.7.	ДИЈАГНОЗА.....	17
2.7.1.	Директне методе детекције.....	19
2.7.2.	Изолација и идентификација узрочника.....	21
2.7.3.	Серолошки тестови.....	23
2.7.4.	Молекуларни тестови.....	25
2.8.	ДИФЕРЕНЦИЈАЛНА ДИЈАГНОЗА.....	27
2.9.	ТЕРАПИЈА.....	28
2.10.	ПРОФИЛАКСА.....	30
2.11.	ЗНАЧАЈ ЗА ЈАВНО ЗДРАВЉЕ.....	32
3.0.	ЦИЉ И ЗАДАТАК ИСТРАЖИВАЊА.....	34
4.0.	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	35
4.1.	МАТЕРИЈАЛ.....	35
4.2.	МЕТОДЕ.....	36
4.2.1.	Епизоотиолошки упитник.....	36
4.2.2.	Микроскопски аглутинациони тест (МАТ).....	36
4.2.3.	Лабораторијски прибор и апарати за извођење МАТ.....	37
4.2.4.	Реагенси и контроле за извођење МАТ.....	37
4.2.5.	Извођење МАТ.....	38
4.3.	СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА ПОДАТАКА.....	43
5.0.	РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА.....	44
5.1.	РЕЗУЛТАТИ ЕПИЗООТИОЛОШКОГ УПИТНИКА.....	44
5.2.	РЕЗУЛТАТИ МИКРОСКОПСКОГ АГЛУТИНАЦИОНОГ ТЕСТА.....	49
6.0.	ДИСКУСИЈА.....	51
7.0.	ЗАКЉУЧАК.....	61
8.0.	ЛИТЕРАТУРА.....	63



## 1.0. УВОД

Лептоспироза је контагиозна бактеријска болест која се јавља код многих врста домаћих и дивљих животиња, као и код људи. Обољење је присутно широм света. Узрочници болести су бактерије из рода *Leptospira*, из породице *Leptospiraceae*, из реда *Leptospirales*. Лептоспире су врло хетерогени спирални покретни микроорганизми. Постоји преко 300 серотипова, организованих унутар 30 серолошких група. Ова зоозноза је присутна у природи, узрочници релативно дуго преживљавају у влажној средини, па тако у мокром тлу и води могу да опстану недељама и месецима, а њихова одрживост у природи уско је повезана са трајним или повременим насељавањем проксималних бубрежних каналића домаћих и дивљих животиња, када долази до излучивања лептоспира путем мокраће. Лептоспире се најчешће одржавају у популацији малих дивљих животиња, првенствено малих глодара.

Резервоари болести су животиње које након инфекције ретко оболе, често постају клицоноше и од њих зависи опстанак узрочника у природи, а најзначајнији резервоари су мали глодари. Случајни домаћини су животиње и људи, који након инфекције испољавају клиничку слику, а када преболе инфекцију, путем урина одређено време излучују узрочника. Еволуцијски домаћини су оне врсте животиња код којих је дошло до одређеног међусобног прилагођавања између домаћина и одређеног серотипа лептоспира. Код еволуцијских домаћина инфекција је најчешће латентна или долази до благог облика болести. Сматра се да су говеда еволуцијски домаћини за серотипове *L. hardjo* и *L. pomona*, пси за серотип *L. canicola*, а копитари за серотип *L. bratislava*.

Након директног или индиректног контакта са урином или ткивима инфицираних животиња може доћи до инфекције људи и животиња. Урином контаминирана вода и храна од стране резервоара инфекције, представља секундарни извор заразе, а пријемчиви домаћини се најчешће инфицирају алиментарно. Ризик од инфекције људи и животиња је у директној вези са бројношћу популације резервоара, што је нарочито изражено на фармама и ергелама где се не спроводе мере дератизације или током година када долази до вишеструког повећања популације малих глодара.

Лептоспироза може имати различите клиничке облике болести, од инапаратне инфекције до најтежег клиничког облика, плућне хеморагије с леталним исходом. Клиничко испољавање лептоспирозе зависи од пријемчивости инфициране врсте, од њеног имунолошког статуса, инфективне дозе и вируленције серотипа или соја који је узроковао болест. Просечно време инкубације је од 5 до 15 дана. Инапаратни и благи клинички облици чести су код домаћих животиња и људи, али најчешће су везани уз инфекцију серотипом на који се одређена животињска врста еволуцијски прилагодила. Болест код коња, нарочито у ензоотским подручјима, најчешће пролази без видљивих клиничких симптома. У акутноом току лептоспирозе долази до појаве депресије, инапетенције, повишене телесне температуре, мишићне слабости, петехијалних крварења и жутице. Хронични ток лептоспирозе се манифестује појавом рекурентног увеитиса познатог под називом периодична панофталмија. Код гравидних кобила долази до побачаја услед инфекције постелице и последичног имунолошког одговора праћеног појавом васкулитиса, едема, тромбозе и некрозе ткива. До побачаја најчешће долази у одмаклој бременитости, кад је значајно нарушена функција постелице, а понекад долази до ждребљења слабо виталне или мртве ждребади.

Дијагноза се поставља на основу анамнезе, епизоотиолошких података, клиничке слике и лабораторијских испитивања. Из анамнезе треба сазнати да ли је животиња боравила у природи или средини која може бити контаминирана урином малих глодара, да ли је имала контакт са површинским водама, као и да ли се спроводе мере дератизације. Клиничких симптома попут повишене телесне температуре, појаве жутице, побачаја и рекурентног увеитиса најчешће упућују на лептоспирозу.

Лабораторијске методе дијагностике лептоспирозе могу се поделити на директне (микробиолошке и молекуларне методе, којима је циљ доказивање присуства узрочника или његовог генома у биолошком материјалу) и индиректне (серолошке методе којима се у крвном серуму доказују специфична антитела против лептоспира). Изолација и идентификација узрочника је захтеван и дуготрајан процес, молекуларне методе су скупе и нису широко доступне, па се у већини случајева лептоспироза дијагностикује серолошким методама, од којих је микроскопски аглутинациони тест стандардни и референтни тест за дијагностику лептоспирозе.

У крви лептоспире се могу доказати најкасније 7-10 дана од почетка болести. У урину се могу доказати тако што се прикупи средњи млаз у стерилне просуде и што пре достави у лабораторију, будући да у мокраћи лептоспире брзо пропадају. Узорке треба узети пре почетка антимикуробне терапије. Након периода од 7 до 10 дана, лептоспироза се може потврдити доказивањем антитела у крвном серуму. У почетку болести, понекад нема довољне количне антитела у серуму, па да би се доказала акутна инфекција потребно је да прође 14 дана када треба узети други узорак крвног серума ради компарације титара специфичних антитела (парни серуми). Када је низак титар антитела у оба крвна серума то је најчешће последица раније прележане болести. Четвороструки или већи пораст титра специфичних антитела, између првог и другог крвног серума је доказ акутне инфекције. У сврху дијагностиковања лептоспирозе након угинућа може се узети крв и/или паренхиматозни органи, ако је угинуће наступило у периоду септикемије, а бубрези ако је болест трајала дуже од 7 дана.

Диференцијално дијагностички треба обухватити болести које се манифестују појавом грознице и жутице, грознице и отежаног дисања и грознице и абортуса. На пример треба искључити бабезиозу, инфективну анемију копитара, херпесвирусне инфекције копитара, инфлуенцу коња, пнеумоније различите етиологије, туморе, плеуритисе и стања која доводе до дисеминоване интраваскуларне коагулације.

Терапија се спроводи применом антимикуробних лекова, најчешће пеницилина или стрептомицина. Они се користе у терапији акутне лептоспирозе и за елиминисање лептоспирурије код хронично инфицираних коња. Будући да коњи са клиничком лептоспирозом имају азотемију, битно је обратити пажњу на нефротоксичност лекова. Потпорна терапија прати антимикуробну терапију, и заснива се на надокнади течности и електролита путем инфузионих раствора, уз поштеду од физичких активности, током неколико недеља.

Претходна серолошка испитивања лептоспирозе коња у периоду од 2010. до 2018. године на подручју Војводине показују да од прикупљених 1130 крвних серума број серопозитивних коња је био 18 (1,59%) [1].

На основу наведеног, као предмет истраживања дефинисано је да је, након пет година од претходних истраживања, потребно утврдити тренутну вредност серопреваленције лептоспирозе код коња на подручју Војводине.

## 2.0. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

### 2.1. ЕТИОЛОГИЈА

Лептоспироза је контагиозна бактеријска болест домаћих и дивљих животиња, као и људи [2]. Према међународној организацији за номенклатуру прокариота (International Code of Nomenclature of Prokaryotes – ICNP), узрочник болести је сврстан у род *Leptospira*, у фамилију *Leptospiraceae*, у ред *Leptospirales*, у класу *Spirochaetia*, у раздео *Spirochaetota* [3].

Ехренберг је 1838. године први употребио назив „спирохете“ да опише дугачак, флексибилан и покретљив микроорганизам, када је описивао изоловане бактерије из рода *Leptospira*. Први је болест код паса 1852. године описао Хофер и то под називом „псећа тифоидна грозница“. Клетин је 1898. године направио опсежну студију, не знајући за Хоферово запажање, на псима током изложбе у Немачком граду Штутгарту и болест назвао „Штутгартска болест“ [3]. Код људи је први описао болест Адолф Вејл, код пацијената који су испољавали клиничке симптоме жутице и нефритиса, па је болест по њему касније названа и „Вејлова болест“ [4].

Стимсон је 1907. године прегледом бубрежних каналића од пацијента умрлог током епидемије жуте грознице из Њу Орлеанса назвао овај микроорганизам *Spiroheta interrogans*, указујући на специфичан крај бактерије у облику куке, који га је подсетио на знак питања [3,5].

Први пут су 1914. године у Јапану Инада и Идо изоловали узрочника лептоспирозе [4]. Идо и колеге су предложили да је *Rattus norvegicus* природни резервоар *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*. Ногучи је 1917. представио резултате поређења сојева *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* и *Spirochaeta biflexa* изолованих из различитих географских области. Он је дошао до закључка да су у питању исти микроорганизми, па је 1918. године спирохета добила име *Leptospira icterohaemorrhagiae* [3].

У наредним годинама серолошким методама утврђено је постојање више различитих сојева лептоспира изолованих од пацијената оболелих од Вејлове болести. Нови сојеви су најпре били означени као врсте, на пример *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira canicola* и *Leptospira biflexa* [3].

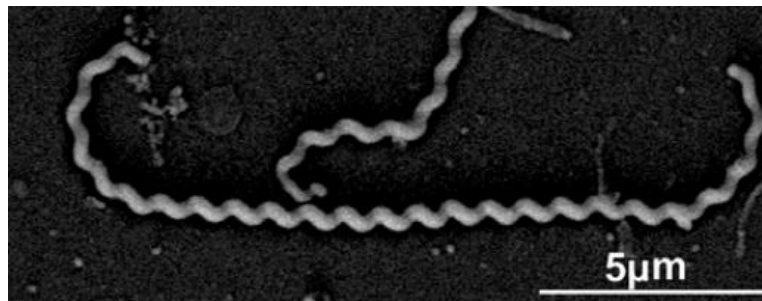
Први извештај о лептоспирози код коња био је 1947. године у Русији. Код коња је болест најчешће била повезана са абортусом и рекурентним увеитисом [5].

Услед развијања микроаглутинационог теста као методе дијагностике, постало је јасно да су у питању различити серотипови. У Монтреалу 1962. године Поткомитет за таксономију лептоспира препоручио је поделу на две врсте, *Leptospira interrogans* (у који спадају патогени сојеви) и *Leptospira biflexa* (у који спадају сапрофитни сојеви) [3].

Лептоспире су Грам-негативне покретне спиралне бактерије дијаметра 0,1-0,3  $\mu\text{m}$  и дужине 6-20  $\mu\text{m}$  [2,5]. Имају спиралну морфологију, личе на калем намотан у правцу казаљке на сату. Поседују две периплазматске флагеле које пролазе кроз се централни део ћелије, што им олакшава покретљивост [6]. Електронском микроскопијом је откривен флаБ мутант који је непокретан [2].

Лептоспире имају двоструку мембрану, унутрашња мембрана је цитоплазматска мембрана која је уско повезана са пептидогликанским ћелијском зидом и спољашњу мембрану која је богата протеинима и липополисахаридом (ЛПС) који је главни антиген [2,3,7]. Липополисахарид је структурално и имунолошки сличан ЛПС код других Грам-негативних бактерија, само што је релативно нетоксичан за ћелије [2,5]. Он у инфицираном организму доводи до продукције аглутинина, односно анти-ЛПС антитела [6].

У периплазматском простору налази се ћелијски зид изграђен од пептидогликана [3]. Осим по Граму, могу да се боје и по Гимзи, као и да се врши импрегнација сребром [6].



Слика 1. Приказ бактерије из рода *Leptospira* под електронским микроскопом [3]

Пошто су прокариоте, немају јасно издиференцирано једро, али за разлику од већине других врста бактерија, лептоспире имају 2 циркулишућа хромозома [8]. Лептоспире немају капсулу и не продукују споре [6]. Необојене спирохете могу да се виде само под тамним пољем микроскопа и када се примени фазно-контрастни микроскоп [5,6]. Микроскопијом у тамном пољу патогене и сапрофитне лептоспире се не могу морфолошки разликовати [3].

Лептоспире синтетишу ензиме као што су хијалуронидаза, оксидаза, каталаза, трансaminaза и липаза, који заправо доводе до оштећења на разним ткивима. Поједини серотипови имају способност лизе еритроцита, посредством хемолизина [2,4].

Осетљиве су на сунчево светло, исушивање и ниску вредност рН. Инактивација на температури од 45-55°C обави се за 10 до 60 минута, а на температури од 60°C за 10 секунди. На температури од 4°C могу да опстану месецима. У води, поготово у стајаћим водама могу да преживе недељама, док урину 6-7 дана, у млеку 8-24 сата, а у лешевима 2-3 дана [4].

Што се тиче културелних особина, лептоспире су облигатни аероби, са оптималним растом на специјалним подлогама на температури од 28-30°C [2,4,5,7].

За изолацију су се раније користиле течне подлоге које садрже серум или албумин, као што су Картхоф, Флечер и Ногучи медијум [6]. Данас се најчешће користи ЕМЈХ подлога (енг. Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris medium), која садржи говеђи серум албумин, Tween 80, олеинску киселину и друге компоненте. За спречавање раста других бактерија у подлогу се додају антимикробне супстанце, као што су 5-флуороурацил, гентамицин и рифампицин [6,8]. Потребно је засејане подлоге у примарној изолацији инкубисати и посматрати до 13 недеља [6].

Класификација у оквиру рода *Leptospira* је сложена и подвргнута је више пута ревизији. Користе се 2 система за класификацију лептоспира, и то традиционални фенотипски систем класификације заснован на серотипозацији и генотипски систем класификације заснован на компарацији нукленске киселине, односно дволанчане дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) [5,7].

У серолошком систему класификације, подела је извршена на две врсте, патогена врста *Leptospira interrogans* и сапрофитска, непатогена врста *Leptospira biflexa*. Унутар сваке врсте постоје серотипови који су организовани унутар серогрупа, на основу њихове заједничке антигенске сличности [5,9]. *Leptospira interrogans* садржи више од 300 серотипова унутар 30 серолошких група [3,7,10,11], а *Leptospira biflexa* садржи преко 60 серотипова [3,5].

Унутар генотипског система класификације, дефинисан је велик број врста лептоспира. Последњих година дошло је до све већег броја успешних изолација бактерија из рода *Leptospira* из животне средине. Молекуларним методама анализе открива се њихов геном, што је доводи до препознавања нових врста у оквиру рода *Leptospira*. Ова два система класификације се међусобно не подударују. На пример серолошки сличне лептоспире припадају различитим геномоспециесима или патогени и непатогени изолати могу да се сврстају у исте геномоспециесе. Генотипски систем класификације је таксономски тачан, али многе лабораторије и даље користе серолошку класификацију лептоспира. Поред тога, у већини до сада објављене литературе, везане за лептоспирозу, користи се класичан серолошки систем класификације [5]. Најновија истраживања потврђују постојање 68 врста у оквиру рода *Leptospira* [3].



