

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Laboratorní diagnostika patogenních leptospir

(Bakalářská práce)

Jméno: Andrea Šlajchová

Vedoucí: PharmDr. Barbora Voxová

Školitel: MVDr. Zuzana Čermáková, Ph.D.

Hradec Králové 2009

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

V Hradci Králové, dne 10. 5. 2009

.....

Andrea Šlajchová

Mé poděkování patří MVDr. Zuzaně Čermákové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a podnětné připomínky, které mi při konzultacích poskytla.

Obsah:

1	Úvod.....	5
2	Teoretická část.....	6
2.1	Morfologie leptospir.....	6
2.2	Růstové faktory.....	6
2.3	Klasifikace leptospir	7
2.3.1	Genotypická klasifikace	7
2.4	Epidemiologie	9
2.5	Patogeneze.....	10
2.6	Klinické projevy	11
2.6.1	Charakteristika anikterické a ikterické formy leptospirózy.....	12
2.6.2	Weilova choroba	13
2.6.3	Žňová horečka	13
2.6.4	Stuttgartská choroba.....	14
2.7	Laboratorní diagnostika leptospir.....	14
2.7.1	Mikroskopie	15
2.7.2	Kultivace leptospir.....	15
2.7.3	Sérologický průkaz	15
2.7.4	Molekulárně biologická identifikace leptospir	16
2.8	Léčba leptospirózových onemocnění.....	17
2.9	Prevence.....	18
3	Praktická část.....	19
3.1.1	Sérologie	20
3.1.2	Metoda PCR	21
4	Diskuze	22
5	Použité zkratky:.....	24
6	Literatura:.....	25

1 Úvod

Leptospiróza je horečnaté onemocnění, jehož vyvolavatelem jsou patogenní leptospiry. Vyskytuje se na celém světě (nejčastěji v tropech a subtropích, ale rovněž na území České republiky) a postihuje lidi i zvířata.

Rezervoárem leptospir jsou divoce žijící zvířata (převážně hlodavci, někteří hmyzožravci a drobní zemní savci) a domácí zvířata. Člověk se nakazí nejčastěji vodou kontaminovanou močí zvířat, kontaktem s půdou, potravou a nebo kontaktem s infikovanými zvířaty. Infekce leptospirami jsou řazeny z tohoto důvodu mezi zoonózy, tedy mezi onemocnění přenosné ze zvířat na člověka.

Ve zvýšené míře jsou nákaze vystaveni zemědělci, pracovníci na jatkách, veterináři, řezníci a pracovníci v kanalizacích. Vstupní branou infekce je trávicí trakt, dýchací trakt nebo poraněná kůže a sliznice.

Výskyt onemocnění je spíše sporadický, epidemický výskyt u nás ovlivňují hlavně dva přírodní jevy a to přemnožení drobných hlodavců a záplavy (1).

Průběh onemocnění může být mírný s nespecifickými příznaky, ale i závažný.

Ke klinicky nejvýznamnějším projevům nemoci patří hepatorenální selhání s celkovým metabolickým rozvratem, rovněž meningitidy a asi v 10 procentech případů také pneumonie. Nejtěžší průběh je obvykle pozorován u infekce sérovaru *L.icterohaemorrhagiae* a tato infekce je nazývána Weilovou nemocí.

K diagnostice patogenních leptospir se nejčastěji používá sérologických metod a v posledních letech i přímého průkazu metodou PCR.

Nejvýznamnější sérologickou metodou je MAT-mikroskopický aglutinační test (rovněž nazývaný mikroaglutinace-lýza – MAL). Tato metoda je uznávána jako „zlatý standard“ v diagnostice leptospirózy. Své využití má i ELISA metoda, která slouží jako screeningová metoda, ale její výsledky musí být dále ověřeny a v České republice není využívána (1). Dříve byla prováděna kultivace ve vhodném médiu. Vzhledem k pomalému množení leptospir je nyní využívána především metoda PCR, která slouží k průkazu specifických sekvencí DNA jednotlivých genetických druhů patogenních leptospir. Citlivá, specifická a rychlá PCR reakce umožňuje přímou identifikaci mikroba.

Hlavním cílem předkládané práce je porovnání a popis metod MAL (mikroaglutinace-lýza) a PCR u pacientů s pozitivní diagnózou od roku 2002 do konce roku 2008.

2 Teoretická část

2.1 Morfologie leptospir

Leptospiry jsou pohyblivé, obligátně aerobní spirochety, které mají vlastnosti gram-pozitivních i gram-negativních bakterií (2). Jejich délka se udává v rozmezí 6 - 20 μm a šířka 0,1-0,25 μm . Obvykle jsou rovné nebo jsou na jednom nebo na obou koncích zahnuté. Charakteristický je pro ně velmi aktivní šroubovitý pohyb. Z místa na místo se leptospiry přemísťují klouzavě.

V tekutém médiu je jejich pohyb klikatý, včetně rotací a flexí (3). Vzhledem k tomu, že je průměrná velikost leptospir menší než střední vlnová délka světla, nejsou viditelné ve světelném mikroskopu. Proto se pro jejich pozorování využívá mikroskopie v zástinu (v temném poli).

Pro obarvení leptospir je nejvhodnější impregnace stříbrem, lze také využít imunofluorescenčních metod (4).

2.2 Růstové faktory

Leptospiry jsou obligátně aerobní mikroorganismy. Rostou v teplotě 28-30°C, při optimálním pH 7,2- 7,6 (3). Jejich množení je pomalé a růst je zřetelný až po dvou až třech týdnech (5).

Ke kultivaci leptospir jsou nutné vitamíny B1 a B12, amoniové soli a dlouhé řetězce mastných kyselin. Mastné kyseliny slouží jako hlavní zdroj energie a jsou také důležité jako zdroj buněčných lipidů, které leptospiry neumějí syntetizovat. Amoniové soli jsou zdrojem dusíku (3). Selektivní půdy jsou vyráběny s přísádky různých antibiotik (5-fluorouracil, neomycin sulfát, rifampicin, vankomycin). Běžně se používá Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris půda, která obsahuje 1% hovězí sérový albumin a Tween 80, jenž slouží

jako zdroj mastných kyselin. Ke kultivaci leptospir jsou rovněž používány různé polotuhé a tekuté kultivační půdy (Korthofovo médium) (2).