## 2.2. ЕПИЗООТИОЛОГИЈА

Лептоспироза у природи опстаје у такозваним домаћинима за одржавање или резервоарима инфекције [3,10]. Они служе као извор инфекције за друге домаће и дивље животиње, као и за људе. Одређени серотипови лептоспира показују одређену специфичност ка одређеним врстама животиња које користе као домаћине за одржавање. Иако је резервоар инфекције врло подложен развоју инфекције, болест код њега углавном протиче супклинички или ако дође до испољавање клиничких симптома они су благи. Код оваквих домаћина услед перзистенције лептоспира у уринарном тракту долази до излучивања лептоспира путем урина дужи временски период због хроничне инфекције бубрежних тубула [5,12]. Најчешће се одржавају у популацијама дивљих ситних животиња, првенствено дивљих глодара, односно мишева и пацова [2,4,9,13,14]. Дивљи мишолики глодари су основни извор инфекције [2,4], мада не треба занемарити значај инфекције и код домаћих животиња, поготово са аспекта ширења болести на друге животиње на домаћинству, као и на људе [4].

Лептоспирурија је примарни пут и начин контаминације животне средине [15], односно површинских вода, хране и воде за пиће, земљишта и простирке [3,5]. Сматра се да код пацова и мишева лептоспирурија може трајати доживотно, док код на пример говеда траје око 120 дана, код коња око 210 дана, а код паса чак до 700 дана [4]. Величина популације дивљих глодара битно утиче на степен контаминације животне средине, па тако у годинама када долази до наглог повећања популације дивљих глодара (такозване „мишије године“) долази до повећане инциденције лептоспирозе код животиња и људи [15].

Случајни домаћини обично имају мању подложност развоју хроничне инфекције и код њих је већа вероватноћа да ће се развити тешки акутни ток болести. Случајни домаћини излучују лептоспире у релативно краћем временском периоду, што их чини мање ефикасним клицоношама лептоспирозе. За већину серотипова коњи се сматрају за случајне домаћине [5].

Код коња најчешће изоловани серотипови су *L. pomona*, *L. hardjo*, *L. icterohaemorrhagiae* и *L. bratislava* [13,16].

Код одређених животињских врста дошло је до прилагођавања између домаћина и одређеног серотипа, па се такви домаћини називају еволуцијски домаћини [12]. Сматра се да су копитари еволуцијски домаћини за серотип *L. bratislava* [3,11,12], говеда за серотип *L. hardjo* и *L. pomona* [12], пси за серотип *L. canicola*, свиње за серотип *L. pomona*, а пацови за серотип *L. icterohaemorrhagiae* [3]. Код потпуно здраве ждребади из бубрега је успешно изолован серотип *L. bratislava*. У популацији коња, према серолошким истраживањима, лептоспироза је често присутна, мада инфекције углавном протичу супклинички [9].

Случајни домаћини и резервоари инфекције излучују спирохете урином, млеком, исцедком из материце, преко побачених фетуса и ткива плаценте. Путем директног контакта са инфицираним течностима и ткивима или индиректно путем контаминиране хране, воде, земљишта и простирке долази до преноса инфекције на друге случајне домаћине или домаћине за одржавање. Поред тога, документован је венерични и трансплацентални пренос инфекције, али су подаци врло ограничени што се тиче присуства лептоспира у сперми пастува [5]. Што се тиче инфекције за време гравидитета, могућ је продор лептоспира кроз хемоплаценталну баријеру, што резултује повађањем, побачајем, ждребљењем мртвих или слабо виталних ждребади [17].

Када доспеју у спољашњу средину, лептоспире могу да преживе неколико недеља у повољним условима. Релативно топла, влажна средина, као што су на пример стајаће воде, доводи до дужег опстанка у спољашњој средини [5,13]. Лептоспирама погодује неутрална или благо алкална вредност рН, а инхибира их кисела или алкална вредност рН већа од 8. Због тога могу да релативно кратко преживе у киселом урину. Што се тиче температуре околине најоптималнија им је температура од 10 до 25° С, а температура нижа од 10° С и виша од 34° С је непогодна за преживљавање летпоспира у спољашњој средини [5].

Лептоспироза се најчешће јавља у виду ензоотија, ретко у виду затворених епизоотија [12]. Типична је ланчаста зараза. Најчешће се јавља у областима са тропском и суптропском климом. У већини земаља света постоје ензоотска подручја, што зависи од географске локације, количине падавина и присуства клицоноша који дуготрајно путем урина излучују спирохете у спољашњу средину [4,9].

Поједина истраживања указују на то да спирохете могу преживети код инсеката или других бескичмењака, али је значај ових доказа још увек непознат [5]. Најчешће улазна врата инфекције код људи су оштећена кожа или слузокожа. Према епидемиолошким подацима у Војводини најчешће обољевају мушкарци који су професионално изложени попут риболоваца. Када се погледа временска дистрибуција, лептоспироза код људи у Војводини се најчешће региструје у касно лето и рану јесен [1]. Раније се сматрало да не постоји пренос инфекције између људи, али се данас зна да је могућ трансплацентални пренос, путем млека са мајке на бебу, путем полног односа и преко директног контакта са урином инфицираног пацијента [15]. Лептоспироза код људи се најчешће јавља код ветеринара, сточара, риболоваца, земљорадника и радника у млекарској индустрији, као последица професионалне изложености инфицираним домаћим и дивљим животињама, посебно мишоликим глодарима [9,15].

### 2.3. ПАТОГЕНЕЗА

Инфекција најчешће настаје при испашаи коња када долази до уношења влажне вегетације или воде која је контаминирана урином инфицираних јединки [7]. Потом долази до пенетрације лептоспира преко слузница. Инфекција може настати и преко ситних лезија на кожи, попут посекотина или удисањем спирохета [2,5]. Као и код других заразних болести, да ли ће доћи до развоја обољења зависи од дозе, вируленције узрочника и осетљивости домаћина [5,18]. Након уласка у циркулацију долази до њихове хематогене дисеминације до разних органских система [4]. Бактеријемиа се обично јавља 4 до 10 дана од излагања узрочнику [18], и она траје око 7 дана, када долази до преласка лептоспира у ткива [2,6].

Нема тропизма ка одређеним ткивима, већ долази до размножавања спирохета у многим паренхиматозним органима као што су јетра, слезина и бубрези, као и у централном нервном систему, оку и млечној жлезди [5]. Јављају се оштећења ткива различитог степена [4]. Тачни механизми којима лептоспире доводе до оштећења ткива нису у потпуности разјашњени [2,6,18,19]. Пошто нема доказа о класичном лучењу токсина [2], мада поједини вирулентни сојеви могу да луче цитотоксичне протеине и хемолизин који је одговоран за распадање еритроцита што доводи до појаве хемоглобинурије [6,18]. Услед оштећења ендотела капилара долази до развоја системског васкулитиса [5], што доводи до исхемије ткива и као последица долази до исхемичне некрозе како у бубрежним каналићама тако и у другим ткивима [2,6]. Нарушавање интегритета васкуларног ендотела омогућава опсежнију миграцију спирохета широм организма. Пенетрацију олакшавају аксијалне флагеле спирохета и лучење ензима као што су хијалуронидаза, што је врло важно за продор у око и централни нервни систем [5].

Сматра се да је врло важан хуморални имуни одговор за контролу инфекције [5]. Појавом неутрализационих антитела која су усмерена против узрочника долази до повлачања лептоспира из крви. Тада првенствено долази до колонизације епитела бубрежних тубула [6], када прелазе из капилара интерстицијума до тубула, па између тубулоцита у лумен тубула, где долази до везивања за микровиле тубулоцита. Оне перзистирају унутар фагозома епитела проксималних и дисталних изувијаних каналића бубрега [20] где су лептоспире заштићене од имунског одговора домаћина. Услед развоја перзистентне инфекције, лептоспире могу да се излучују путем урина у спољашњу средину, што је посебно важно код мишоликих глодара [4,17,18]. Услед акутног оштећења бубрега долази до повећања гломеруларне филтрације здравих нефрона, како би се најпре компензовало стање, а у даљем току може доћи до олигурије и ретенционе уремије [4].

Код хроничне инфекције може доћи до развоја имунолошки посредованог гломерулонефритиса који је последица таложења антиген-антитело комплекса на базалној мембрани бубрежних гломерула [20,21]. У јетри долази до оштећења хепатоцита и ендотела синусиодних капилара када долази до развоја хроничног хепатитиса, а у каснијем току могућа је фиброза јетре [4].

Продором лептоспира преко хемоплаценталне баријере долази до локализације узрочника унутар фетуса [5], када долази до развоја плацентитиса и репродуктивних поремећаја [4].

Углавном имунитет који настаје је специфичан према серотипу са којим је организам био у контакту или на антигенски сродне серотипове. Међутим, описани су антигени на које се ствара имунитет на више различитих серотипова. Код инфицираних животиња – резервоара присутни су ниски титри антитела, што омогућава опстанак и даље ширење узрочника. Што се тиче целуларног имунитета он је такође укључен у имунолошки одговор на лептоспире, али се сматра да има мањи значај од хуморалног имунитета [2]. Не може се са сигурношћу рећи колико траје имунитет након излечења од лептоспирозе [5,18].

Чест узрок губитка вида код коња је рекурентни увеитис (енг. equine recurrent uveitis – ERU). Рекурентни увеитис коња или периодична панофталмија се карактерише са понављајућим епизоодама запаљења дужице ока, цилијарног тела и судовњаче који заједно чине увеу [20,21]. Патогенеза његовог настанка није у потпуности разјашњена, упркос значајним истраживањима у овој области. Постоји недоумица да ли је у питању перзистентна инфекција лептоспирама или аутоимуни механизам који доводи до рекурентног увеитиса [18,19].

Постоје докази да долази до стварања антитела против лептоспиралних протеина (LruA, LruB и LruC) која показују антигенску сличност са одређеним антигенима очног сочива, цилијарног тела и мрежњаче. Показало се да синтетисана антитела против лептоспира показују унакрсну реактивност са антигенима из поједних делова ока у условима *in vitro* [17,22]. У великом броју случајева доказано је присуство ретиналдехид везујућег протеина (CRALBP) који се сматра новим аутоантигеном увеитиса [21].

Увеални тракт је богат крвним судовима и у непосредном је контакту са очном јабучицом. Постоји баријера између системске циркулације и унутрашњих структура ока која се назива крвно-окуларна баријера. Сврха ове баријере, између осталог, је и даограничи доступност унутрашњих структура ока самом имуном систему [20]. Када постоје поремећаји на нивоу ове баријере, антигени унутрашњих структура ока постају доступни имуном систему коња, који их не препознаје, па долази до стварања антитела на унуташње антигене ока [21].

Код рекутентог увеитиса долази до инфилтрације доминантно Т лимфоцита који луче проинфламаторне цитокине, што покрећа запаљенску реакцију [21]. Такође долази до акумулације АА амилоида у стакластом телу, што у даљем току доводи до губитка вида [18]. Са друге стране, постоје и други могући узроци које могу довести до увеитиса попут ендотоксемије и септикемије након инфекције различитим инфективним узрочницима [9].

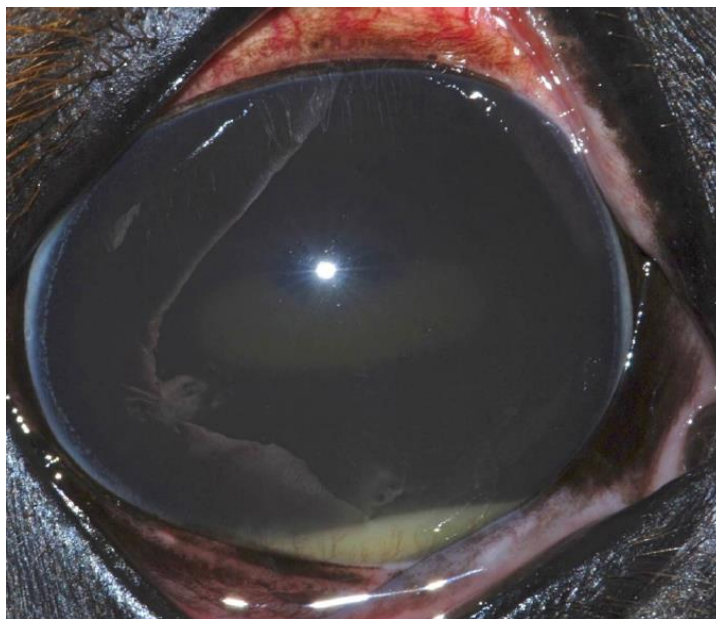
## 2.4. КЛИНИЧКА СЛИКА

Лептоспироза коња може да се манифестује као супклиничка инфекција и као инфекција са јасно испољеним клиничким симптомима [9,13]. Клиничка слика је врло варијабилна, пошто већина случајева пролази инапарентно, што се повезује са серотиповима који су се прилагодили домаћину [2]. Клинички испољена лептоспироза се спорадично јавља код свих старосних узраста, раса и пола [18]. Најпре се манифестује са анорексијом, летаргијом и пролазном грозницом, што може остати неопажено [4,18]. Услед развоја акутног тока долази до повишене телесне температуре и слабости, односно смањења спортских перформанси грла [13,17]. У даљем току болести долази до појаве петехијалних крварења на слузницама, хемоглобинурије и иктеричног синдрома [4,9,13,17]. Иктерични синдром углавном се јавља код ждребади [17,23]. Тешка плућна форма која доводи до интраалвеоларног крварења може довести до акутне респираторне инсуфицијенције која узрокује угинуће [24].

Сматра се услед инфекција са серотипом *L. bratislava* протиче као тиха инфекција, која се само манифестује побачајем [25]. Услед развоја лептоспиремије може доћи до преласка узрочника у репродуктивни тракт кобила. Код gravidних кобила може доћи до ресорпције плода, побачаја, ждребљења мртвих или слабо виталних ждребади [7,17,18,26].

Пошто инфекција настаје *in utero*, инфицирана новорођена ждребад су врло слаба и имају жутицу, тешке респираторне сметње и повишену телесну температуру [18]. Побачаји се обично јављају у средњој и касној гестацији за време фебрилног стања или неколико недеља после [13,23].

У хроничном току, након неколико месеци или чак година може доћи до појаве рекурентног увеитиса, односно периодичне панофталмије [10,13]. Рекуренти увеитис је описан након природне или експерименталне инфекције лептоспирама [5]. Може да захвати једно или оба ока. Најчешће изолован серотип из ока је *L. rotomona* [4]. Манифестује се са различитим клиничким симптомима као што су миоза, блефароспазам, фотофобија и промена боје дужице, а у даљем току могу да се појаве катаракта и амауроza [5,7]. Код експериментално инфицираних коња, грозница је доминантан клинички симптом, док се региструју и анорексија, депресија и појава иктеруса [5].



Слика 2. Приказ ока коња са присутним акутним рекурентним увеитисом [21]

## 2.5. ПАТОМОРФОЛОШКИ НАЛАЗ

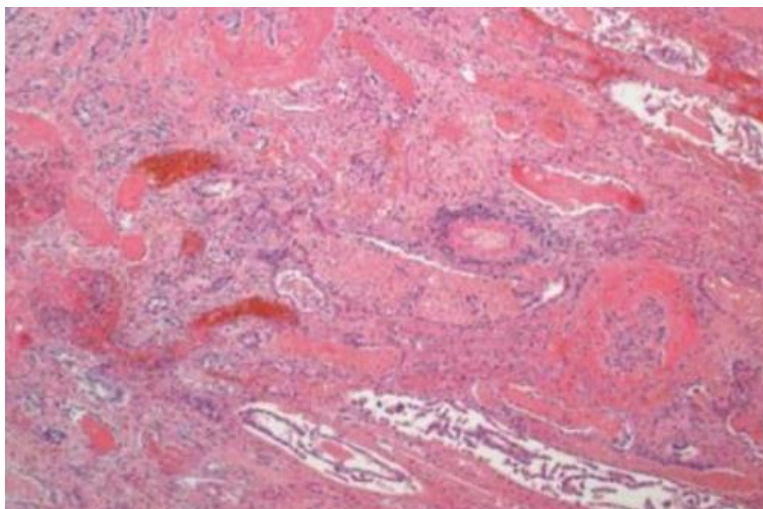
Подаци везани за патоморфолошки налаз код коња са системски испољеном лептоспирозом су релативно ограничени. Пошто лептоспирозу карактерише системски васкулитис са оштећењем ендотела капилара, лезије су присутне у многим ткивима, пошто се лептоспире могу умножавати у различитим органима [18]. На слузницама могу да се запазе петехијална крварења и иктерично пребојавање ткива. Прегледом бубрега запажа се да су они увећани, са белим пругама на кортексу, као и мултифокалним екхимозама и петехијалним крварењима. Макроскопски преглед јетре указује да је јетра увећана, крта и жуто пребојена [4,9,23]. Понекад су на јетри присутни сивкасто-бели чворићи, као резултат репарације услед акутне некрозе паренхима јетре [9]. На плућима се могу видети тачкаста крварења и екхимозе. Код гравидних кобила плацента је едематозна, присутна је некроза хориона и мукоидни ексудат [9,17,18].