2.3 Klasifikace leptospir

Rod *Leptospira* patří společně s rodem *Leptonema* do čeledi *Leptospiraceae* z řádu *Spirochaetales*. Řád *Spirochaetales* obsahuje ještě čeleď *Spirochaetaceae*, která zahrnuje rody *Spirochaeta*, *Cristispira*, *Treponema*, *Borrelia* (6). Ke klasifikaci leptospir se využívá genotypická a sérologická klasifikace.

2.3.1 Genotypická klasifikace

Tato klasifikace je založena na příbuznosti DNA rodu *Leptospira*.

Genomospecies nejsou shodné se sérologickou klasifikací a v jednom species se vyskytují patogenní i nepatogenní sérovary (7).

V současné době je sérologicky charakterizováno asi 330 sérotypů (sérovarů) rodů *Leptospira* a *Leptonema*, které se řadí do 23 příbuzných séroskupin. Kmeny byly rozděleny do 17 DNA hybridizačních skupin představující 12 již popsaných species a 5 nových genomospecies. Největší skupiny tvoří druhy *L. interrogans* (91 kmenů z 82 sérovarů), *L. santarosai* (65 kmenů z 59 sérovarů), *L. borgpetersenii* (49 kmenů z 43 sérovarů), *L. kirschneri* (29 kmenů z 26 sérovarů) a *L. noguchi* (20 kmenů z 20 sérovarů). Nové genomospecies zahrnují *Leptospira genomospecies* 1 až 5 a celkem obsahují 11 sérovarů (8).

V České republice byly dosud izolovány tyto leptospirové sérovary: *L.icterohaemorrhagiae*, *L.grippotyphosa*, *L.copenhageni*, *L.sejroe*,*L.bratislava*, *L.pomona*, *L.sorex-jalná*, *L.canicola*, které patří do druhů *L.interrogans*, *L.borgpetersenii* a *L.kirschneri* (11).

Mezi metody, které slouží k molekulární typizaci, patří polymorfismus délky restričních fragmentů, charakteristika DNA štěpů pro sérovary (Fingerprinting), genové sekvence a sondy, DNA-DNA hybridizace (9).

Polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP) je metoda charakterizace DNA pomocí jejího štěpení restričními endonukleázami na fragmenty. Identifikace štěpných produktů se pak provádí pomocí elektroforézy. Je známo

velké množství restričních endonukleáz, které štěpí sekvence nukleotidů v různých restričních místech na různě dlouhé fragmenty podle individuálního pořadí bazí a podle rozpoznávací sekvence. Za daných podmínek vzniká reprodukovatelný počet restričních fragmentů o reprodukovatelném počtu bazí. Počet a délka fragmentů je specifická (10).

Nedostatek fenotypových charakteristik dostupných pro genotypickou klasifikaci leptospir je příčinou toho, že se nejvíce používá sérologická diagnostika založená na mikroskopickém aglutinačním testu. Tato metoda slouží jak k identifikaci, tak ke klasifikaci.

Přehled sérovarů zjištěných v ČR a na Slovensku ukazuje tab.č. 1

Tab. 1.

Sérovar	Hlavní onemocnění	Hlavní hostitel
<i>L. Icterohaemorrhagiae</i> <i>L. copenhageni</i>	Weilova choroba Ikterická leptospiróza	Potkan, krysa
<i>L. grippotyphosa</i>	Polní, vodní horečka	Hraboš polní
<i>L. sejroe</i>	Polní horečka	Myš domácí, myšice
<i>L. pomona</i>	Nemoc pasáků vepřů	Prase domácí, myšice
<i>I. sorex-jalna</i>	Anikterická leptospiróza	rejsek
<i>L. bratislava</i>	Anikterická leptospiróza	ježek
<i>L. canicola</i>	Stuttgartská choroba psů	Pes, prase
<i>L. arboreae</i>	Anikterická leptospiróza	Myš domácí, myšice
<i>L. bataviae</i>	Horečka rýžových polí	Myška drobná
<i>L. jalna</i>	Anikterická leptospiróza	Myšice
<i>L. tarassovi</i>	Nemoc pasáků vepřů	Prase domácí
<i>L. hardjo</i>	-----	Hovězí dobytek

2.4 Epidemiologie

Leptospiroza je zoonóza vyskytující se prakticky na celém světě. Vyskytuje se v subtropických, tropických i mírných pásmech (3). Leptospiroza se v mírných oblastech vyskytuje převážně v létě a na podzim a v tropech a subtropech hlavně v období dešťů. Zvýšený výskyt onemocnění může být ovlivněn např. migrací obyvatel a také zdokonalením diagnostických metod, které vedou k zlepšení detekce tohoto onemocnění (14).

Zdrojem infekce u lidí je přímý nebo nepřímý kontakt s močí infikovaných zvířat (5). Leptospiry nejčastěji osidlují ledviny potkanů, krys, koček, psů, prasat, dobytka, veverek, ježků a drobných hlodavců (6). Hlavním rezervoárem leptospir jsou malí savci, především hlodavci (12). Rezervoároví hostitelé leptospir jsou definováni jako druhy, u kterých je infekce endemická a je obvykle přenášena přímým kontaktem ze zvířete na zvíře. Infekci získá zvíře v mládí a vylučování leptospir močí roste až do jeho stáří. Jiní živočichové popř. člověk se mohou infikovat přímým nebo nepřímým kontaktem s tímto rezervoárovým zvířetem (5). Jednotlivé druhy makroorganismů mohou přenášet různé sérovary (6). Například *L. pomona* a *L. interrogans* se vyskytují u dobytka a prasat, *L. grippotyphosa* u dobytka, ovcí, koz a hrabošů. *L. ballum* a *L. icterohaemorrhagiae* se nachází u potkanů a myší. *L. canicola* je spojována se psy (13). Leptospiroza se u rezervoárových zvířat neprojevuje klinickými příznaky (6), ale u některých vnímavých druhů může probíhat stejně dramaticky jako u člověka. Infekce sérotypem *L. icterohaemorrhagiae* je pro domácího psa smrtelná. Leptospiry přežívají v ledvinných tubulech rezervoárových živočichů v symbiotickém vztahu bez jakéhokoliv ledvinného poškození (13), ti je pak mohou vylučovat močí po celý život (2). Infikovaná moč je hlavním zdrojem patogenních zárodků a tedy zdrojem infekce.