## 2.6. ПАТОХИСТОЛОШКИ НАЛАЗ

Патохистолошким прегледом бубрега запажа се васкулитис, оштећење ендотела капилара са мешовитим инфламаторним инфилтратима који се састоје од неутрофилних гранулоцита, лимфоцита, макрофага и плазма ћелија. На нивоу бубрега може бити присутан интерстицијални едем и тубулоинтерстицијални нефритис [2,18,20]. Патохистолошким техникама бојења могу се наћи лептоспире у изувијаним бубрежним тубулима [4]. У плућима присутна су тачкаста крварења и екхимозе, као и знаци запаљења плућа [9]. У ткиву плаценте може да се уочити васкулитис, тромбоза, мешовита ћелијска инфилтрација, некротичне промене и дистрофична калцификација. Код фетуса уочене су абнормалности првенствено на јетри, која је увећана и бледожуте боје [18], а у лумену бубрежних каналића патохистолошким методама бојења могу се доказати лептоспире [27].



У инфицираном оку могу се наћи дегенеративне промене на *n. opticus* и ретини, као и хијалинизација базалне мембране цилијарног тела [27].



Слика 3. Приказ патохистолошког пресека ткива бубрега са присутним акутним тубулоинтерстицијалним нефритисом [9]

## 2.7. ДИЈАГНОЗА

Дијагноза лептоспирозе код коња се поставља на основу анамнезе, епизоотиолошких података, клиничког прегледа и лабораторијских испитивања [4,13]. Из анамнестичких података врло је важно сазнати да ли је коњ боравио у средини која може бити контаминирана урином мишоликих глодара, каои да ли је боравио уз површинске воде. Од клиничких симптома на лептоспирозу најчешће указује иктерус са повишеном телесном температуром, хепаторенални синдром, као и репродуктивни поремећаји код кобила [12]. Прегледом комплетне крвне слике уз биохемијске анализе крви када се региструје анемија, леукоцитоза, тромбоцитопенија, азотемија, хипонатријемија и хипохлоремија често могу да укажу на лептоспирозу [28]. Ултрасонографским прегледом бубрега може да се утврди увећање бубрега [16].

Лабораторијске методе дијагностике лептоспирозе могу се поделити на директне (микробиолошке и молекуларне методе, којима је циљ доказивање присуства узročника или његовог генома у биолошком материјалу) и индиректне (серолошке методе којима се у крвном серуму доказују специфична антитела против лептоспира). Изолација и идентификација узročника је захтеван и дуготрајан процес, молекуларне методе су скупе и нису широко доступне, па се у већини случајева лептоспироза дијагностикује серолошким методама, од којих је микроскопски аглутинациони тест стандардни и референтни тест за дијагностику лептоспирозе [6,12].

Присуство спирохета у крви и цереброспиналној течности се може доказати најкасније 7 до 10 дана од почетка обољења, пошто након тог периода услед стварања неутрализационих антитела нема више лептоспира у крви. Свакако, узорке крви треба узети пре почетка антимикуробне терапије. Важно је напоменути да понекад нема довољне количине антитела у крвном серуму у раном периоду болести, па је треба узети парне узорке [12]. Први узорак се треба узети што пре од почетка клиничке слике болести, док други узорак се узима за 14 дана [4].

Када се у првом крвном серуму пронађу специфична антитела, обавезно треба узети и други узорак за 14 дана, ради компаративне анализе резултата. Једнак титар антитела у парним серумима, који често буде и низак, наводи на закључак да је то последица раније инфекције. Код акутне лептоспирозе долази до четвороструког или већег пораста титра специфичних антитела у другом узорку [4,12,16].

Сем у крви, лептоспире се могу доказати и у урину [6,12,13]. За узимање узорака урина користе се стерилне посуде, понекад са додатком антимикуробних супстанци (на пример 5-флуороурацил), да би се спречио раст других бактерија из урина [12]. Због периодичног излучивања лептоспира путем урина, препоручује се сакупљање три до пет узорака урина у току 12-24 часа [16]. Други начин је да се једнократно апликује диуретик (на пример фуросемид) интравенски у дози од 1 mg/kg телесне масе и на тај начин прикупи узорак [16,29]. Лептоспире се не могу доказати у оку код периодичне панофталмије, једино се могу наћи специфична антитела у крвном серуму [13].

Постмортално могу се узети узорци паренхиматозних органа (бубрези, јетра, слезина) и трансудат трубшне и грудне дупље, садржај перикарда или мокраћна бешика [4]. У случају побачаја могу се узети плацента и побачени фетуси [6].

Молекуларне методе дијагностике су релативно скупе и нису широко доступне, а култивација и изолација лептоспира је захтевна и дуготрајна, па се најчешће користе серолошке методе [12]. Примена серолошких тестова је оправдана због потешкоћа око изолације лептоспире и доказивања нуклеинских киселина. Од серолошких метода најчешће се користе микроскопски аглутинациони тест и имуно-ензимски тест (ЕЛИСА) [2]. Микроскопски аглутинациони тест представља референтни метод за серолошку дијагностику [6,9,10].

### 2.7.1. Директне методе детекције

Као узорци за директне методе дијагностике могу се користити крв, урин, млеко, цереброспинална течност и мацерирано ткиво. Из клиничког материјала, лептоспире се тешко могу видети стандардним светлосним микроскопом, јер слабо примају анилинске боје [18]. Стога се могу видети помоћу микроскопије у тамном пољу, када се користи увеличење од 100 до 400 пута [12]. Тада се виде необојене, покретне, витке спирохете са кукастим крајевима. Пошто је потребно приближно  $10^4$  до  $10^5$  спирохета у 1 ml узорка, да би се виделе у видном пољу, овакав начин дијагностике непрецизан и непоуздан [18]. Клинички узорци могу бити проглашени као лажно негативни, чак и у искусним рукама микробиолога. Због тога се микроскопија у тамном пољу не може користити као једини дијагностички метод [9].

Обично се од акутно инфицираних животиња узима урин, јер у њему се може наћи релативно велик број лептоспира. Ако је задовољавајуће стање хидрираности коња, могу да се користе диуретици (на пример фуросемид), пошто повећана диуреза повећава и излучивања лептоспира путем урина.

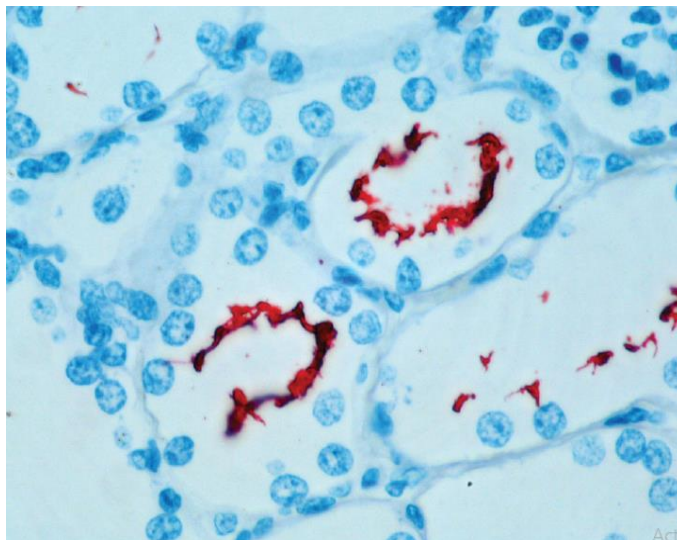
Урин треба прегледати у што краћем року, пошто у високо алкалном и киселом урину спирохете тешко опстају. Алтернативно се у стерилне посуде за прикупљање урина могу додати пуфери. Такође, у узорке урина може да се дода и формалин, који доводи до инактивације спирохета, па би се микроскопијом могле видети непокретне спирохете [18].

Током бактеријемije, лептоспире су присутне у крви, па се у тој фази болести оне могу видети у узорцима центрифугиране крви [2]. Из ликвора се могу такође микроскопијом у тамном пољу видети лептоспире, мада се такав метод дијагностике ретко користи [18].

Успех директних метода детекције зависи од броја присутних спирохета у клиничком узорку, па су оне од мањег дијагностичког значаја код хроничних процеса, када број спирохета може бити врло мали или је локализован у одређеном ткиву [10].

Бојење имунопероксидазом и имунофлуоресценција се користе за повећање осетљивости код директног микроскопског прегледа. Када се користи директни имунофлуоресцентни тест (ДИФ) он побољшава способност да се идентификују лептоспире у узорцима, било у телесним течностима или ткивима. За разлику од микроскопије у тамном пољу, ДИФ је поред тога што је осетљивији метод, он је и специфичан за серотипове [18].

У патохистолошким препаратима, за визуелизацију се користе специфична бојења, попут импрегнације сребром [10,18], мада овој методи је мана нижа осетљивост и специфичност, али је врло корисна [10]. Такође, имунофлуоресценција и имунохистохемија се користе у откривању антигена лептоспира у узорцима ткива [10,18]. Предност имунохистохемије наспрам бојења сребром је способност имунохистохемије да идентификује антиген лептоспира не само интактних спирохета, већ и њихових интрацелуларних гранула. Поред тога, потребна су мања увећања од 100 до 200 пута да би се оне могле видети, због бољег контраста црвено пребојених антигена лептоспира у односу на плаво пребојено ткиво у позадини [9].



Слика 4. Приказ агрегата лептоспира (црвена боја) у бубрежним каналићима око епителних ћелија бубрежних тубула након имунохистохемијског бојења [9]

### 2.7.2. Изолација и идентификација узрочника

Изолацијом лептоспира поставља се бактериолошка дијагноза [6]. Дуго је она сматрана златним стандардом за дијагностику лептоспирозе [18]. Успешном изолацијом и идентификацијом лептоспира може да се потврди дијагноза [9]. Узорке треба прикупити пре почетка антимицробне терапије [10,12,18]. Најчешће се за изолацију користе узорци крви и урина [2,4,18]. У почетној фази болести када су лептоспире присутне у крви [12], асептично се може узети узорак за хемокултуру у првих 4 до 10 дана након инфекције [18]. Одмах након вађења крви потребно је узорак инокулосати у течну хранљиву подлогу, односно ЕМЈХ (енг. Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris medium) или Кортхофову подлогу [4,12].

Једна кап крви се инокулише у 5 до 10 ml подлоге [21]. Ако није могуће одмах инокулосати подлоге, крв треба разблажити у односу 1:10 са 1% говеђим серумским албумином или пуферизованим физиолошким раствором. Такође, узорак крви може се додати у транспортну подлогу [18].

Ако се узорак пуне венске крви не разблажи одмах након венепункције, тада се додају антикоагуланси, као што су натријум оксалат или хепарин. Што се тиче цитратних антикоагуланаса, њих треба избегавати јер инхибирају раст лептоспира [18].

Након 7-10 дана од почетка болести, могућа је изолација лептоспира из урина [12]. Лептоспирурија може да траје у прекидима дужи временски период [18]. Према томе, спирохете не морају бити пристуне у урину током сваког акта микције. У прикупљен урин треба додати у натријум бикарбонат, ако је киселе вредности рН. По приспећу у лабораторију, потребно је центрифугирати урин како би се лептоспире концентрисале и издвојени седимент се додаје у подлоге са 5-флуороурацилом како би се спречио раст осталих бактерија које су присутне у урину [12].

Пре засејавања у подлогу, праве се десетострука разблажења испитујућих узорака и они се зајесејавају у подлоге које садрже серум или албумин, као што су подлога по Кортхофу, по Џонсону, по Флечеру или ЕМЈХ подлога [4]. Да би спречио раст других бактерија по потреби се у подлоге додају антимикробне супстанце [6,18], попут 5-флуороурацил, гентамицин или римфампицин [6,10]. Температура на којој се врши инкубација је  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Испод површине подлоге уочава се замућење, које постаје све веће како инкубација траје. Овакав раст испод површине медијума познат је као Дингеров прстен или диск [10].

Инкубација засејаних подлога траје минимум 13 недеља [2,6,12], са испитивањем једном недељно микроскопијом у тамном пољу [6,10]. Сем микроскопије у тамном пољу, изолати се могу идентификовати путем серолошких метода или молекуларних метода [18]. У зависности од тога који је серотип присутан у култури и колико га има количински, зависи време које је потребно за детекцију позитивне културе. Мање избирљивим серотиповима као што су на пример *L. pomona* и *L. grippotyphosa*, могу да се детектују већ након 7-10 дана од инокулације, док другим серотиповима попут *L. hardjo* и *L. bratislava* потребно је знатно дуже [10]. Процес изолације додатно отежава и контаминација узорка са другим бактеријама које расту на истој подлози за изолацију [6].

Због компликованог и дугог процеса инкубације, она се не користи у рутинској дијагностици. [2,4,6]. Поред тога што је дуготрајна и технички захтевна, изолација као техника дијагностике има ниску осетљивост [9,10].

### 2.7.3. Серолошки тестови

Серолошка испитивања су дијагностичке процедуре које се најчешће користе за постављање дијагнозе и за утврђивање серопреваленције у оквиру епизоотиолошких студија. Специфична антитела се појављују и могу се детектовати у крвном серуму након 7-10 дана од почетка болести и опстају недељама и месецима, чак и годинама. Код хронично инфицираних јединки може доћи до пада титра специфичних антитела да се она више не могу детектовати серолошким методама. Од серолошких метода дијагностике два теста се широко користе у ветеринарској медицини, а то су микроскопски аглутинациони тест (МАТ) и имуно-ензимски тест (ЕЛИСА) [10]. Од других серолошких метода могу да се користе индиректни имунофлуоресцентни тест (ИИФТ), латекс аглутинација и брза аглутинација на плочици [2,7].

#### Микроскопски аглутинациони тест (microagglutination test – МАТ)

Микроскопски аглутинациони тест је референтна метода серолошке дијагностике лептоспирозе [9,10,11,12,30,31]. Представља серолошки тест који се најчешће користи [2,10]. Има високу дијагностичку специфичност [2,6,30]. Заснива се на идентификовању специфичних антитела у крвном серуму. Представља квалитативан и квантитативан тест, што значи да сем тога што може да одреди да ли постоје антитела у крвном серуму, такође може да се одреди и њихова количина, односно титар [12].

За извођење микроскопског аглутинационог теста важан је одабир антигена, пошто су лептоспире антигенски врло различите [2,12,30,31]. Потребно је за дијагностику уврстити оне серотипове који се јављају на подручју одакле потичу узорци [12], као и да су заступљени представници из различитих серолошких група [10,12]. Такође, одабир серотипова зависи и од епизоотиолошке и епидемиолошке ситуације у држави [12]. Сојеви који се користе за дијагностику, треба да се узгајају у течној подлози (на пример ЕМЈХ подлога) на  $30 \pm 2^\circ \text{C}$  и култура најмање треба да буде стара четири дана, а највише десет дана. Живе културе које се користе као антигени треба да имају густину приближно  $2 \times 10^8$  лептоспира по 1 ml [10].

Микроскопски аглутинациони тест захтева стручну оспособљеност за извођење теста и за интерпретацију резултата, па је ограничен на референтне лабораторије [31]. Погрешан одабир или смањен број антигена за серолошку дијагностику и узимање узорака у раној, акутној фази болести када још није дошло до синтезе довољне количине антитела, могуће је добити лажно негативне резултате применом микроскопског аглутинационог теста [12]. Због тога се за сигурну потврду акутне инфекције користе парни серуми, када се може утврдити четвороструки и већи пораст титра специфичних антитела у другом узорку [10,12,31].

Гранични титар је дефинисан као оно разблажење крвног серума у којем је дошло до аглутинације 50% лептоспира, а 50% лептоспира је слободно [120]. Услед присуства специфичних антитела у крвном серуму долази у одређеном степену до формирања аглутината који се јасно виде микроскопијом у тамном пољу [6]. Титар од 1:100 се узима као позитивни титар, али услед високе специфичности микроскопског аглутинационог теста и нижи титри се могу узети као доказ претходне изложености јединке лептоспирама [10].

Антитела усмерена против других бактерија обично не реагују у значајној мери против лептоспира, па је добра специфичност микроскопског аглутинационог теста [10]. Између серотипова лептоспира може да постоји унакрсна реактивност, због антигенске сличности [12]. Дакле, коњ инфициран једним серотипом, може развити антитела која могу да реагују и са другим серотиповима, али тада се обично добијају нижи титри антитела [2,10].



### Имуноензимски тест (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA)

Постоје развијени ЕЛИСА тестови за детекцију антитела против лептоспира [2,10]. Као антигени користе се целе ћелије лептоспира или протеини спољашње мембране [10], као што су LipL32, LigA и OmpL1 [2,6].

Широко су распрострањени тестови који садрже рекомбинантне протеине, пошто су широко реактивни на антитела против свих патогених лептоспира, па због тога немају вредност у епидемиолошким истраживањима. ЕЛИСА тестови који садрже липополисахаридни антиген имају вредност у епидемиолошким истраживањима пошто показују специфичност за серогрупу [10].

Осетљивост и специфичност ЕЛИСА тестова се не поклапа са микроскопским глутинационом тестом [2]. Специфичност ЕЛИСА теста зависи од тога који се антигени користе у дијагностици [2,10]. Помоћу ЕЛИСА теста није могуће утврдити тачан серотип [6], али елиминише потребу за одржавање живих култура лептоспира и добрим делом је аутоматизован [2].

#### 2.7.4. Молекуларни тестови

Молекуларне методе дијагностике лептоспирозе коња се све више развијају [18,32]. Лептоспире се могу у клиничком материјалу доказивати путем откривања специфичних секвенци њихове дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) путем метода ланчане реакције полимеразе (енг. polymerase chain reaction – PCR), било да је конвенционална или у реалном времену (енг. real time PCR – RT-PCR) [4,12]. PCR омогућава копирање и умножавање специфичне ДНК секвенце, што представља врло брз метод за дијагностику лептоспира [6].

Као друге молекуларне методе користе се и дот блотинг и ДНК хибридизација [18].

Као узорак за молекуларну дијагностику се користи крв или урин [6]. Доказивање ДНК лептоспира у урину показао се као добар дијагностички метод [9,28,32] али треба напоменути да код код хронично инфицираних а наизглед клинички здравих коња ретко је пристуна лептоспирурија [9].

Развијено је неколико PCR протокола и описано је неколико парова прајмера за умножавање специфичних секвенци ДНК лептоспира [6]. Тестови могу да се поделе на оне који детектују гене који су универзално присутни код лептоспира (на пример *grlB* или 16S РНК ген) и на оне који детектују гене који су присутни само код патогених лептоспира (на пример *lipL21*, *lipL32*, *lipL41*, *LigA* и *LigB*) [10].

Молекуларне методе дијагностике имају предности у односу на изолацију лептоспира [12]. Оне су брже, пошто за изолацију и идентификацију лептоспира потребне су недеље, што је важно за брзо постављање дијагнозе лептоспирозе [6,11]. Осетљивост им је већа, пошто је молекуларним методама потребан мали број спирохета у узоку [11,12]. RT-PCR је бржи од конвенционалног PCR, али и мање осетљив на контаминацију [10].

Многи сетови PCR прајмера су намењени за употребу на узорцима пореклом од људи и изостаје општа сагласност око PCR прајмера који ће се користити за тестирање на узорцима анималног порекла, иако најчешће се користе они засновани на гену *lipL32*. Присуство инхибитора амплификације у клиничким узорцима, поготово оним који су контаминирани или су подлегли аутолизи, може довести до појаве лажно негативних резултата [10].

Идентификација изолата је задатак специјализованих референтних лабораторија, у којима се доказује да ли је изолат сапрофит или патоген, којој врсти, серогрупи и серотипу припада у оквиру рода *Leptospira*. Може бити присутно више различитих серотипова у оквиру истог узорка. Применом реакције унакрсне аглутинације може да се одреди којој серогрупи припада изолован сој, а диференцијација до нивоа серотипа захтева методе попут оних које користе моноклонска антитела. Развијене су и молекуларне методе којима се може доказати који је серотип изолован из клиничког материјала [10].

## 2.8. ДИФЕРЕНЦИЈАЛНА ДИЈАГНОЗА

Диференцијална дијагноза обухвата различите болести који се манифестују у форми грознице и жутице, грознице и отежаног дисања или грознице и побачаја [5,9].

Што се тиче грознице и жутице, диференцијално дијагностички долази у обзир бабезиоза, имунолошки-посредована хемолитичка анемија, реактивни хепатитис, хендра инфекција, инфективна анемија копитара и вирусни артеритис коња, антракс и тумори (хемангиосарком, лимфосарком и карцином јетре).

Плеуритис, ендокардитис, миокардитис, перикардитис, бактеријска пнеумонија, микотична пнеумонија, инфлуенца коња, херпесвирусне инфекције коња, грозница западног Нила, вирусни артеритис коња, инфективна анемија копитара, хендра инфекција, малеус, туберкулоза, дисеминована интраваскуларна коагулација, тромбоемболија плућа, саркоиди, ујед змије и малигни тумори се могу клинички манифестовати у форми грознице и отежаног дисања.

Што се тиче грознице и побачаја, диференцијално дијагностички долазе у обзир болести као што су херпесвирусне инфекције коња, вирусни артеритис коња, инфективна анемија копитара, салмонелоза, туларемија, бабезиоза, бруцелоза и антракс [9].

## 2.9. ТЕРАПИЈА

Терапија лептоспирозе варира у зависности од тежине болести и трајања клиничких симптома, као и од локализације инфекције [5,16]. Поједини случајеви могу спонтано да прођу или уз само делимично укључену терапију. Врло важну улогу у процени коју терапију применити и какав ће бити опоравак животиње има степен оштећења јетре и бубрега [4].

Постоје различите студије везане за антимикуробну терапију лептоспирозе коња. Оне указују да постоје разлике у осетљивости и ефикасности на одређене антимикуробне лекове у условима *in vivo* и *in vitro*. Коњи са клинички испољеном лептоспирозом могу да буду азотемични, што је важно узети у обзир када се бира антимикуробни лек, као и да ли се он излучује путем бубрега и да ли има нефротоксичне ефекте [5,16].

Постоји доказана осетљивост на пеницилин, стрептомицин, ампицилин, амоксицилин, цефалоспорине треће и четврте генерације, еритромицин и ципрофлоксацин [5]. Не треба користити цефалоспорине друге генерације у терапији. Резистенција на цефалотин, суфлонамиде и хлорамфеникол је документована у поједним случајевима [33]. Што се тиче окситетрациклина, његови активни метаболити нису присутни у уринарном тракту коња у високим концентрацијама, па их због тога не треба користити [16]. Најчешће употребљавани антимикуробни лекови су пеницилин и стрептомицин. Пеницилин Г се употребљава у дози од 10000-15000 IU/kg, а стрептомицин у дози од 10 mg/kg [17]. Стрептомицин је делотворан у елиминацији лептоспира како из крви тако из епитела бубрежних тубула [4]. У потпорној терапији се користе интравенска надоканда течности и електролита путем инфузионих раствора уз поштеду од физичких активности током неколико недеља [5].

Циљ терапије рекурентног увеитиса је очување вида и контрола запљенског процеса, као и да се ограничи или спречи трајно оштећење ткива ока. Када се идентификује примарни узрочник рекурентног увеитиса, терапија је првенствено усмерена на елиминисање примарног узрочника, као и да се он по могућности изолује и испита његова антимикуробна осетљивост. Пошто је губитак вида уобичајена хронична манифестација рекурентног увеитиса терапију треба започети што пре [16,21].

Системски или локално се у терапији користе глукокортикостероиди и нестероидни антиинфламаторни лекови. Предност топикалне терапије је у томе да се смањује ризик од нежељених ефеката наспрам системске примене истих лекова. Глукокортикостероиди и нестероидни антиинфламаторни лекови смањују запаљески процес, болност и умањују даља оштећења ткива. Они су мање ефикасни у случају понављања рекурентног увеитиса [21].

Топикална примена глукокортикостероида (на пример метилпреднизолон ацетата или дексаметазон фосфата) доводи до имуносупресије и смањења фибробластне пролиферације. Такође, често се комбинује топикална и парентерална администрација глукокортикостероида. Топикална примена нестероидних антиинфламаторних лекова (на пример 0,1% диклофенак или 0,03% флурбипрофен) има слабије ефекте од топикалне употребе глукокортикостероида код коња са периодичном панофталмијом. Они су више индиковани када је контраиндиковано давање глукокортикостероида.

У тежим случајевима примењују се субкоњунктивалне или интравиталне инјекције глукокортикостероида као вид топикалне терапије [16].

У системској терапији код рефракторних случајева користи се *per os* глукокортикостероиди (на пример дексаметазон) или нестероидни антиинфламаторни лекови (на пример флуниксин меглумин) [16]. Нестероидни антиинфламаторни лекови су контраиндиковани код бубрежне инсуфицијенције и код улцерозних болести дигестивног тракта [34].

Што се тиче рецидива рекурентног увеитиса, показао се ефикасним циклоспорин А. Циклоспорин А је имуносупресивни лек који блокира транскрипцију IL-2, који се сматра за главног покретача запаљенског процеса, што смањује активацију Т лимфоцита. Примењује се у облику интравитреалних имплантата који су импрегнирани са циклоспорином А, када долази до његовог продуженог локалног ослобађања [16,21,34].

Подаци о ефикасности употребе антимикуробних лекова у терапији рекурентног увеитиса захтевају даља истраживања [5,21].

Што се тиче хирушких техника, у појединим случајевима врши се хирушко уклањање стакластог тела (витректомија), које нема само терапијски значај, већ представља донеке и дијагностичку методу јер се узорак стакластог тела може дијагностички испитати, када медикаметозна терапија није ефикасна [35].

## 2.10. ПРОФИЛАКСА

У циљу спречавања и сузбијања лептоспирозе коња потрбно је органичити односно спречити слободан приступ коња стајаћим водама, одвојити потенцијалне клицоноше и вршити редовну дератизацију у циљу сузбијања мишоликих глодара на фармама и ергелама. Инфициране и оболеле коње треба изоловати од других јединки и спровести дезинфекцију објекта у којем се држе животиње, дезинфекцију пратеће опреме, као и хране и воде која се користи у тим објектима [18].

Према важећем правилнику када се утврди летпоспироза у одређеном дворишту или објекту наредиће се следеће мере од стране ветеринарске инспекције: одвајање оболелих коња од здравих, лечење оболелих животиња и свих других животиња са титровима антитела нижим од 1:100, применом одговарајућег антибиотика. Забрањује се кретање оболелих животиња ван зараженог дворишта и објекта и примењују се мере дезинфекције и дератизације зараженог дворишта и објекта [36].

Обавезно је одстрањивање отпадних вода из тог дворишта и објекта, као и поправка оштећених подова и дренажног система. Треба исушити околину зараженог дворишта и објекта и вршити контролу напајалишта ради спречавања загађивања бунара и контролу система за напајање у зараженом дворишту и објекту и њиховој ближој околини, као и обавити дезинфекцију бунара и система за напајање водом. Извршити дијагностичко-серолошко испитивање пуне крви свих животиња у зараженом дворишту и објекту 2 пута у размаку од по 21 дан после завршеног лечења и спровођења свих наређених мера [36].

У дворишту односно објекту где је утврђена лептоспироза, шест месеци и после санирања лептоспорозе, обавезно је одрадити дијагностичко испитивање 20% укупног броја животиња из тог објекта. Грла за приплод из тог запата, могу се ставити у промет без ограничења, ако резултат дијагностичког испитивања буде негативан.

У зараженом дворишту односно објекту болест се сматра престалом, ако су извршене све наређене мере које налаже важећи правилник, као и да је извршена дезинфекција и да је од обављене дезинфекције прошло 21 дан [36].

Поједине болести коња, које изазивају *Rodococcus equi*, *Sarcocystis neurona*, *Taylorella equigenitalis*, вирус инфективне анемије копитара, као и *Leptospira interrogans* не постоје ефикасне вакцине које се могу комерцијално користити у сузбијању ових болести [21]. Према томе, код коња се не спроводи вакцинација против лептоспирозе, пошто ниједна вакцина није одобрена за употребу код коња [17]. Ограничавајући фактори би свакако били то да се не би могао рутински у дијагностици употребљавати микроскопски агултинативни тест и други серолошки тестови, као и то који би се серотипови укључили у вакцине [3].

## 2.11. ЗНАЧАЈ ЗА ЈАВНО ЗДРАВЉЕ

Лептоспироза људи има велик глобални значај [8,11] и врло је раширена зооноза у свету. Највећу инциденцију имају географске регије које имају топлу климу [5], посебно тропска подручја [2,3,37]. Највећи број пријављених епидемија регистрован је у регионима Латинске Америке и Карибима (36%), па затим у Јужној Азији (13%) и Северној Америци (11%) [37]. Процењује се да годишње од лептоспирозе оболи око један милион људи, а да је број смртних случајева износио око 60000 [3,38].

Резервоари инфекције за људе су домаће и дивље животиње, нарочито дивљи глодари [2]. Директан или индиректан контакт са урином или ткивима заражених животиња представља извор инфекције за људе. Узрочник продире кроз оштећену кожу или слузницу ока, уста и носа [1]. Под повећаним ризиком су одређена занимања, попут ветеринара, радника у кланицама и млекарској индустрији, као и одређене рекреативне активности попут риболова и спортови у и на води [2,5]. Особље које ради у лабораторијама треба да носи латекс рукавице када рукује са урином или другим материјалом који је контаминиран са урином. Површине које су биле контаминирани са урином треба да буду опране детергентом и да буду дезинфиковане са одговарајућим дезинфекционим средствима [5].

Лептоспире колонизују проксималне бубрежне каналиће, када долази до патолошких промена на тубулоцитима, када долази до њиховог излучивања путем урина. Оне не опстају у киселом урину, ал могу преживети у благо алкалном урину [2]. Широк је спектар клиничких симптома лептоспирозе људи. У већини случајева болест протиче супклинички или са благим клиничким симптомима. Код 5-10% пацијената долази до развоја тешког иктеричног облика лептоспирозе (Вејлов синдром), а морталитет код ових пацијената се обично креће између 5 и 15% [5].



Клинички симптоми лептоспирозе људи могу да се испоље у облику анорексије, грознице, повишене телесне температуре и главобоље [4]. Понекад се јавља мучнина, повраћање и пролазна дијареја [2,8]. Вејлов синдром је тежак облик лептоспирозе са иктерусом, крварењима и поремећајима свести. Крварења настају услед оштећења зида капилара [4]. Некад након почетних испољавања клиничких симптома долази до пролазне ремисије болести, након чега долази до егзацербације процеса што укључује менингитис, бубрежну инсуфицијенцију и болове у стомаку или грудима [2]. Код трудница могући су побачаји [4,8]. Опоравак је обично потпун. Код поједних пацијената слабост, умор и депресија могу да потрају недељама или чак месецима што спречава и отежава повратак на посао. Пријављени су случајеви увеитиса, као касна компликације након опоравка [8].

У терапији лептоспирозе код људи користи се доксициклин, еритромицин и пеницилин [4,5]. У појединим замљама користи се имунизација поливалентним вакцинама код ризичних група људи [4].

### **3.0. ЦИЉ И ЗАДАТАК ИСТРАЖИВАЊА**

На основу прегледа литературе уочено је да постоји мали број података у вези серопреваленције лептоспирозе код коња на географском подручју Војводине, па је у циљу бољег сагледавања епизоотиолошке ситуације постављен следећи циљ и задатак истраживања:

1. Утврдити вредност серопреваленције лептоспирозе код коња на подручју Војводине.