Přímý kontakt s infikovanými zvířaty se týká převážně farmářů, veterinářů, jatečních zaměstnanců, inspektorů masa a dalších.

Nepřímý kontakt přes kontaminovanou vodu nebo půdu je mnohem častější než přímý kontakt (14). Je významný zejména u pracovníků v kanalizacích a stokách, u horníků, vojáků, čističů jímek, farmářů, myslivců, pracovníků na rýžových a banánových polích (5). Tento přenos je ovlivněn vnějším prostředím

(teplotou a pH), ve kterém leptospiry přežívají (5). Nejlépe přežívají v čerstvé vodě, vlhké alkalické půdě, vegetaci a v bahně při teplotě vyšší než 22°C (13). Člověk se může nakazit leptospirami při zaměstnání, rekreaci nebo při jiných venkovních aktivitách (5). Zaměstnání je velmi rizikovým faktorem. Onemocnění bylo dříve spojováno zejména s lidmi, kteří pracovali v hutnictví, v zemědělství, v přírodě, na údržbě stok a chovali dobytek. V dnešní době jsou rizika snížena na minimum díky používání ochranných pracovních pomůcek (2).

Mezi nejnebezpečnější rekreační aktivity, vzhledem k nákaze leptospirami, patří cestování do tropických oblastí, vodní sporty, pěší turistika, myslivost, rybaření a další venkovní sporty, při kterých je možné přijít do kontaktu s kontaminovanou vodou nebo půdou (13).

Leptospiry vnikají do organismu přes různé odřeny a poranění kůže, přes spojivku. Infekce se může do těla dostat i při dlouhodobém máčení kůže v kontaminované vodě. Vstupní branou nákazy může být i respirační trakt (5) a trávicí ústrojí, především dutina ústní a jícn. V žaludku už je příliš nízké pH, ve kterém leptospiry hynou (13). Lidé jsou většinou posledními hostiteli leptospirózy (6).

2.5 Patogeneze

Po průniku leptospir do organismu se leptospiry pomnožují v krvi a krevním oběhem se dostávají do celého organismu. K bakteriémii dochází za 3-8 dní po vniknutí infekce do organismu. V této době je možné izolovat leptospiry z krve popř. z mozkomíšního moku (15). Pak následuje fáze imunní, za kterou je zodpovědný lipopolysacharid vnější membrány leptospir, který je vysoce imunogenní. Dále tento lipopolysacharid stimuluje přilnavost neutrofilů k endotelovým buňkám a destičkám, čímž dojde k agregaci a trombocytopenii (5). Protilátky se objevují v druhém týdnu onemocnění (15).

Leptospiry poškozují především ledviny, játra, srdce, oči, plíce a nervový systém. V těchto orgánech dochází k vaskulitidě kapilár, projevuje se endoteliálním otokem, nekrózou s lymfocytární infiltrací (6). Pro poškození ledvin je charakteristická intersticiální nefritida s infiltrací neutrofilů a monocytů. Jaterní poškození je provázeno cetrilobulární nekrózou s hyperplázií nebo

hypertrofií Kupfferových buněk (5). V důsledku dysfunkce jater se může objevit i žloutenka. V plicích dochází k poškození alveolárních kapilár a v místě vaskularizace k otoku a ke krvácení (6). Přední komora oční je postižena během akutní infekce (16). Leptospiry mohou proniknout i do komorové tekutiny, ve které mohou přežívat několik měsíců (6). Poškození nervového systému je převážně na imunologickém podkladě. Dochází ke vzniku exudátů, leptomeningeálních edémů a ke krvácení (17).

2.6 Klinické projevy

Příznaky leptospirózy jsou často nespecifické (bolesti hlavy, svalů, horečka, bolest břicha) připomínající chřipkové onemocnění.

Popsány jsou dvě formy leptospirózy, a to anikterická mírná forma onemocnění a ikterická forma, označována jako Weilova choroba, která se projevuje hepatorenálním selháváním (18).

Na území České republiky většina leptospiróz probíhá lehce, vyskytují se jako tzv. letní chřipky. Nemoc není proto často diagnostikována (19). Průběhy infekcí mají různou podobu v závislosti na sérotypu leptospir (20). U lidí jsou těžké formy leptospirózy často způsobovány sérovary ze séroskupiny *L.icterohaemorrhagiae*. Inkubační doba onemocnění bývá v průměru 10 dní (21).

Onemocnění má typický dvoufázový průběh. Pro první fázi, která trvá 4-7 dní, je charakteristická leptospiremie a přítomnost horečky, únavy, bolesti svalů, zad, břicha, nauzea a zvracení. Leptospiry se dají v této fázi prokázat v krvi, mozkomíšním moku i v tkáních postižených orgánů.

V druhé fázi dochází k tvorbě protilátek, které slouží k detekci onemocnění, popř. lze izolovat leptospiry z moči (5, 13). Imunní fáze se nemusí vždy vyskytnout, je pro ní typický zvýšený titr protilátek. Následně dochází k infiltraci napadených orgánů buňkami charakteristickými pro zánět (leukocyty, neutofily, monocyty) (2).

Další z příznaků této fáze je dysfunkce ledvin a aseptická meningitida (6). Horečka a bolest svalů mohou být během imunní fáze méně intenzivní než

v první fázi a trvají několik dnů až týdnů (13). U ikterické formy se v téhle době může objevit žloutenka, postižení plic, jater a hemoragické projevy (2).

2.6.1 Charakteristika anikterické a ikterické formy leptospirózy

90% onemocnění probíhá v mírné anikterické formě. Pacienti často ani nevyhledávají lékařskou pomoc a nemoc tak není diagnostikována (5). Pro začátek onemocnění je typická bolest hlavy, horečka, bolest svalů, nevolnost, zvracení a bolest břicha (14), může se objevit i horečka. Velmi intenzivní je bolest zad, stehna a lýtky (5). K dalšímu poškození orgánů může dojít během imunní fáze (6). Nejdůležitějším syndromem anikterické leptospirózy je aseptická meningitida, která trvá většinou několik dní a doprovází ji bolest hlavy (13, 5).