## 4.0. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

### 4.1. МАТЕРИЈАЛ

У оквиру спровођења Програма мера здравствене заштите животиња или при обављању редовне ветеринарске делатности у оквиру здравствене заштите коња прикупљен је биолошки материјал за потребе овог истраживања. Биолошки материјал представља пуна венска крв од 61 коња са подручја Војводине. Крв је узета асептичном венепункцијом *v. jugularis* и прикупљена у вакутајнере са активатором коагулације и транспортована у хладном ланцу у лабораторију најкасније 24 часа од узорковања. Лабораторијска претрага узорака је обављена на Одељењу за имунолошка, серолошка и биохемијска испитивања на Научном институту за ветеринарство „Нови Сад“ у Новом Саду.

## 4.2. МЕТОДЕ

### 4.2.1. Епизоотиолошки упитник

Приликом прикупљања узорака пуне венске крви од 61 коња за потребе овог истраживања, истовремено је спроведен и епизоотиолошки упитник.

Епизоотиолошки упитник је садржао следећа питања:

1. Географски локалитет
2. Број одраслих коња
3. Раса, старост и пол животиња
4. Начин држања
5. Начин исхране
6. Претходне болести
7. Репродуктивни поремећаји
8. Претходне вакцинације
9. Спровођење мера дератизације
10. Стајаће воде у околини

### 4.2.2. Микроскопски аглутинациони тест (МАТ)

За потребе овог истраживања, да би се утврдила вредност серопреваленције лептоспирозе код коња на подручју Војводине, коришћен је МАТ према смерницама ОИЕ-а (ОИЕ поглавље 3.1.12). Микроскопски аглутинациони тест представља серолошку методу којом се детектују антитела против одређених серотипова *Leptospira interrogans*, употребом живих сојева *Leptospira interrogans* групе који се култивишу и одржавају у ЕМЈН подлози. Уколико постоје антитела у испитиваном крвном серуму коња долази до аглутинације која је видљива под тамним пољем микроскопа, након инкубације на 37° С током два сата.

#### 4.2.3. Лабораторијски прибор и апарати за извођење МАТ

Лабораторијски прибор потребан за извођење МАТ је:

1. мензура од 100 ml
2. пипета од 1 и 5 ml
3. лабораторијске чаше од 500 и 1000 ml
4. пластичне стерилне епрувете са чепом на навој
5. стаклене епрувете од 1, 2 и 5 ml
6. наставци за микропипете запремине до 200  $\mu$ l
7. микротитар плоча са „U“ дном за трансфер тест узорака
8. једноканална микропипета до 100  $\mu$ l

Лабораторијски апарати потребни за извођење МАТ су:

1. центрифуга
2. систем за стерилизацију и филтрацију
3. термостат
4. микроскоп са тамним пољем

#### 4.2.4. Реагенси и контроле за извођење МАТ

За извођење МАТ користе се живе културе *Leptospira interrogans* групе. Избор серотипова лептоспира зависи од географског локалитета и епизоотиолошке ситуације. За ово истраживање као антигени коришћени су следећи серотипови лептоспира: *L. grippityphosa*, *L. sejore*, *L. pomona*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. austalis*, *L. canicola*, *L. bratislava*, *L. hardjo* и *L. bataviae*.

Пре извођења МАТ потребно је припремити антигене тако што су епрувете са течном ЕМЈН подлогом засејане претходно набројаним културама лептоспира. Засејане подлоге су потом инкубисане на 28° С у термостату. Контрола раста је извршена четвртог дана применом микроскопског прегледа у тамном пољу.

Као антиген за МАТ коришћена је жива култура лептоспира стара 7-8 дана при оптималној густини од 100 лептоспира у тамном видном пољу микроскопа при увећању од 40 пута.

Као позитивна контрола коришћен је сигурно позитиван крвни серум коња на одређени серотип *Leptospira interrogans*, а док је као негативна контрола коришћен сигурно негативан крвни серум коња.

За контролу антигена, пре извођења МАТ извршена је контрола идентитета серотипова лептоспира применом референтних антисерума добијених хиперимунизацијом кунића, док је у току извођења МАТ у прву колону микротитар плоче стављено 50  $\mu$ l културе лептоспира са 50  $\mu$ l физиолошког раствора и касније микроскопирано у тамном пољу ради праћења евенталне појаве аутоаглутинације.

#### 4.2.5. Извођење МАТ

##### А) Издвајање крвних серума коња

Прво су узорци пуне венске крви коња, у вакутајнерима са активатором коагулације, били су центрифуговани на 3000 обртаја током десет минута да би се издвојио крвни серум.



Слика 5. Приказ изгледа центрифуге и узорака пуне крви коња у вакутајнерима са активатором коагулације

**Б) Скрининг испитивање присуства антитела против лептоспира у крвним серумима коња**

1. Направљена су разређења испитујућих крвних серума од 1:50 (у епруверу је сипано 2,45 ml физиолошког раствора, а затим додато 50  $\mu$ l појединачног испитујућег крвног серума коња.
2. У микротитар плочу пренето је по 50  $\mu$ l овог разређења и додата је иста количина антигена лептоспира (50  $\mu$ l добро израсле чисте културе лептоспира густине  $1-2 \times 10^8$  за сваки серотип лептоспира посебно). На овај начин је за скрининг испитивању добијено разређење крвног серума од 1:100.
3. Потом је микротитар плоча поклопљена да се спречи евапорација и постављена у инкубатор. Инкубисање је трајало два сата на температури од 37° C.
4. Ради читавања резултата, стерилном езом пренешена је на предметно стакло кап смеше крвног серума и културе лептоспира (за сваки серотип посебно) и посматрана под микроскопом у тамном пољу. Нанета кап се гледа брзо, пре исушивања, без покровног стакалцета.
5. Степен аглутинације се процењује на основу односа присуства аглутинираних лептоспира и густине преосталих не аглутинисаних лептоспира. Процент аглутинираних и неаглутинираних (слободних) лептоспира у односу 50:50 проглашава се као позитиван титар антитела од 1:100. Добијени резултат се упоређује са контролном суспензијом лептоспира у физиолошком раствору у једнакој запремини као и смеша испитујућег серума и антигена. После завршеног читавања резултата коришћене ингредијенције су преливене дезинфекционим средством.



Слика 6. Инкубисање микротитар плоче у инкубатору на 37° С



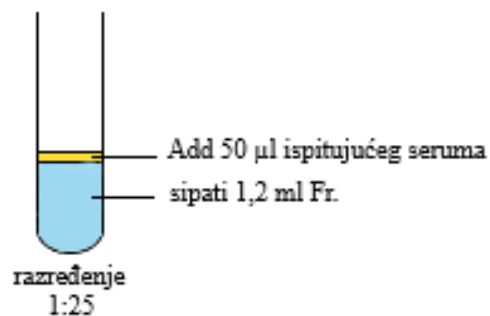
Слика 7. Приказ радног поља са микроскопом; 1 – микроскоп са тамним пољем, 2 – микротитар плоча, 3 – капалица са алкохолом, 4 – пламеник и 5 – еза



## В) Испитивање присуства специфичних антитела у крвном серуму против лептоспира у титру

У другом делу испитивања утврђује се висина титра специфичних аглутинарајућих антитела против лептоспира одређеног серотипа за који је у претходном прелиминарно скрининг испитивању утврђено постојање титра аглутинина.

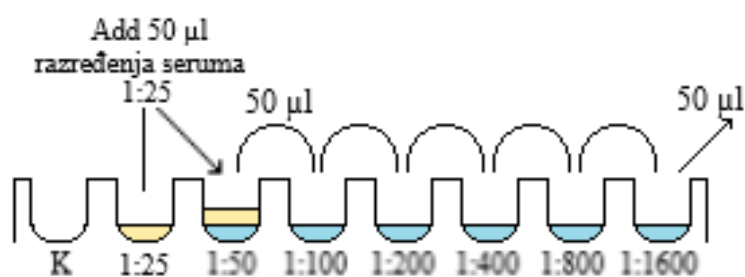
1. Прво су била направљена основна разређења испитујућих серума од 1:25 (1,2 ml физиолошког раствора (ФР) рН 7,2 и 50  $\mu$ l испитујућег серума).



2. Потом су напуњена сва удубљења микротитар плоче (осим прве и друге колоне) са по 50  $\mu$ l ФР-а рН 7,2.



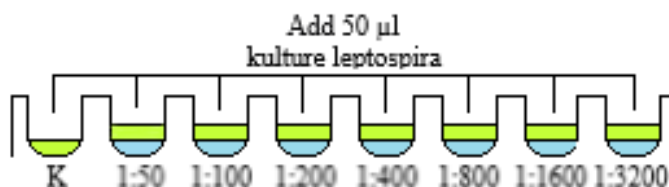
3. Затим је пипетом нането по 50  $\mu$ l основног разређења испитујућег крвног серума коња (1:25), у удубљења друге и треће колоне микротитар плоче.



4. Остала двострука разређења направљена су пребацавањем по 50  $\mu$ l микропипетом из 3. колоне удубљења у 4. и тако до краја, а из последње колоне удубљења одбачено је 50  $\mu$ l садржаја.

5. Колона 1. представља контролу антигена (жива култура лептоспира и физиолошки раствор у једнаким деловима).

6. У сва удубљења на плочи додато је по 50  $\mu$ l добро израсле живе културе испитујућег серотипа лептоспира.



7. Након наношења културе лептоспира, микротитар плоче су лагано протрешене, поклопљене да се спречи испаравање и инкубисане у току 2 сата на температури од 37° C.

8. Ради читавања резултата, стерилном езом пренешена је на предметно стакло кап смеше крвног серума и културе лептоспира и посматрана под микроскопом у тамном пољу при увећању од 160 пута.

9. Највећи степен разређења у коме је проценат аглутинираних и неаглутинираних (слободних) лептоспира у односу 50 : 50 узима се као гранични титар антитела, а добијени резултат је упоређен са контролном суспензијом лептоспира и физиолошког раствора у првој колони удубљења.

### **4.3. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА ПОДАТАКА**

Добијени резултати су обрађени и приказани дескриптивно уз израчунавање пропорције у виду преваленције.

## 5.0. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

### 5.1. РЕЗУЛТАТИ ЕПИЗООТИОЛОШКОГ УПИТНИКА

Анализом епизоотиолошког упитника установљено је да су начин држања (полуекстензиван начин држања) и начин исхране (цело зрно житарица, концентрована хранива и испаша) били заједнички за све коње, као и податак да нису вакцинисани против лептоспирозе. Подаци везани за пол, старост, расу и географски локалитет представљени су у Табели 1.

Табела 1. Приказ података који се односе на пол, старост, расу и географски локалитет коња од којих су узети узорци пуне венске крви

Редни број узорка	Пол	Старост (год.)	Раса	Географски локалитет
1.	М	21	липицанер	Келебија
2.	М	7	липицанер	Келебија
3.	М	8	липицанер	Келебија
4.	М	7	липицанер	Келебија
5.	М	18	липицанер	Келебија
6.	М	7	липицанер	Келебија
7.	Ж	12	липицанер	Келебија
8.	Ж	8	липицанер	Келебија
9.	Ж	9	липицанер	Келебија

10.	Ж	8	липицанер	Келебија
11.	К	16	липицанер	Келебија
12.	К	12	липицанер	Келебија
13.	Ж	8	липицанер	Келебија
14.	Ж	12	липицанер	Келебија
15.	Ж	18	липицанер	Келебија
16.	Ж	9	липицанер	Келебија
17.	Ж	21	липицанер	Келебија
18.	Ж	12	липицанер	Келебија
19.	Ж	13	липицанер	Келебија
20.	Ж	15	липицанер	Келебија
21.	Ж	12	липицанер	Келебија
22.	Ж	6	амерички касач	Хајдуково
23.	Ж	3	амерички касач	Хајдуково
24.	Ж	3	амерички касач	Хајдуково
25.	М	2	амерички касач	Хајдуково
26.	Ж	5	амерички касач	Хајдуково
27.	Ж	3	амерички касач	Хајдуково
28.	Ж	2	амерички касач	Хајдуково
29.	М	2	амерички касач	Хајдуково
30.	Ж	3	амерички касач	Хајдуково
31.	Ж	8	амерички касач	Хајдуково
32.	М	2	амерички касач	Хајдуково
33.	М	2	амерички касач	Хајдуково
34.	Ж	2	амерички касач	Хајдуково
35.	М	2	амерички касач	Хајдуково
36.	Ж	2	амерички касач	Хајдуково
37.	К	7	мелез	Суботица
38.	Ж	3	мелез	Суботица
39.	Ж	17	нониус	Суботица

40.	Ж	7	мелез	Суботица
41.	М	15	нониус	Суботица
42.	Ж	7	мелез	Суботица
43.	Ж	15	нониус	Суботица
44.	Ж	4	липицанер	Биково
45.	Ж	6	арапски пунокрвњак	Ђурђин
46.	М	4	арапски пунокрвњак	Чантавир
47.	К	5	арапски пунокрвњак	Фекетић
48.	Ж	6	арапски пунокрвњак	Фекетић
49.	М	8	холандски топлокрвни коњ	Кањижа
50.	М	10	липицанер	Кањижа
51.	М	7	липицанер	Кањижа
52.	К	17	нониус	Сот
53.	М	4	нониус	Сот
54.	Ж	6	нониус	Сот
55.	Ж	12	нониус	Сот
56.	Ж	1	нониус	Сот
57.	Ж	8	мелез	Сот
58.	М	4	хрватски посавац	Сот
59.	Ж	1,5	хафлингер	Сот
60.	Ж	8	липицанер	Сот
61.	М	3	хрватски хладнокрвни коњ	Сот

Легенда 1. М – мужјак (пастув); Ж – женка (кобила) и К – кастрат.

Власници су од претходних болести једино пријавили да коњи повремено имају површинске лезије на кожи и проблеме везане за копита и њихово одржавање. Коњ под редним бројем 20 као последица старе повреде има слепило на десном оку. Сви власници негирају постојање репродуктивних поремећаја код коња.

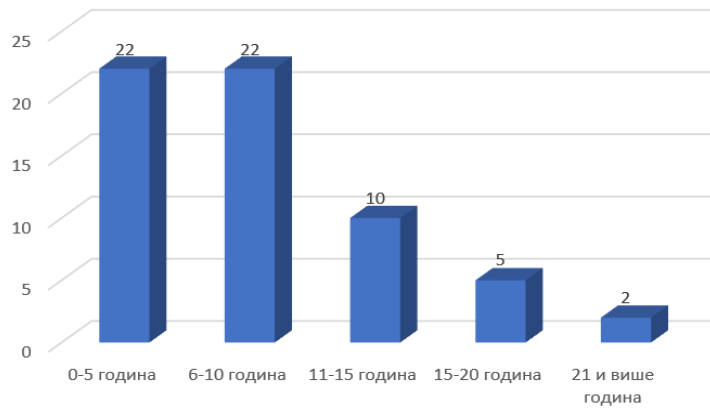
Као што је претходно поменуто, сви коњи од којих су узети узорци пуне венске крви нису били претходно вакцинисани против лептоспирозе. Коњи под редним бројем од 1 до 23 су вакцинисани против инфлуенце коња, док за друге коње не постоје подаци о претходним вакцинацијама против заразних болести.

Што се тиче спровођења мера дератизације, оне се не спроводе редовно и плански. Власници напомињу да повремено употребљавају родентициде у просторијама где се врши одлагање хранива за исхрану коња. Што се тиче објеката за држање коња, врата и прозори су отворени током топлијег периода године.

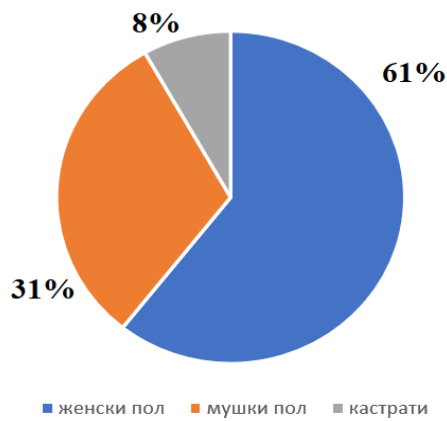
Што се тиче стајаћих вода у околини, на свим локалитетима коњи су имали приступ стајаћим водама који се налазе у релативној близини. Што се тиче коња од редног броја 1 до 43 они се налазе у широј околини Палићког језера и у својој непосредној близини имају стајаће воде. Коњи под редним бројем 44 до 48 се налазе у руралним подручјима на којима се налазе канали са водом која има спор ток, а коњи под редним бројем 49 до 51 се налазе у непосредној близини реке Тисе. Од редног броја 52 до редног броја 61 налазе се коњи у околини Сотског језера, где бораве на испаши, а вода из језера им је доступна за пиће.