Ikterická forma leptospirózy je velmi závažné onemocnění vyskytující se asi v 10% případů. Má velmi rychlý klinický průběh, který je doprovázen trvalou vysokou horečkou, žloutenkou a azotémií (5, 14). Žloutenka není spojena s nekrózou jaterních buněk. Po uzdravení dochází k obnově funkce jater. V této době jsou zvýšené hodnoty bilirubinu, kreatinín, mírně jsou zvýšené hladiny transamináz a alkalické fosfatázy (5). Často se mohou vyskytnout i komplikace ve formě bolestí břicha, zvracení a také se může objevit krvácení do gastrointestinálního traktu (13). Leptospiróza také způsobuje akutní selhání ledvin, které se projevuje oligurií nebo polyurií (6). Oligurie je spojována s velmi závažným stavem s vysokým rizikem úmrtnosti. Jedním z typických symptomů pro ikterickou formu leptospirózy je trombocytopenie (2). Často dochází také k poškození očí. Nejběžnější je subkonjunktivální krvácení a uveitida, která vede k reverzibilní nebo ireverzibilní slepotě (13, 22).

Postižení plic je spojováno s vysokou nemocností a úmrtností (23). Plicní poškození se manifestuje kašlem, hemoptýzou, dušností a pneumonií a může se rozvinout syndrom akutního respiračního selhání (6).

U onemocnění leptospirózou můžeme vysledovat i srdeční nedostatečnost (5). Vznikají myokarditidy a jiné srdeční poruchy. Většina pacientů s leptospirózou trpí těžkou myalgií a také mírnou svalovou nekrózou. Myalgie může trvat tři až

čtyři týdny. Také se může vyskytnout krvácení do svalů hlavně v břišní stěně a dolních končetinách (2). Krvácení se může manifestovat v rozsahu epistaxe nebo až po hematurii, hemoptýzu a plicní krvácení. V důsledku krvácení vzniká anémie (6).

Mezi vzácné komplikace patří mozkové a cévní příhody, trombotická trombocytopenická purpura, akutní cholecystitida, aortální stenóza, epididymitida a mužský hypogonadismus (5).

2.6.2 Weilova choroba

Jedná se o nejtěžší průběh leptospirózy. Jde o ikterickou formu. Původcem je *Leptospira icterohaemorrhagiae*. Rezervoárem leptospir jsou především potkani, myši a hraboši. Inkubační doba je 1 až 3 týdny. Převážně onemocní mladí lidé. V prvních třech až sedmi dnech dochází ke vzniku septického stavu, manifestuje se horečka, třesavka a dochází k rozvoji meningeálních příznaků, k bolestem hlavy a svalů. Již prvním týdnem onemocnění se objevují v moči proteiny, krev a cylindrické válce. Na konci prvního týdne onemocnění se přidružuje nefritida, hepatální léze, krvácivé projevy a renální nedostatečnost. Vzniká těžký ikterus s extrémními hodnotami bilirubinu v séru. V konečných fázích onemocnění dochází k celkovému metabolickému rozvratu, k selhání ledvin, k těžkým krvácivým stavům, k poškození jater. Pokud je onemocnění diagnostikováno včas a je zahájena správná léčba, je prognóza dobrá. Není-li ale včas diagnostikováno a vhodně léčeno, není výjimkou ani letální průběh nemoci (24, 25).

2.6.3 Žňová horečka

Tato forma leptospirózy má lehčí průběh. Vyskytuje se mnohem častěji než Weilova choroba. Žňová horečka není většinou diagnostikována vzhledem ke svému lehkému průběhu. Vyskytuje se sezóně od jara do podzimu ve formě tzv. letních chřipek. Někdy se mohou objevit lehké meningeální příznaky. Původce žňové horečky je *Leptospira grippotyphosa*. Zdrojem nákazy jsou myšovití hlodavci. K nákaze dochází různými cestami, např. požitím kontaminované vody.

Inkubační doba onemocnění se pohybuje v rozmezí od 2 do 14 dní. Typický je rychlý nástup nemoci. K charakteristickým symptomům patří horečka, bolest hlavy, myalgie a pocity únavy a vyčerpanosti. Může se objevit i vyrážka, kašel, záněty žlučníku.

Onemocnění má krátký průběh. Horečky a myalgie klesají i bez léčby. Obvykle je nutná jaterní dieta. Prognóza je dobrá (24).

2.6.4 Stuttgartská choroba

Původcem této nákazy je *Leptospira canicola*. Hlavním zdrojem nákazy jsou psi (24). U člověka bývá onemocnění středně těžké a žloutenka se vyskytuje velmi vzácně.

U psa může být průběh onemocnění velmi vážný až smrtelný, zvláště u starých psů. Psi, kteří onemocnění přežijí se mohou na první pohled zdát jako zdraví, vylučují ale leptospiry močí, a to po dobu několika měsíců nebo i déle než rok. Nemocní psi jsou schvácení, mají vysokou horečku, mají stále žízeň, nepřijímají potravu, zvrací, mají často úporný krvavý průjem, páchne jim z tlamy, ve které se tvoří vředy. Objevuje se žloutenka, jež je dobře patrná na bělmu oka. Velmi těžce bývají postiženy ledviny, jejichž selhávání je nejčastější příčinou úmrtí psa. Letalita je 10-80%. K léčbě onemocnění jsou používána antibiotika. Jestliže jsou nasazená včas, je léčba úspěšná. Pokud dojde k jejich nasazení pozdě, je léčba neúčinná. Nemocný pes je zdrojem nákazy pro jiné psy, pro domácí zvířata, ale i pro člověka. Nákazou jsou ohroženi převážně chovatelé psů, psovodi a veterináři. V současné době se v našem státě a dalších evropských zemích nákaza psů *Leptospirou canicola* nevyskytuje. Je ale stále častá v rozvojových zemích a také na jihu a jihovýchodě Evropy. U nás je možné psy očkovat, všechny dostupné vakcíny jsou účinné (26) a běžně obsahují sérovary *L.canicola* a *L.icterohaemorrhagiae*.

2.7 Laboratorní diagnostika leptospir

Diagnostika leptospir je vzhledem k nespecifickým klinickým příznakům založena převážně na laboratorní diagnostice.

Leptospiry jsou prokazovány pomocí mikroskopických, sérologických, kultivačních a molekulárně biologických metod.

2.7.1 Mikroskopie

Pro pozorování leptospir se využívá mikroskopie v zástinu. Tímto způsobem lze pozorovat pohyblivost leptospir v klinickém vzorku (krev, moč, mozkomíšní mok). V přítomnosti malého počtu bakterií můžeme získat falešně negativní výsledky a naopak v přítomnosti různých artefaktů můžeme dostat falešně pozitivní výsledek.

Barvení leptospir se provádí na základě stříbření nebo imunofluorescence. Barvení stříbrem se využívá na tkáňové řezy a na tekutiny na sklíčkách. Princip metody je, že se stříbro vyredukuje na povrchu leptospir. V kvalitně obarvených preparátech jsou vidět černé spirochety ve světle žlutých či hnědých tkáních. Imunofluorescenční barvení je výhodnější než barvení stříbrem. Tato metoda zachytí i malé množství leptospir ve vzorku a leptospiry jsou mnohem lépe vidět. Pokud se využije vhodná kombinace fluorochromů, může se ve stejném preparátu prokázat více leptospirových sérovarů (16).

2.7.2 Kultivace leptospir

Kultivace se provádí na selektivních půdách obohacených neomycinem nebo 5-fluorouracilem (6). Leptospiry také rostou na Fletcherově půdě nebo na komerčně dodávané Ellinghausen – McCullough – Johnson - Harris půdě (14). K pomnožení leptospir se využívá i Korthofovo médium. Moč se kultivuje na alkalických půdách (27). Půdy kultivujeme při teplotě 28-30°C po dobu několika týdnů (5, 2).

2.7.3 Sérologický průkaz

Sérologické metody mají v diagnostice leptospir největší význam. Jsou založeny na průkazu protilátek v séru. Protilátky jsou v krvi prokazatelné přibližně 5. až 7. den po nástupu symptomů nemoci (5).

Nejvyužívanější metodou v humánní i veterinární medicíně je mikroaglutinace-lýza (MAL), která je specifická a citlivá (2, 28). Sérum se vyšetřuje v akutní fázi onemocnění (po 1-2 týdnech) a v období rekonvalescence (3 až 4 týdny od začátku onemocnění) (19). K MAL je zapotřebí suspenze živých kultur leptospir nebo kultur inaktivovaných (16). Séra pacientů aglutinují v přítomnosti specifické protilátky kultury příslušných leptospirových sérovarů. MAL je vyhodnocována mikroskopicky, v zástinu. Jako konečná hodnota se odečítá nejvíce zředěné sérum, ve kterém se ještě vyskytuje 50% aglutinace (5). MAL je pozitivní tehdy, dojde-li ke čtyřnásobnému zvýšení titru protilátek, nebo pokud se titr z nulové hodnoty zvýší na titr 1:100 a větší (2).

Enzymová imunoanalýza (EIA) je metoda, která slouží k průkazu genově specifických protilátek IgM a IgG. Testy detekující IgM jsou citlivější než MAL a pozitivní výsledky jsou již v akutní fázi onemocnění (7). EIA umožňuje detekovat protilátky dříve než MAL, většinou okolo 5 dní po začátku klinických projevů (29).

Makroskopický aglutinační test je rychlá makroskopická sklíčková metoda. Je prováděna s hustou suspenzí leptospir, které se aglutinují v přítomnosti specifické protilátky. Aglutinace je viditelná pouhým okem (16).

Ze sérologických metod lze dále využít komplement fixační reakci, mikrokapslový aglutinační test, latex aglutinační test, metody se senzibilovanými erytrocyty, povrchové leptospirové proteiny.

2.7.4 Molekulárně biologická identifikace leptospir

V dnešní době se stále více využívá k diagnostice leptospir polymerázová řetězová reakce (PCR). Tato metoda není závislá na životaschopnosti, nutričních nárocích, na délce životního cyklu detekovaných mikroorganismů, nezávisí ani na typu vyšetřovaného materiálu. Umožňuje velmi citlivý průkaz leptospir v jakémkoliv biologickém materiálu a výsledky vyšetření jsou k dispozici za několik hodin (30).

Princip metody je založen na replikaci specifických požadovaných sekvencí DNA in vitro v cyklické reakci ve třech teplotních fázích.

Pro zahájení PCR je nutné připravit syntetické primery, což jsou sekvence 15-20 nukleotidů, které odpovídají sekvencím na koncích DNA segmentu, který má být namnožen. Další důležitou součástí PCR metody je DNA polymeráza, která katalyzuje vznik nových vláken. DNA polymeráza je izolována z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Její optimální teplota pro katalýzu reakce je 72°C. Tento enzym snáší i teplotu 95°C, proto nemusí být po každém reakčním cyklu opět do reakce přidáván. Pro průběh reakce jsou nezbytné i deoxynukleotidtrifosfáty, Mg^{2+} a PCR pufr obsahující 10- 50 μ mol/l Tris-HCl, maximálně 50 μ mol/l KCl, případně acetamid, albumin, želatínu nebo Tween-20.

V první fázi reakce dochází k zahřátí směsi na 95°C, aby se denaturovala DNA na jednořetězcové molekuly. V druhé fázi dojde k ochlazení směsi na 50°C, aby se navázaly primery na komplementární sekvence DNA. Ve třetí teplotní fázi dochází ke zvýšení teploty na 72°C a Taq polymeráza začne syntetizovat požadovaný úsek DNA. Reakční směs se pak opět zahřeje na teplotu 95°C a cykly se opakují. Jeden cyklus trvá asi 5 minut, při požadovaných 20 cyklech trvá reakce několik hodin. Po skončení PCR reakce následuje elektroforetické rozdělení DNA fragmentů podle jejich molekulové hmotnosti a náboje. Poté následuje detekce nukleových kyselin pomocí enzymatického nebo chemického značení (10, 31).

2.8 Léčba leptospirózových onemocnění

Leptospiry jsou citlivé ke všem antibiotikům kromě chloramfenikolu a rifampicinu (16). S léčbou by se mělo začít co nejdříve po nástupu prvních příznaků onemocnění. Mírné formy jsou léčeny doxycyklinem, ampicilinem nebo amoxicilinem. Těžké formy jsou léčeny penicilinem G nebo ampicilinem, amoxicilinem, erytromycinem (13).