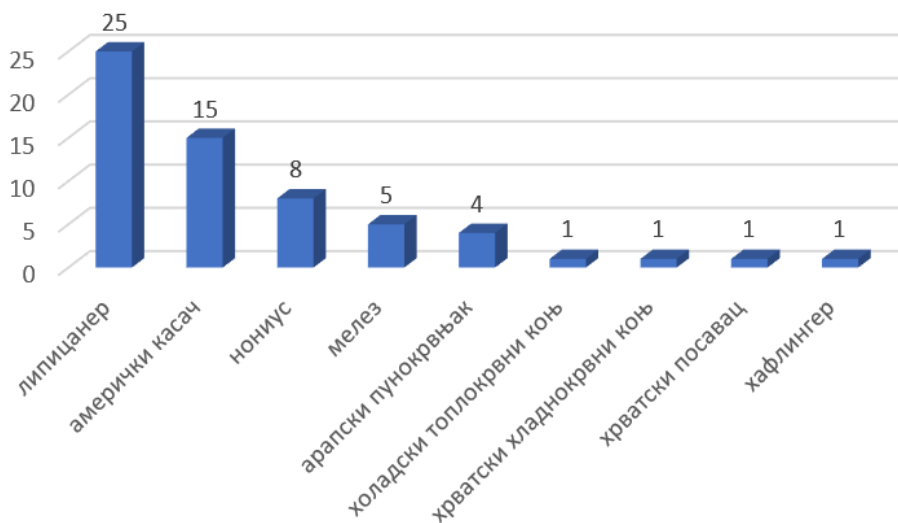
Слика 8. Приказ кобиле са ждребетом у објекту на локалитету Келебија



Графикон 1. Демографска анализа у односу на старосну категорију коња



Графикон 2. Процентуални приказ женског пола, мушког пола и кастрата од укупног броја прикупљених узорака



Графикон 3. Демографска анаиза у односу на расу коња



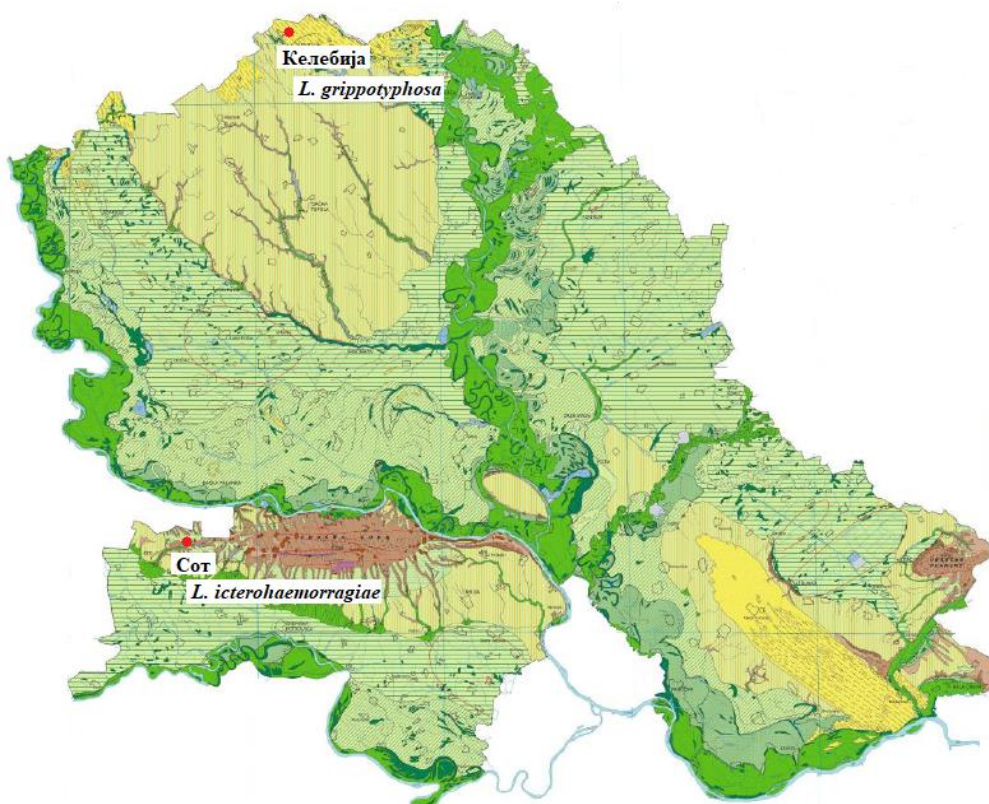
## 5.2. РЕЗУЛТАТИ МИКРОСКОПСКОГ АГЛУТИНАЦИОНОГ ТЕСТА

Од свих прегледаних узорка крвних серума коња (укупно 61), два узорка су била серопозитивна са титром антилептоспирозних антитела од 1:100 применом МАТ. Позитивни резултати МАТ добијени су код коња под редним бројем 14. и 52. Код коња под редним бројем 14. позитиван титар специфичних антитела је на серотип *L. grippityphosa*, а код коња под редним бројем 52. позитиван титар специфичних антитела је на серотип *L. icterohaemorrhagiae*.

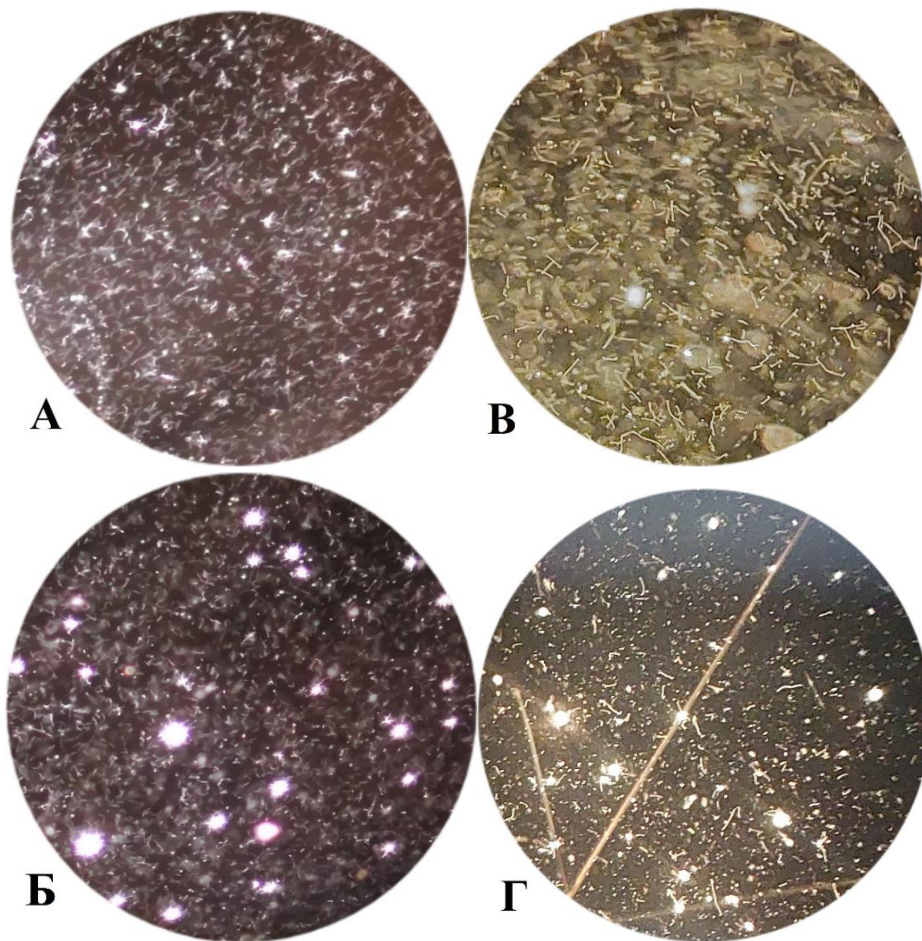
Коњ серопозитиван на *L. grippityphosa* је женског пола, старости 12 година, расе липицанер са локалитета Келебија.

Коњ серопозитиван на *L. icterohaemorrhagiae* је кастрат, старости 17 година, расе нониус са локалитета Сот.

Укупна серопреваленција лептоспирозе коња добијена у овом истраживању износи 3,28%.



Слика 9. Приказ локалитета са идентификованим серотиповима *Leptospira* на карти Војводине



Слика 10. Приказ негативне (А) и позитивне контроле (Б); као и негативне (В) и позитивне реакције (Г) у микроскопском аглутинационом тесту



Графикон 4. Серопреваленција лептоспирозе код коња на подручју Војводине

## 6.0. ДИСКУСИЈА

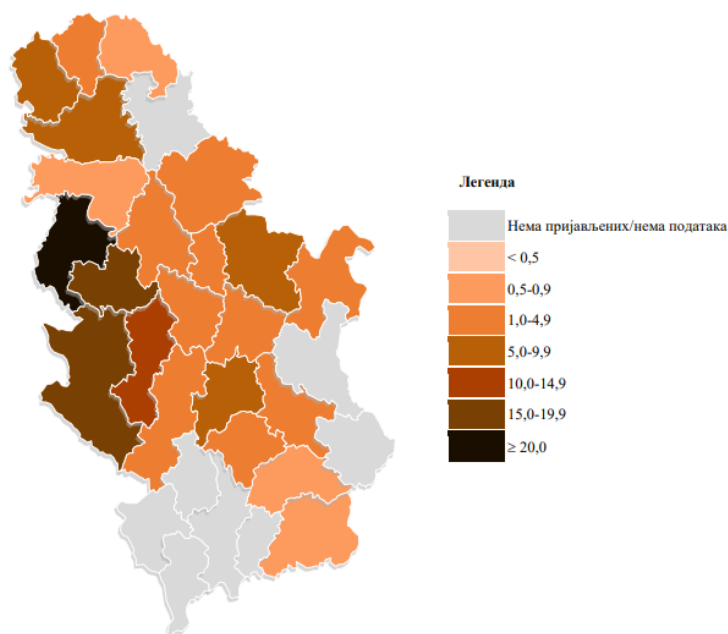
Лептоспироза је широко распрострањена зооноза коју изазивају спирохете из рода *Leptospira* [39]. Болест је присутна на свима континентима, сем Антарктика, код практично свих испитиваних врста сисара [2,19]. Током друге половине прошлог века дошло је до прогресивног смањења инциденције лептоспирозе код људи. Да би у другој деценији XX века дошло до пораста броја регистрованих случајева у развијеним земљама света Европе, посебно у урбаним срединама, повезано са експанзијом популације пацова у градовима [40].

Према годишњем епидемиолошком извештају Европског центра за спречавање и контролу болести у 2018. години регистровано је 802 случаја, у 2019. години 1049 случајева, а у 2020. години 565 случајева лептоспирозе код људи [39]. Што се тиче процене на светском нивоу, у 2015. години је било око један милион случајева код људи [38].

Према годишњим извештајима о заразним болестима у нашој земљи које издаје Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут“ лептоспироза је једна од најчешће регистрованих зооноза у Србији [41,42,43,44]. У 2021. години су регистрована 3 случаја са стопом инциденције од 0,04/100000 становника [41]. У 2020. години регистрована су 4 случаја лептоспирозе код људи [42], а 2019. године регистровано је 47 оболелих [43].

Максимална стопа инциденције у периоду од 2012 до 2021. године је регистрована 2014. године [41], када је регистровано 102 случаја са стопом инциденције од 1,42/100000 становника, што је последица мајских поплава услед обимних падавина, када је дошло до повећања популације мишоликих глодара [44].

У највећем броју случајева лептоспироза се јавља у популацији одраслих, поготово код старијих од 60 година, са већом учесталашћу у популацији мушкараца. Углавном се региструју спорадични случајеви са већом учесталашћу током лета и јесени [41,42,44].



Слика 11. Кумулативна стопа инциденције за лептоспирозу на 100000 становника за период 2012-2021. године, по окрузима Републике Србије [41]

Серолошке студије у европским земљама показују да се серопреваленција у здравој популацији коња креће у распону од 9,4 до 40,19%, са титром антитела од 1:100 и више када се примени МАТ [19]. Постоје извештаји о различитим вредностима серопреваленције лептоспирозе код коња у Европи и то од 1,5% у Италији [45], 58% у Швајцарској [46] или чак 79% у Холандији [47]. Оваква различитост у серопреваленцији може бити последица климатских фактора, са већим бројем откривених случајева током лета [48].

Највећи број случајева код коња и других домаћих животиња и људи повезан је са временским непогодама као што су поплаве у Чешкој и Србији [41]. Најчешће откривени серотипови у популацији здравих коња у Европи су *L. bratislava* и *L. icterohaemorrhagiae*. Претпоставља се да је коњ домаћин за одржавање серовара *L. bratislava*, а да су пацови резервоари за серовар *L. icterohaemorrhagiae* [19].

Код нас се лептоспироза региструје код свиња, оваца, коза, говеда, коња и паса, о чему говоре годишњи извештаји о кретању заразних болести за сваку годину појединачно. Па тако, у 2016. години регистровано је 2 жаришта са 5 инфицираних коња у Јужнобанатском округу [49]

Студија на подручју Војводине која је обухватила период од 2009. до 2018. године приказала је регистроване случајеве лептоспирозе људи и резултате серопреваленције лептоспирозе код домаћих животиња. Код коња је у испитиваном периоду укупна серопреваленција износила 1,59% од 1130 узорака [1]. У овом истраживању смо добили дискретно веће резултате серопреваленције лептоспирозе код коња, али на значајно мањем узорку прегледаних крвних серума коња.

На београдском епизоотиолошком подручју у периоду од 1998. до 2008. године обављено је серолошко испитивање 1701 крвног серума коња. Укупан број серопозитивних коња износио је 107 односно 6,29%, а титар специфичних антитела кретао се у опсегу од 1:100 до 1:10000. Велик број позитивних узорака имао је ниске титре антитела што може указивати на хроничан ток инфекције или да се ради о резидуалним антителима. У оквиру наведеног истраживања најзаступљенији сероваријетети били су: *L. grippotyphosa*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. canicola*, *L. bataviae* и *L. austalis*, док присуство *L. sejroe* није установљено [50].

У студији из Италије од 2007. до 2009. године обухваћено је 386 коња којима је урађен МАТ који показује да је укупна серопреваленција износи 1,5%. Пошто су коњи од којих су узети узорци били клинички здрави и нису имали у историји болести синдром повезан са лептоспирозом, откривени титри су највероватније резултат супклиничке инфекције [45].

У истраживању из 2011. године у Италији прикупљено је 747 крвних серума коња и 29,7% је било серопозитивно [51]. У студији из 2017. године на 134 коња са 43 фарме у северној Италији је 67,2% узорака проглашено за серопозитивно. Студија указује да је већи број случајева на ергелама где се не врши дератизација [52].

Током 1999-2007. године су истраживачи из Пољске радили МАТ на 1588 узорка крвног серума коња и 39% узорака је било серопозитивно [53]. У другој студији из 2021. године која је обухватила 615 арапских коња 33,2% је проглашено за серопозитивно у граничном титру од 1:100. Код 39 коња су применом МАТ пронађена 2 или више серотипова. Значајно већа серопреваленција је била у популацији коња која има више од 5 година старости [54].

У Швајцарској је 2011. године спроведена ретроспективна студија пресека да би се одредила серопреваленција код 615 клинички здравих коња и 58,5% је проглашено за серопозитивно, од тога је 20,3% имало титре антитела 1:400 и више [46].

У Холандији је 2003. у једној студији прикупљено 112 узорака крви клинички здравих коња и 79% је било серопозитивно, а доминантан серотип био је *L. copenhageni* [47].