Žádné antibiotikum ale nezabrání leptospirám v poškození tkání a orgánů (16).

2.9 Prevence

Nejlepší ochranou před onemocněním leptospirozami je vyvarovat se kontaktu s infikovanými zvířaty a oblastem, které by mohly být kontaminované jejich močí. Nebezpečí infekce hrozí i při plavání v řekách a rybnících, ve kterých je podezření na kontaminaci (16).

Významná opatření pro prevenci nemoci je zabránění vniknutí moči infikovaných zvířat do vod, se kterými člověk přichází do styku. Velmi důležitá je desinfekce znečištěných ploch, osobní hygiena a používání ochranných pracovních pomůcek a monitorování počtu hlodavců (13). Po kontaktu s infikovanými zvířaty nebo s jakýmkoliv jiným infekčním materiálem, je nezbytná desinfekce rukou. Mezi ochranné pracovní pomůcky patří voděodolné kalhoty, boty, rukavice, masky, zástěry.

Leptospiry usmrcuje působení teploty 50-60°C po dobu 10 minut. Jsou citlivé na vyschnutí, k chlorovým dezinfekčním prostředkům a na pH, na neprovzdušné a chemicky znečištěné vody (4).

Nebezpečí přináší i domácí chov potkanů a myší. Zvláště by se mělo zabránit, aby chovaný potkan přišel do styku s divoce žijícími potkany nebo s kontaminovaným prostředím (32).

K ochraně před infekcí přispívá i očkování. Očkování dobytka se provádí s vakcínami, které obsahují mrtvé leptospiry (20). Stejně tak lidské vakcíny tvoří mrtvé leptospiry a jsou dostupné pouze v několika zemích (2). Lidské vakcíny jsou sérovar specifické a jejich aplikace se musí provádět každý rok. Většinou jsou aplikovány subkutánně dvě dávky po 3 až 4 týdnech. K dispozici jsou také vakcíny, které obsahují několik leptospirových sérovarů (16).

3 Praktická část

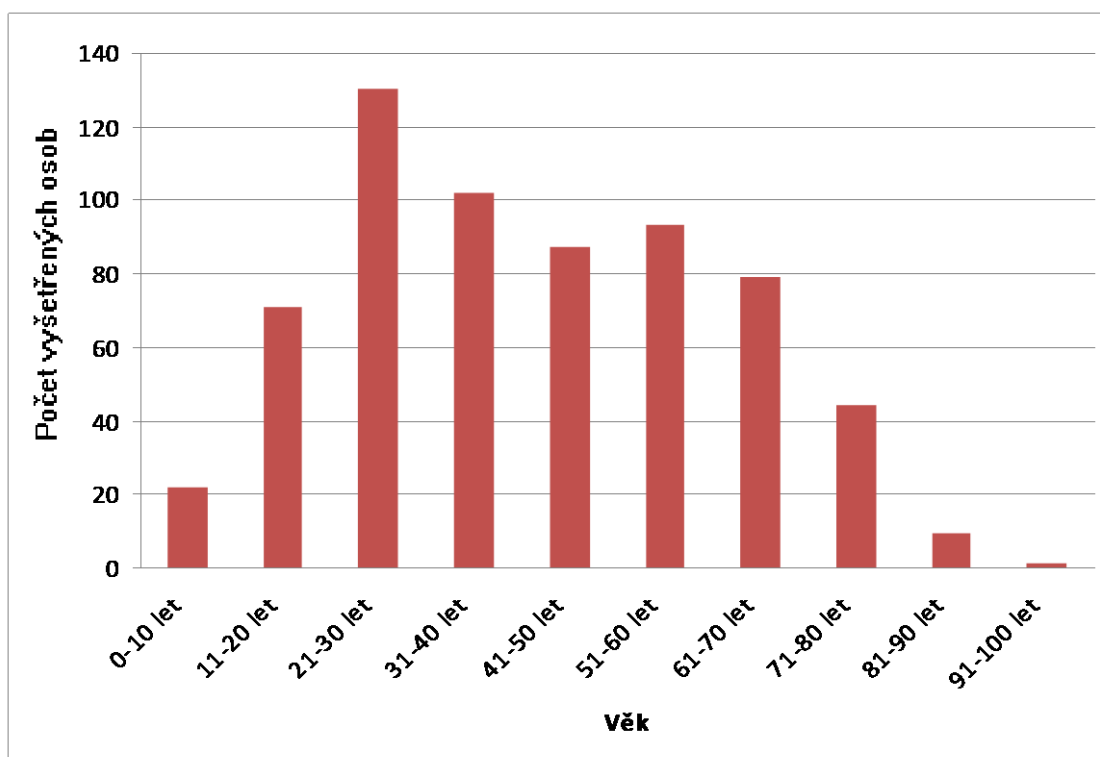
V praktické části jsme se zabývaly statistickým zpracováním dat od 30. 9. 2002 do 20. 12. 2008. Zaměřily jsme se speciálně na sérologickou a PCR diagnostiku leptospirových infekcí vzhledem k věku a pohlaví.

Za uvedené období bylo vyšetřeno celkem 770 pacientů, z toho mužů bylo 449 (58,3%) a žen bylo 321 (41,7%).

Věkový průměr všech pacientů činil 41,9 let. Vypočítaný věkový medián měl pak hodnotu 40.

V níže uvedeném grafu jsou zařazeni testovaní pacienti dle věku do skupin. Věk jsme měly k dispozici u 638 pacientů. U 132 nebyla rodná čísla dostupná. Z grafu č.1 je patrné, že nejvíc vyšetřovaných osob je v rozmezí od 11 do 80 let.

Graf č. 1



3.1.1 Sérologie

Tato metoda se využívá k průkazu protilátek proti leptospirám.

Pozitivní výsledky u sérologického vyšetření (titr 1:200 a vyšší) vyšly u 43 pacientů, což je z celkového počtu pacientů 5,6%. Muži tvořili 4,2% a ženy 1,4% z celku. Do titru 1:50 a 1:100, který ještě není považován za pozitivní, se zařadilo 46 testovaných osob.

Nejčastěji stanovované sérotypy byly *L.grippotyphosa* P 125 a *L.grippotyphosa* Ž 6.

Testované leptospirové sérovary a jejich výskyt v jednotlivých titrech ukazuje tabulka č.2

Tab.č. 2

Sérovar	Počet pozitivních výsledků v daném titru							
	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25000
<i>L.icterohaemorrhagiae</i> Fryšava	3	5		1	3	1		1
<i>L.copenhageni</i> Lebe	3	1	2	1	2			
<i>L.grippotyphosa</i> P 125	7	12	4	8	5	2		1
<i>L.grippotyphosa</i> Ž 6	3	10	8	2	6		1	
<i>L.sejroe</i> M 84					1			
<i>L.istrice</i> J 20				2				1
<i>L.bratislava</i> Jež Bratislava		1	1					
<i>L.pomona</i> Šimon								
<i>L.polonica</i> Poland	7							1
<i>L.sorex-jalná</i>	1							
<i>L.canicola</i> S 392	1		1		1			

3.1.2 Metoda PCR

Slouží k přímému stanovení mikroba.

U 752 pacientů bylo provedeno celkem 1 252 reakcí pomocí PCR. U 18 pacientů tato metoda nebyla vyžadována, provedena byla pouze sérologie na průkaz protilátek.

K diagnostice leptospir byl využit tento biologický materiál: krev (plazma), moč, mozkomíšní mok (CSF), bronchoalveolární laváž (BAL) a v jednom případě také uzlina.

Konkrétní počty a procentuální zastoupení vyšetřovaného biologického materiálu je shrnuto v tab. č. 3.

Tab.č. 3

Biologický materiál	Počet vyšetření	Procentuální zastoupení
Krev	588	47%
Moč	378	30,2%
CSF	273	21,8%
BAL	12	1%
Uzlina	1	0,01%

Z celkového počtu 1252 reakcí jich vykazovalo pozitivitu 28 u 19 pacientů (u 5 žen a 14 mužů). Při počtu 770 vyšetřovaných osob tvoří 19 pozitivních výsledků 2,5%.

Oběma metodami byla leptospiróza diagnostikována v 7 případech (v 5 případech u mužů a ve 2 případech u žen), což je necelé jedno procento z celkového počtu nemocných.

Pro přehlednost, uvádím ještě výsledky ve dvou tabulkách:

Souhrn výsledků - počty osob tab.č. 4

Tab.č. 4

Metoda	Muži		Ženy	
	Pozitivní	Negativní	Pozitivní	Negativní
Sérologie	32	417	11	310
PCR	14	435	5	316

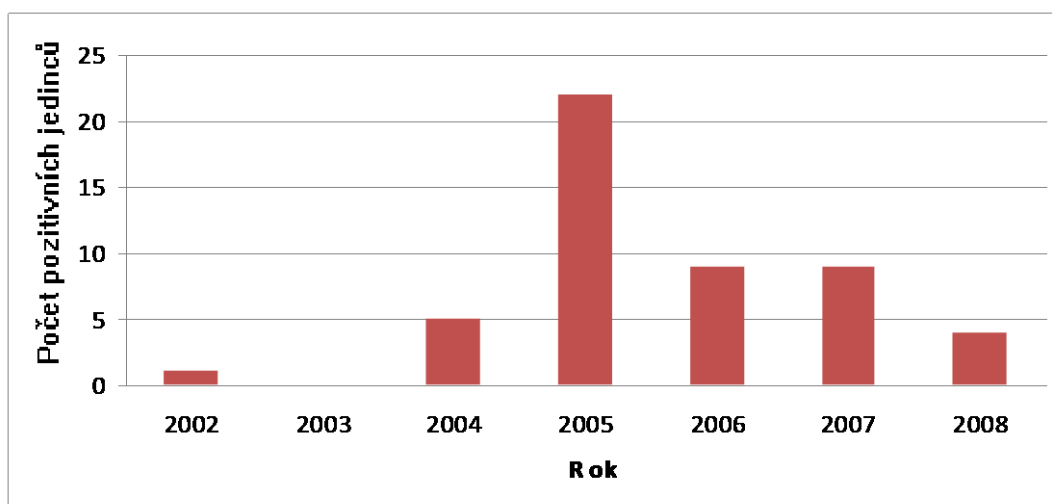
Souhrn výsledků v procentech tab. č. 5

Tab č. 5

Metoda	Muži		Ženy	
	Pozitivní	Negativní	Pozitivní	Negativní
Sérologie	7,1%	92,9%	3,4%	96,6%
PCR	3,1%	96,9%	1,6%	98,4%

Počet pozitivních výsledků v jednotlivých letech (od 30.9.2002 do 29.12.2008):

Graf č. 2



Výrazný nárůst v roce 2005 může být způsoben např. záplavami nebo zvýšeným zájmem lékařů o tato vyšetření.

4 Diskuze

Ze 770 testovaných osob bylo pozitivních na leptospirózu metodou PCR 19 osob. Sérologické vyšetření vykazovalo pozitivitu u 43 pacientů. Z celkového počtu pozitivních jedinců bylo 46 mužů a 16 žen. Zvýšený výskyt nákazy u mužů je spojován s jejich častějším pobytem v přírodě např. při práci (zemědělci, pracovníci kanalizací, veterináři, pracovníci na jatkách atd.) nebo při sportovních aktivitách. Mikroby se mohou vyskytovat v kontaminované půdě, vodě nebo mohou infikovat zvířata, která jsou pak zdrojem onemocnění.

Pro diagnostiku leptospir polymerázovou řetězovou reakcí je velmi důležitý odběr vzorku před zahájením antibiotikové léčby. Pokud se tak nestane, při nasazení účinné antibiotikové terapie se patogenní leptospiry rychle rozpadají a jsou imunitním systémem odstraňovány z organismu. Z tohoto důvodu je patrně více séropozitivit než pozitivních PCR výsledků. Pouze u sedmi pacientů vykazovaly obě metody pozitivitu, což je odrazem odebrání vzorku v nevhodné době (např. odběr na PCR při ATB léčbě).

Sérologické vyšetření je nutno provádět pro confirmaci výsledků a z důvodů epidemiologických. Také se provádí proto, aby se mohla uskutečnit příslušná opatření v oblastech s přemnoženými rezervoárovými hlodavci (především s potkany). Do těchto míst se pak posílá deratizační služba, aby tato zvířata zahubila a zajistila tak ochranu lidí před nákazou.