У Хрватској је 2011. године обављено серолошко истраживање и прикупљени су узорци од коња различитих старости, раса и пола, и то од 2 групе коња, од клинички здравих коња и кобила које су имале побачаје. У првој групи прикупљено је 8059 крвних серума и 37,2% је серопозитивно, а најзаступљенији серотипови су *L. bratislava* (44,8%), па затим *L. pomona* (18,2%) и *L. icterohaemorrhagiae* (14,9%). У другој групи је прикупљено 59 крвних серума и 66,1% је серопозитивно, а најзаступљенији серотип је *L. bratislava* (43,2%), па затим *L. pomona* (29,7%) и *L. icterohaemorrhagiae* (10,8%). Резултати ове студије показују да су коњи у Хрватској врло изложени *Leptospira* spp, и да већина инфекција углавном има супклинички ток уз појаву абортуса код бременитих кобила [55]. У студији из 2007. године прикупљено је 1212 узорака крви копитара и 16,2% је проглашено серопозитивним [15]. У студији која је трајала десет година, прикупљено је 19732 узорка крви коња и од тога је 19,6% имало антитела против 1 или више серотипова *Leptospira* spp.

Пошто је студија обухватила и дивље месоједе и сваштоједе, попут црвене лисице, дивље свиње и мрког медведа, она указује да се серотипови *L. bratislava* и *L. australis* одржавају између дивљих животињских врста [56].

Студија у Француској је обухватила 22018 коња током 20 година, када је праћена серопреваленција лептоспирозе и у граничном титру од 1:200. Од укупног броја узорака 51,9% је проглашено серопозитивно, а доминантни серотипови су били *L. icterohaemorrhagie* и *L. australis* [57].

У Немачкој су истраживачи на 314 коња обавили студију којом су показали да је серопреваленција износила 17,2%. Није примећена значајна разлика у раси и старости коња у односу на серопозитивност, али је уочено да је већи број серопозитивних јединки био током лета [48].

У студији из Литваније која је обухватила коње и магарце током 2011-2015 године показује да серопреваленција износи 18,6%. Уочено је да 69,5% позитивних узорака припада женком полу [58].

У Израелу је 2017. године на једној фарми регистровано 7 серопозитивних коња од укупно 13 коња, а током исте године на 3 друге фарме утврђено је 14 серопозитивних од укупно 70 коња. Наредне године, урађена је студија на 337 коња са 29 фарми, при чему ниједан коњ није био серопозитиван [59].

У Ирану је урађено више студија везано за доказивање постојања серопозитивних коња у разним областима Ирана. Према студији из 2009. године узоркована је пуна венска крв од 95 коња и урађен је МАТ, а добијена је вредност серопреваленције од 41,05% [60]. Према студији из 2011. године на 390 коња, 38,2% је имало титре антитела 1:100 и више [61]. У току 2012. године урађено је истраживање на 90 коња и 7,7% је било серопозитивно [62], а током 2013. године прикупљено је 200 крвних серума коња и добијена је вредност серопреваленције 12% [63]. У 2020. години прикупљено је 167 узорака од којих је 9,6% било серопозитивно [64]. Већина вредности титара антитела у спроведеним студијама биле су у опсегу од 1:100 и 1:200 [60,61,63].



У Монголији има преко 2 милиона коња и сматрају се за једну од најважнијих домаћих животиња. У студији из 2013. године у 3 провинције, узети су узорци крви од 72 коња из степске области, 51 узорак из пустињске области и 58 из области са влажнијом климом. У првој области добијена вредност серопреваленције износи 16,7%, у другој 1,9% и у трећој 31%. Код свих серопозитивних коња титри специфичних антитела нису прелазили 1:200. Студија указује да влажна клима погодује опстанку лептоспира, спрам пустињске климе. Такође, резултати сугеришу да величина популације није фактор ризика, већ да су то географски услови [65].

У Индији је 2016. године спроведено истраживање на 15 коња којима су узети узорци. Добијена вредност серопреваленције износи 16% [66]. У другој студији исте године на 355 коња урађен је МАТ и добијена вредност серопреваленције износила је 76% [67]. Као серопозитивни су проглашени коњи чији титар антитела износи 1:100 и више [66,67].

Истраживање на 3 хиподрома током 2009. године из Јужне Кореје, које је обухватило 1226 коња показало је да серопреваленција износи 25% [68].

У Сједињеним Америчким Државама у студији из 2016-2017. године која је обухватила коње из држава Канзас, Мисури и Небраска од узоркованих 204 узорака, 77% је било позитивно применом МАТ при титру од 1:100 и више [69]. У држави Колорадо је 2020. године тестирано 124 коња и добијена вредност серопреваленције је 82% [11]. У Њујорку је 1998. године истраживање обухватило 2967 коња, од којих 1659 било позитивно на МАТ, односно добијена вредност серопреваленције износи 56% [70].

У Чилеу је 2015. године урађен МАТ из крвних серума 426 коња, и то 160 коња из градске средине и 266 коња из војске. Титар 1:100 и виши имало је 26,1% коња, односно 30,63% коња из градске средине и 23,31% коња из војске [71].



У Бразилу, у држави Сао Пауло је 2012. године обављено је истаживање на 714 узорака крви коња и резултати показују да је 17,9% коња серопозитивно [72]. У Рио де Женеиру је 2013. године у студији прикупљено 695 узорака пуне крви коња и 39,6% је било серопозитивно, након одрађеног микроскопског аглутинационог теста [73]. На североистоку Бразила урађене су 2 студије, једна током 2014. године на 204 коња са 16,2% серопозитивних [74], а друга током 2019. године на 1200 коња са 8% серопозитивних коња [75]. У држави Амазон је од 2018. до 2019. године прикупљено 198 узорака пуне крви коња и добијена вредност серопреваленције износила је 44,5% [76]. У јужном Бразилу је 2020. године обављена студија на 595 коња и добијена вредност серопреваленције износи 45,9% [77]. У граду Пелетасу у урбаној средини, у популацији радних коња, где се коњи користе за прикупљање хране и рециклажног материјала, 2020. године је прикупљено 119 узорака крви коња и 28,9% је проглашено серопозитивно са титаром антитела од 1:400 и вишим. Студија показује да су и коњи у урбаним срединама потенцијални преносиоци лептоспирозе на људе и друге животиње [78].

Што се тиче афричког континента, највећу популацију коња има Етиопија. Урађено је серолошко испитивања на 418 коња, од којих је 44% проглашено серопозитивним, са титром од 1:100 и вишим. Сви коњи су имали доступну речну воду за пиће и серопозитивни коњи су били старији коњи, од седам до дванаест година [79]. У Јужноафричкој републици је обављено истраживање на 663 коња из 3 провинције. При разређењу серума од 1:100 и више, вредност серопреваленције се кретала од 32 до 49% у зависности од регије. Утврђено је да су коњи који живе у непосредној близини шуме изложени већем ризику да буду серопозитивни [80]. Доминантан серотип у оба истраживања у Африци је *L. bratislava* [79,80].

У Новом Зеланду је спроведено прикупљање крви за МАТ током 2016. године и од 499 узорака крви од коња који се држе за трке и приплодна грла, позитивну реакцију је дало 125 односно 25% [81].

Нова Каледонија је острвска земља која има значајан проблем са лептоспирозом. У току 2013. године прикупљени су узорци од 25 коња, а 80% је било серопозитивно [83].

У Аустралији је 2013. године у студији на 429 коња са 172 имања 35% коња проглашено серопозитивно у разређењу крвног серума од 1:100 до 1:6400. Урађена је анализа за серотип *L. arborea* која је показала да није примећена значајна повезаност између серопозитивности и старости и расе коња, али на имањима где је забележена већа годишња количина падавина уочена је значајна повезаност са бројем серопозитивних коња на серотип *L. arborea* [82].

Према Правилнику о мерама за спречавање и сузбијање лептоспирозе животиња у нашој земљи оболелим од лептоспирозе се сматрају животиње код којих се при серолошком испитивању крви, односно микроскопском аглутинационом тесту утврди титар антитела од 1:100 и већи од 1:100 за било који серотип *Leptospira interrogans* или се изолује узрочник лептоспирозе из крви, урина или из побачених фетуса, односно њихових лешева и органа или се при клању, утврди постојање карактеристичних патоморфолошких промена, а лабораторијском дијагностиком утврди узрочник лептоспирозе. Такође, најмање једанпут годишње дијагностичком испитивању крви подлежу коњи у друштвеној својини и приплодни коњи код индивидуалних држаоца, зависно од епизоотиолшке ситуације. Извођење микроскопског аглутинационог теста врши се у специјалистичким ветеринарским организацијама. Обавезно се врши дијагностика у случају побачаја, у року од 12 сати (ако је резултат негативан, испитивање крвног серума поновити након 14 до 21 дан), угинућа животиња које су боловале са клиничким симптомима лептоспирозе или када се при клању животиња утврде промене које указују на постојање лептоспирозе [36].

У случају сумње на заразну болест коју треба обавезно пријавити, држалац животиње је дужан да то одмах пријави ветеринару или ветеринарском инспектору. Када добије информацију да постоји сумња на заразну болест, ветеринарски инспектор врши епизоотиолошки увиђај. Лептоспироза је сврстана у Листу заразних болести животиња које се обавезно пријављују, тек пошто је потврђено присуство лептоспирозе [84,85].

У случају побачаја, раног ембрионалног угинућа и рађања слабовиталних ждребади који угињавају у првим данима живота власник, односно држалац животиња, дужан да пријави ветеринару или ветеринарском инспектору који врше узорковање и слање узорака у надлежни специјалистички или научни институт.

Код кобила код којих је дошло до побачаја, врши се МАТ за утврђивање присуства лептоспирозе, а из побаченог патолошког материјала пореклом од фетуса ради се PCR или RT-PCR [86].

Према хрватском правилнику сумња на лептоспирозу копитара и могуће рековалесцентно клицоноштво се поставља код животиња са или без присутних клиничких симптома код којих се методом микроскопске аглутинације за било који серотип *Leptospira* spp. утврди титар антитела од 1:400 и виши, сем за серотипове *L. bratislava* и *L. austalis*, где је 1:200 и виши. Потврда лептоспирозе се заснива на томе да су присутни клинички знаци болести и да је урађен микроскопски аглутинациони тест код узетих парних серума, у размаку од 7 дана и да је утврђен четвороструки или виши титар антитела у другом крвном серуму или без клиничких знака болести када је утврђен титар антитела код копитара 1:800 или виши при једнократном узимању узорка [87].

У Сједињеним Америчким Државама након одређеног микроскопског аглутинационог теста за сумњиве се проглашавају једнике које имају титар антитела 1:400 и виши, а за серопозитивне са титром антитела 1:800 и вишим [88].

Интерпретација резултата МАТ има своја ограничења и специфичности. Крвни серуми који у разблажењу 1:100 дају позитивну реакцију, серијски се даље разблажују да би се одредио гранични титар. Ако се за разматрање узима један узорак крвног серума, дијагностички значај зависи од величине титра специфичних антитела, унакрсних реакција и присуства перзистентних аглутинишућих антитела у популацији. Веома високи титри антитела ( $\geq 1:1600$ ) указују на недавну инфекцију. Потврда тренутне инфекције је четвороструко повећање титра или сероконверзија код парних серума у интервалу између две до 6 недеља [30].

У подручјима где је није висока преваленција лептоспирозе, не очекује се да на тим подручјима у популацијама постоји висок резидуални титар специфичних антитела који је настао након ранијих, можда супклиничких инфекција, док је у ситуација у ензоотским подручјима лептоспирозе обрнута [12]. Притом треба напоменути да је увек нижи титар антитела на серотип који се еволуцијски прилагодио на одређеног домаћина [12,30].

У Сједињеним Америчким Државама сматра се да код 40% здравих коња постоје ниски титри специфичних антитела (1:100 до 1:200) на серотип *L. icterohemorrhagiae*, што може бити последица неспецифичних унакрсних реакција или чак неких других разлога који још нису идентификовани [30].

Други проблем у серолошкој дијагностици лептоспирозе представља парадоксална реакција, када долази до појаве највећег хуморалног имуног одговора на серотип који није главни серотип који је довео до инфекције. У крвном серуму у даљем току болести остаје исти или је у порасту титар антитела против серотипа који је изазвао инфекцију, док се титри против других серотипова постепено смањују [12].

Негативни налаз МАТ чак и у серијском узимању узорака не искључује могућност инфекције, пошто коњ може бити заражен са серотипом који није део дијагностичког панела. Узорци крви који су хемолизовани или липемични, могу да ометају тумачење теста [30].

Код животиња код којих је извршена имунизација против лептоспирозе, углавном постоје специфична антитела против серотипова присутних у вакцини. Ова чињеница се мора узети у обзир, па је врло важно испитати историју вакцинације животиња које се тестирају [10,30].

## 7.0. ЗАКЉУЧАК

На основу спроведеног истраживања и добијених резултата, закључено је следеће:

1. Серопреваленција лептоспирозе код коња на подручју Војводине износи 3,28%.
2. Од прегледаних крвних серума коња (укупно 61), применом микроскопског аглутинационог теста, два су била позитивна на антигене лептоспира са граничним титром специфичних антитела од 1:100.
3. Код коња под редним бројем 14. позитиван титар специфичних антитела је био пронађен на серотип *L. grippotyphosa*, а код коња под редним бројем 52. позитиван титар специфичних антитела је био пронађен на серотип *L. icterohaemorrhagiae*.
4. Коњ серопозитиван на *L. grippotyphosa* је женског пола, старости 12 година, расе липицанер са локалитета Келебија.
5. Коњ серопозитиван на *L. icterohaemorrhagiae* је кастрат, старости 17 година, расе нониус са локалитета Сот.

6. Заједничко за све коње је да су били клинички здрави при узорковању пуне венске крви, као и да немају у анамнези податке да су раније имали клиничке симптоме или знакове који би се могли повезати са лептоспирозом нити да су вакцинисани против лептоспирозе.
7. Код серопозитивних коња на антигене лептоспира се највероватније ради о присутним резидуалним антителима.
8. Коњи имају сличан начин држања и исхране, држе се у затвореном простору са повременим пуштањем у спољашњи испуст, испашу или ради рекреативног јахања и вожње кочије.
9. Сви коњи у околини имају контакт са стајаћим водама или реком.
10. У објектима за смештај коња се не спроводе планске и системске мере дератизације.
11. С обзиром на реалтивно мали број узорака који је обухваћен овим истраживањем, неопходна су даља испитивања која би укључила већи број узорака, тестирање парних серума, директне методе дијагностике, као и друге факторе ризика како би се стекла шира и јаснија слика о епизоотиолошкој ситуацији и преваленцији односно серопреваленцији лептоспирозе коња на подручју Војводине.