Nejčastěji používaným biologickým materiálem pro sérologickou diagnostiku byla krev, moč a mozkomíšní mok.

5 Použité zkratky:

PCR - polymerázová řetězová reakce

MAT - mikroskopický aglutinační test

MAL - mikroaglutinace-lýza

EIA - enzymová imunoanalýza

IgM - imunoglobulin M

IgG - imunoglobulin G

DNA - deoxyribonukleová kyselina

Taq - *Thermus aquaticus*

L. - leptospira

CSF - mozkomíšní mok

BAL - bronchoalveolární laváž

6 Literatura:

1. <http://www.zdravotnickenoviny.cz/scripts/detail.php?id=322235>
2. Bharti A.R, Nally J.E, Ricaldi J.N, Matthias M.A, Diaz M.M, Lovett M.A, Levett P.N, Gilman R.H, Willig M.R, Gotuzzo E., Vinetz J.M and Peru – United States Leptospirosis Consortium: Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Infect Dis*, 2003, 3(12): 757-771.
3. Sambasiva R., Naveen G., Bhalla P., Agarwal S.K.: Leptospirosis in India and the rest of the world. *Braz J Infect Dis*, 2003, 7(3): 178-193.
4. Greenwood, D., Slack, R.C.B., Peutherer, J.F. a kol.: Lékařská mikrobiologie - přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie. Longman Group UK Limited, 1992. Translation: Grada Publishing, Praha, 1999, s. 363-367. ISBN 80-7169-365-0.
5. Levett P.N.: Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*, 2001, 14(2): 296-326
6. Hickey P.W., Demers D.: Leptospirosis. www.emedicine.com/ped/topic1298.htm, 2003.
7. Levett P. N., Branch S., Whittington C., Edwards Ch., Paxton H.: Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. *Clin Diagn Labor Immunol*, 2001, 8(2): 349-351.
8. Brenner D., Kaufmann A., Sulzer K., Steigerwalt A., Rogers F., Weyant R.: Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. And four new *Leptospira* genomospecies. *Inter J System Bacteriol*, 1999, 49: 839-858.

9. Zitek, K., Sedláček, I.: Taxonomie leptospir. Remedica Klin. Mikrobiol., 1999, roč. 3, č. 7, s. 232-235.

10. Průša, R.: Základy analytických metod v klinické molekulární biologii.
2. Lékařská fakulta UK a LAMBDA BIO-MED spol. s.r.o. Praha, 1997,
12, 18-21. ISBN 80-238-0940-7

11. Čermáková Z., Plíšková L., Ryšková O., Prausová P., Prášil P.,
Hanovcová I.: Originální metoda polymerázové řetězové reakce (PCR)
v diagnostice leptospirózy. Lék Zpr LF UK HK, 2004, 49(5-6): 207-213.

12. Adler H., Vonstein S., Deplazes P., Stieger C., Frei R.: Prevalence of
Leptospira spp. in various species of small mammals caught in an inner-
city area in Switzerland. Epidemiol Infect, 2002, 128: 107-109.

13. Green-McKenzie J.: Leptospirosis in humans.
www.emedicine.com/emerg/topic856.htm, 2005.

14. Bharadwaj: Leptospirosis – a reemerging disease ? Indian J Med Res,
2004, 120: 136-138.

15. <http://www.cehs.siu.edu/fix/medmicro/lepto.htm>

16. Sambasiva R., Naveen G., Bhalla P., Agarwal S.K.: Leptospirosis in India
and the rest of the world. Braz J Infect Dis, 2003, 7(3): 178-193.

17. Panicker J.N., Mammachan R., Jayakumar R.V.: Primary
neuroleptospirosis. Postgrad Med J, 2001, 77: 589-590.

18. Trevejo R., Rigau-Pérez J., Ashford D., McClure E., Gonzáles C., Amador J., Reyes J., Gonzales A., Zaki S., Shien W., McLean R., Nasci R., Weyant R., Bolin C., Bragg S., Perkins B., Spiegel R.: Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage – Nicaragua, 1995.
19. Kapla J.: Prognóza leptospirózy bývá příznivá. Lék listy, 2004, 8: 26.
20. Leptospirosis review. www.acc.co.nz/wcm001/groups/external-ip/documents/internet/wcm000719.pdf
21. Fernandes M.: Leptospirosis. www.medstudents.com.br/dip/dip1.htm
22. Rathinam S.R.: Ocular leptospirosis. Curr Opin in Ophthalmol, 2002, 13: 381-386.
23. Vijayachari P., Hartskeerl R.A., Sharma S., Natarajaseenivasan K., Roy S., Terpstra W.J., Sehgal S.C.: A unique strain of Leptospira isolated from a patient with pulmonary haemorrhages in the Andaman Islands: a proposal of serovar portblairi of serogroup Sehgalii. Epidemiol Infect, 2004, 132: 663-673.
24. Havlík, J., Kouba, K., Šerý, V., Vacek, V., Jíra, J., Manych, J., Vaništa, J.: Příručka infekčních a parazitárních nemocnění. Avicenum, Praha, 1985, s. 243 - 247. ISBN 08-056-85.
25. Havlík, J., Čatár, G., Hružík, J., Ježek, P., Jíra, J., Manych, J., Marešová, V., Vaništa, J.: Infektologie. Avicenum, Praha, 1990, s. 172-174. ISBN 80-201-0062-8.
26. <http://prazsky-kryarik.cz/index.php?id=108> RNDr Zdeněk Šebek, Csc

27. Zítek, K.: Surveillance leptospirózy rok po povodních. 1999, 8(4): 143-146.
28. Chappel R.J., Goris M., Palmer M., Hartskeerl R.A.: Impact of proficiency testing on result of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. J Clin Microbiol, 2004, 42(12): 5484-5488.
29. Vinetz J.M: Leptospirosis. Current Opinon in Inf Dis, 2001, 14: 527-538.
30. <http://www.genex.cz/index.php?target=veterinarnidg>
31. Nečas, O. a kol.: Obecná biologie, H&H, 2000, 138-139.
ISBN 80-86022-46-3
32. Chmela J., Mazánek L., Příza M.: Doma chovaný potkan nakazil Weilovou nemocí své dva chovatele. CEM, 2001, 11(4): 168-170.