## **8.0. ЛИТЕРАТУРА**

1. Pustahija T, Vuković V, Ristić M, Savić S. et al. (2021): Epidemiological characteristics of leptospirosis in Vojvodina, Serbia; *Arhiv veterinarske medicine*, Vol. 14, No 1, Pages 1-14
2. Adler B. and de la Pena M. (2010): *Leptospira and leptospirosis*; *Veterinary Microbiology*, Elsevier, Vol. 140, Pages 287-296
3. Arent Z, Dubniewicz K, Plachno B.J. and Kotula-Balak M. (2022): *Leptospira taxonomy: then and now*; *Med. Weter* 78, Lublin, Pages 489-496
4. Radojčić S, Vlačić M and Đuričić B. (2011): *Infektivne bolesti životinja – specijalni deo*; *Fakultet veterinarske medicine*, Beograd, Pages 195-202
5. Hines M. (2014): *Equine infectious disease*, Second edition; *Saunder's Elsevier*, St. Louis, Pages 94, 236, 301-309
6. Lalošević V. (2011): *Mikrobiologija*; *Poljoprivredni fakultet*, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, Pages 193-197
7. Pusterla N and Higgins J. (2018): *Interpretation of Equine Laboratory Diagnostics*; *Wiley*, Hoboken, USA, Pages 203-206
8. Bhrati R, Nally E, Ricacaldi J, Matthias M. et al. (2003): *Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance*; *The Lancet Infectious Diseases*, Vol. 3 Pages 757-771
9. Van der Kolk (2013): *Infectious Diseases of the Horse*; *Manson publishing*, The Veterinary press, Florida, Pages 112-117

10. OIE Terrestrial Manual (2012): Leptospirosis, Chapter 3.1.12, Pages 1-10
11. Fagre A, Mayo C, Pabilonia K and Landolt G. (2020): Seroprevalence od *Leptospira* spp. in Colorado equids and association with clinical disease; Journal od Veterinary Diagnostic Investigation, Vol. 32, Pages 718-721
12. Milas Z, Turk N, Štritof Majetić Z, Habuš J, Mojčec Perko V Barbić Lj, Stevanović V, Perharić M. and Starešina V. (2013): Dijagnostika i suzbijanje leptospiroze konja u Hrvatskoj; Hrvatski veterinarski vjesnik, Vol 21, Pages 1-6
13. Trailović D. (2011): Bolesti kopitara; Fakultet veterinarske medicine u Beogradu, Beograd, Pages 295-296
14. Turk N, Milas Z, Margaletić J, Starešina V, Slavica A. et al. (2003): Molecular characterisation of *Leptospira* spp. stains isolated from small rodents in Croatia, Epidemiological Infect: Vol. 130, Pages 159-166
15. Habuš J, Cvetić Ž, Milas Z, Balen-Topić M, Margaletić J. and Turk N. (2008): Seroepidemiological and Seroepizootiological Investigation of Leptospirosis in Croatia in 2007; Infektološki glasnik, Vol. 28, No 4, Pages 183-188
16. Cole C, Bradford B. and Maxwell L. (2014): Equine Pharmacology; Wiley, Iowa, Pages 266-267, and 296-297
17. Verma A, Stevenson B. and Adler B. (2013): Leptospirosis in horses; Veterinary Microbiology, Elsevier, Vol. 167, Pages 61-66
18. Hines M. (2007): Equine infectious diseases; Saunders-Elsevier, St. Louis, Pages 302-309
19. Malalana F. (2019): Leptospirosis in horses: A European perspective; Equine Veterinary Journal, Vol. 51, Pages 265-286
20. McGavin M.D. and Zachary J. (2007): Pathologic Basis od Veterinary Disease, fourth edition; Mosby-Elsevier, New York, Pages 359, 487-489, 134-135, 996 and 1092



21. Felipe M. J. (2016): *Equine Clinical Immunology*; Wiley; New York, Pages 87, 124 and 285
22. Verma A, Matsunaga J, Artiushin S, Pinne M. et al. (2012): Antibodies to a Novel leptospiral protein LruC, in the Eye Fluids and Sera of horses with *Leptospira*-Associated Uveitis; *Clinical and Vaccine Immunology*, Vol. 19, Pages 452-456
23. Donahue J. and Williams N. (2000): Emergent Causes of Placentitis and Abortion; *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, Elsevier, Vol. 16, Pages 443-456
24. Helmerhorst F, van Tol N, Tuinman R, de Vries J, Grobusch P. and Hovius W. (2012): Severe pulmonary manifestation of leptospirosis; *The Netherlands Journal of Medicine*, Vol. 70, Pages 215-221
25. Pinna A, Martins G, Hamond C, Medeiros MA and de Souza G.N. (2015): Potential differences between *Leptospira* serovars, host-adapted (Bratislava) and incidental (Copenhageni), in determining reproductive disorders in embryo transfer recipient mares in Brazil; *Veterinary Record*, Vol. 174, Issue 21, Page 531
26. Wood J. N. (1994): How important are leptospiral infections as a cause of equine disease; *Equine Veterinary Journal*, Vol. 26, Page 88
27. Jovanović M, Aleksić-Kovačević S. and Knežević M. (2012): Specijalna veterinarska patologija; *Udruženje veterinarskih patologa*, Beograd, Pages 241 and 422
28. Fouché N, Graubner C, Lanz S, Schweighauser A, Francey T and Gerber V (2020): Acute kidney injury due to *Leptospira interrogans* in 4 foals and use of renal replacement therapy with intermittent hemodiafiltration in 1 foal; *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Vol. 34, Pages 1007–1012
29. Deborah M, Williams B, Smith J, Donahue M. and Poonacha B. (1994): Serological and microbiological findings on 3 farms with equine leptospiral abortions; *Equine Veterinary Journal*, Vol. 26, Pages 105-107
30. Animal Health Diagnostic Center (2016): *Leptospira Microagglutination Testing*; Cornell University, College of Veterinary Medicine, Ithaca, Pages 1-2

31. Ye C, Yan W, McDonough P.L, McDonough S.P, Mohamed H, Divers T.J, Chang Y.F, and Yang Z. (2022): Serodiagnosis of equine leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assay using four recombinant protein markers; *Clinical Vaccine Immunology*, Vol. 21, Pages 478-483
32. Hamond C, Martins G, Loureiro F. et al. (2014): Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock; *Veterinary Research Communications*, Vol. 38, Pages 81–85
33. Gigeuere S, Prescott J. and Dowling P. (2013): *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, Fifth Edition; Wiley, Iowa, Pages 429-430
34. Bertone J. and Horspool L. (2004): *Eqine clinical pharmacology*: Saunders-Elevier, St. Luis, Pages 221, 237-239
35. Ackermann K, Kenngott R, Settles M, Gerhards H, Maierl J. and Wollanke B. (2021): In Vivo Biofilm Formation of Pathogenic *Leptospira* spp. in the Vitreous Humor of Horses with Recurrent Uveitis. *Microorganisms*, Vol. 9, Page 9
36. Savezni komintet za poljoprivredu SFRJ (1988): Pravilnik o merama za suzbijanje i iskorenjivanje leptospiroze životinja; Službeni list SFRJ, broj 6/88
37. Munoz-Zanzi C, Groene E, Morawski BM, Bonner K, Costa F, Bertherat E and Schneider MC. (2020): A systematic literature review of leptospirosis outbreaks worldwide, 1970-2012, *Rev Panam Salud Publica*, Vol.44, Page 78
38. Costa F, Hagan J.E, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira M.S. et al. (2015): Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review; *PloS Negl Trop Disease*, Published online, Page 9
39. European Centre for Disease Prevention and Control (2022): Leptospirosis; *Annual Epidemiological Report for 2020*; Stockholm, Pages 1-6
40. Doupouey J et al. (2014): Human leptospirosis: An emerging risk in Europe; *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease*, Vol. 3. Pages 77-83

41. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ (2022): Izvešaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2021. godinu; E-izdanje, Beograd, Pages 54-56
42. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ (2021): Izvešaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2020. godinu; E-izdanje, Beograd, Pages 60-62
43. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ (2020): Izvešaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2019. godinu; E-izdanje, Beograd, Pages 43-46
44. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ (2015): Izvešaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2014. godinu; E-izdanje, Beograd, Pages 47-48
45. Ebani V, Bertelloni F, Pinzauti P. and Cerri D. (2012): Seroprevalence of *Leptospira* spp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Italian horses; Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Pisa, Italy, Pages 1-4
46. Blatti S, Overesch G, Gerber V, Frey J and Hussy D. (2011): Seroprevalence of *Leptospira* spp. in clinically healthy horses in Switzerland; *Sweiz Arch. Tierheilk*, Vol. 153, Pages 449-456
47. Houwers D.J, Goris M.G, Abdoel T, Kas J.A, Knobbe S.S. et al. (2011): Agglutinating antibodies against pathogenic *Leptospira* in healthy dogs and horses indicate common exposure and regular occurrence of subclinical infections; *Veterinary Microbiology*, Elsevier, Vol. 148, Pages 4449-451
48. Pikalo J, Sattler T, Eichinger M, Loitsch A, Sun H. and Schmoll F. (2016): Occurrence of antibodies against *Leptospira* in horses in Middle Germany; *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, Vol. 129, Pages 202-208
49. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Uprava za Veterinu (2016): Izveštaji o kretanju zaraznih bolesti životinja za 2016. godinu; E-izdanje, Beograd, Pages 4-5
50. Vojinović D. et al. (2009): Seroprevalence of leptospirosis in horses in the territory of Belgrade during the period from 1998 to 2008; *Veterinarski glasnik*, Pages 163-169

51. Tagliabue S, Figarolli B.M. et al. (2016): Serological surveillance of Leptospirosis in Italy: two-year national data (2010-2011); *Veterinaria Italiana*, Brescia, Vol. 52, Pages 129-136
52. Vera E, Taddei S, Cavirani S, Schiavi J, Angelone M. et al. (2020): *Leptospira* Seroprevalence in Bardigiano Horses in Northern Italy; *Animals* 2020, Vol. 10, Pages 1-11
53. Arent Z. J and Kadziarska-Mieszowska S. (2013): Seroprevalence study of leptospirosis in horses in northern Poland; *The Veterinary Record*, London, Vol 172, Pages 1-3
54. Wasinski B, Paschalis-Trela K. et al. (2021): Serological Survey of *Leptospira* Infection in Arabian Horses in Poland; *Pathogenes* 2021, Vol. 10, Pages 1-6
55. Turk N, Milas Z, Habuš J, Štritof Majetić Z, Mojčec Perko V. and Starešina V. (2013): Equine leptospirosis in Croatia – occurrence of subclinical infections and abortions; *Veterinarski arhiv*, Vol 83, No 3, Pages 253-262
56. Milas Z, Štritof Majetić Z, Habuš J, Mojčec Perko V, Starešina V, Barbić Lj, Stevanović V, Perharić M, Ljubić B and Turk N. (2013): The occurrence and maintenance of *Leptospira* serovars Australis and Bratislava in domestic and wild animals in Croatia; *Veterinarski arhiv*, Vol 83, No 4 Pages 357-369
57. Andre-Fontaine G. (2016): Leptospirosis in domestic animals in France: serological results from 1988 to 2007; *Scientific and Technical Review*, Vol. 35, Pages 11-12
58. Stankevičienė M, Buitkuvienė J, Bartaševičiūtė N, Adomkienė R. and Statkevičiūtė J. (2016): Seroepizootic survey of leptospirosis in horses; *Veterinarija ir zootechnika*, Vol 74, Pages 1-3
59. Tirosh-Levy S, Baum M, Shvartz G. et al. (2021): Seroprevalence of *Leptospira* spp. in Horses in Israel, *Pathogenes* 2021, Israel, Pages 1-9
60. Hassanporu A, Monfared N, Abdollahpour G. R. and Satari S. (2009): Seroprevalence of leptospiral infection in horses in Tabriz – Iran; *Journal of Bacteriology*, Vol. 8, Hanover, Pages 97-100

61. Hassanpour A. and Safarmashaei S. (2012): Seroprevalence of leptospiral infection in horses, donkeys and mules in East Azerbaijan; African Journal of Microbiology Research, Vol. 6, Pages 4384-4387
62. Khousesheh Y, Hassanpour A, Abdollahpour G.R and Mogaddam S. (2012): Seroprevalence of *Leptospira* Infection in Horses in Ardabil-Iran; Global Veterinaria, Pakistan, Pages 586-589
63. Dashilboron J, Hassanpour A. and Abdollahpour G. R. (2013): Serological Study of Leptospirosis in Horses in Gonbad, Iran; Global Veterinaria, Vol. 10, Pages 51-54
64. Zaman N, Hassanpour A. and Abdollahpour A. (2020): Serologic prevalence of leptospiral infection in the horses in Kurdistan Province in Iran; Journal of Zoonotic Diseases, Vol. 4, Pages 25-38
65. Odontsetseg N, Boldaatar D. et al. (2005): Serological prevalence of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava in horses in Mongolia; Veterinary Record, Vol. 157, Pages 518-519
66. Bojiraj M, Porteen K, Gunaseelan L. and Suresh Kennan S. (2016): Cross sectional study to assess the prevalence of leptospirosis from urban population of equines; Journal of Cell and Tissue Research, Vol. 16, Pages 5643-5648
67. Naseema U, Vairamuthu S. Balachandran C. and Ravikumar G. (2017): Seroprevalence of Leptospirosis in Horses in Chennai; Indian Veterinary Journal, Vol 94, Pages 44-46
68. Jung B.Y, Lee K.W and Ha T.Y. (2009): Seroprevalence of *Leptospira* spp. in Clinically Healthy Racing Horses in Korea; The Journal of Vet. Medical Science, Seoul, Page 7
69. Trimble A, Blevins C, Beard L, Deforno A and Davis E. (2018): Seroprevalence, frequency of leptospiuria, and associated risk factors in horses in Kansas, Missouri, and Nebraska from 2016-2017; Kansas State University, Kansas, Pages 41-46
70. Barwick R, Mohammed H, Atwill E, McDonough P and White M. (1998): Prevalence of Equine Leptospirosis in New York State; Journal Equine Sci, Vol. 9, Pages 119-124

71. Tadić T, Tapia K. and Gonzales D. (2016): Seroprevalence of *Leptospira* spp. in Working Horses Located in the Central Region of Chile; *Journal of Equine Veterinary Science*, Elsevier, Vol 38, Pages 14-18
72. Coiro C, Langoni H and da Silva R. (2012): Epidemiological Aspects in the *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* Infection in Horses from Botucatu, Sao Paulo, Brazil; *Journal of Equine Veterinary Science*, Elsevier, Vol 32, Pages 620-623
73. Martinis G. and Lilenbaum W. (2013): The panorama of animal leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil, regarding the seroepidemiology of the infection in tropical regions; *BMS Veterinary Research*, Rio de Janeiro, Pages 1-7
74. De Oliveira Filho R. et al. (2014): Epidemiological Analysis of *Leptospira* spp. Infection in Equids from the Brejo Paraibano Microregion of Brazil; *Journal of Equine Veterinary Science*, Elsevier, Vol. 34, Pages 407-414
75. Siqueira C, Fraga D. et al. (2019): Seroprevalence and risk factors associated with equine leptospirosis in the metropolitan region of Salvador and Reconcavo Baiano region, Bahia state (NE Brazil); *Tropical Animal Health and Production*, E-pub, Vol 52, Pages 31-39
76. Freitas de Sousa I.K, Gastro Silva R.L. et al. (2019): Frequency of leptospirosis in horses in Manaus and metropolitan region in Amazonas State, Brazil; *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, Curitiba, Vol. 57, Pages 1-7
77. Da Silva A. et al. (2020): *Leptospira* spp. in horses in southern Brazil: Seroprevalence, infection risk factors, and influence on reproduction; *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Elsevier, Vol. 73, Pages 3-23
78. Dawes C, Fortes P, Machado B. et al. (2020): Prevalence and risk factors associated with equine leptospirosis in an endemic urban area in Southern Brazil; *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, Vol. 6, No. 8, Pages 58381-58388
79. Tsagay K, Potts A, Aklilu N. and Lotter C. (2016): Circulating serovars of *Leptospira* in cart horses of central and southern Ethiopia and associated risk factors; *Preventive Veterinary Medicine*, Elsevier, Vol. 125, Pages 106-115

80. Simbizi V, Saulez M.N, Potts A and Lotter C. (2016): A study of leptospirosis in South African horses and associated risk factors; Preventive Veterinary Medicine, Elsevier, Vol. 134, Pages 6-15
81. Bolwell C, Rogers C, Benschop J. et al. (2020): Seroprevalence of *Leptospira* in Racehorses and Broodmares in New Zealand; Animals 2020, Vol. 10, Pages 11-14
82. Wangdi C, Picard J, Tan R, Condon F, Dowling B and Gummow B. (2013): Equine leptospirosis in tropical Northern Queensland; Australian Veterinary Journal, Vol. 91, Pages 190-197
83. Roqueplo C, Cabre O, Davoust B and Kadjo A. (2013): Epidemiological Study of Animal Leptospirosis in New Caledonia; Vet. Medicine Interinational, Vol. 2013, Pages 1-7
84. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i poljoprivrede (2006): Pravilnik o Listi naručito opasnih zaraznih bolesti životinja i Listi zarzanih bolesti životinja koje se obavezno prijavljuju, kao i o načinu njihove prijave i odjave; Službeni glasnik R. Srbije, br. 49/2006
85. Stojanac N. (2017): Zakonski propisi u veterinarskoj medicini; Poljoprivedni fakultet, Novi Sad, Pages 63-72
86. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede (2022): Pravilnik o utvđivanju Programa mera zdravstvene zaštite životinja za 2022. godinu; Službeni glasnik R. Srbije br. 27/22, Page 27
87. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (2011): Pravilnik o merama za suzbijanje iskorenjivanje leptospiroze životinja; Službeni list R. Hrvatske, NN 89/11
88. Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory (2015): Leptospirosis Titer Interpretation, For Large Animals; University of Wisconsin-Madison, Madison, Page 1