

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Lékařská fakulta v Hradci Králové**

Doktorský studijní program

**Lékařská mikrobiologie**

**Molekulárně biologické metody v laboratorní diagnostice patogenních leptospir**

**Molecular biological methods in laboratory diagnosis of pathogenic leptospire**

**Mgr. Petra Kučerová**

**Školitel: MVDr. Zuzana Čermáková, Ph.D.**

Hradec Králové, 12. června 2013

Obhajoba dne: .....

**Prohlášení:**

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

**Hradec Králové, 12. června 2013**

## **Poděkování**

Tato dizertační práce vznikla za grantové podpory Ministerstva obrany České republiky POV 907 980 „Leptospiroza – vyhodnocení rizika a nové možnosti detekce“.

Především bych chtěla vyjádřit svůj vděk školitelce MVDr. Zuzaně Čermákové, Ph.D., která byla průvodcem mého doktorského studia. Ráda bych jí tímto upřímně poděkovala za veškerý čas, který mi věnovala, za její cenné rady, názory a zkušenosti, jež mi předala. Stala se pro mě vzorem nejen pracovním, ale především lidským.

Můj další velký dík bych chtěla adresovat doc. RNDr. Vladimíru Buchtovi, CSc za jeho pomoc při kompletaci dizertační práce, za cenné rady a zkušenosti, které mi v mém vědeckém působení nejednou rozšířily obzory studované problematiky.

Dále bych chtěla poděkovat PharmDr. Lence Plíškové za její čas a cenné připomínky, kterými mi dopomohla k finálnímu sepsání dizertační práce. Poděkování také patří všem zaměstnancům Ústavu klinické biochemie a diagnostiky LF a FN HK a Centra biologické ochrany Těchonín za cenné rady a pomoc při praktickém provádění experimentů, Miroslavu Holečkovi a Miroslavě Typltové za jejich obětavost.

V neposlední řadě bych chtěla upřímně poděkovat své rodině a přátelům za psychickou podporu během doktorského studia, které se mi často v nelehkých dobách dostávalo.

Dizertační práci bych chtěla jako poděkování věnovat neuvěřitelně statečnému člověku, mojí mamince, s vírou, že vše dobře dopadne.

## SOUHRN

V rámci studia doktorského studijního programu byla navržena, vypracována a do klinického provozu laboratorní diagnostiky akutní formy leptospirózy zavedena real-time PCR metoda založená na detekci genu kódujícího povrchový lipoprotein LipL32. Metoda vykázala velmi dobrou pozitivní i negativní analytickou specificitu, kdy se obě hodnoty rovnaly 100,0 %. Na 230 laboratorních kmenech leptospir ze sbírkových kultur Royal Tropical Institute v Holandsku byla real-time PCR testována. Mez detekce byla stanovena na 1 – 5 kopií genomu/ml tekutého biologického materiálu. Výsledek vyšetření je k dispozici do 5 h, což může mít zásadní vliv na management infekce způsobené patogenními leptospirami. V praxi byla metoda ověřena na biologických materiálech 295 pacientů se suspektní leptospirózou, vyšetřených v období duben 2010 – duben 2013. Devět osob (3,1 %) a jim příslušejících 15 biologických materiálů bylo vyhodnoceno jako LipL32 pozitivní.

Real-time PCR byla vyzkoušena při analýze vzorků z vnějšího prostředí na přítomnost leptospir. Z celkového počtu 680 vzorků (povrchové vody, čistírny odpadních vod, vlhké substráty) bylo 5 real-time PCR reakcí (0,7 %) vyhodnoceno jako hraniční, u kterých výsledek sekvenční analýzy byl opakovaně „nekultivovatelné bakterie“. Všechny vzorky byly vyhodnoceny jako negativní. Z výsledků lze usuzovat, že navržená metodika není dostatečně specifická a citlivá pro detekci leptospir.

Multilokusová sekvenční typizace detekující 5 genů (*adk*, *icdA*, *rrs2*, *lipL41* a *lipL32* gen) byla použita pro vytvoření knihovny sekvencí pro 11 laboratorních kmenů patogenních leptospir. S její pomocí mohlo být následně stanoveno, o jaký infikující sérovar patogenní leptospiry se u pacientů se suspektní leptospirovou infekcí jednalo.

V retrospektivní studii výskytu leptospirózy v České republice v letech 2002 – 2013 bylo vyšetřeno celkem 5840 pacientů se suspektní leptospirózou, z nichž bylo vyhodnoceno 101 osob (1,7 %) jako pozitivní. Onemocnění bylo diagnostikováno častěji mužů (n = 71; 70,3 %) než žen (n = 30; 29,7 %). Nejvíce pozitivních pacientů u obou skupin bylo ve věkovém rozmezí 26 - 45 let. Maximum incidence bylo zaznamenáno v roce 2002 (n = 21; 20,8 %) a 2005 (n = 25; 24,8 %), kdy Českou republiku postihly jak rozsáhlé, tak lokální povodně. Nejvyšší počet pozitivních pacientů byl zaznamenán v měsíci listopadu (n = 20; 19,8 %). Nejfrekventovanějším infikujícím typem byl ve studii sérovar *Leptospira grippotyphosa* (n = 41; 42,3 %).

Pro vyhodnocení a potvrzení výsledků real-time PCR analýzy byly porovnány výsledky metody mikroaglutinačního a SERION ELISA *classic Leptospira* IgM/IgG testu. Šetřením 1553 příslušníků Armády České republiky bylo ELISA metodou na přítomnost specifických protilátek ve třídě IgM a IgG určeno v případě IgM 292 (18,8 %) a u IgG 392 (25,5 %) pozitivních osob. Naprostá většina pozitivních krevních sér byla s využitím 11 laboratorních kmenů patogenních leptospir používaných v České republice a nepatogenní *Leptospira biflexa* vyhodnocena metodou mikroaglutinačního testu jako negativní. U 26 krevních sér (1,7 %) byla zaznamenána slabá reakce v titrech 1:50 – 1:200. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli otestovat diagnostickou senzitivitu a specifitu mikroaglutinačního testu a ELISA soupravy. Ve studii bylo prokázáno, že metoda mikroaglutinačního testu má 100,0% diagnostickou senzitivitu i specifitu. Analyzované diagnostické ELISA soupravy vykazovaly také diagnostickou senzitivitu 100,0 %, ale diagnostická specifita pro detekci IgM protilátek činila 88,6 % a pro detekci IgG protilátek jen 54,3 %. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli ke potvrzení výsledků real-time PCR analýzy používat metodu mikroaglutinačního testu.

**Klíčová slova:** *Leptospira*, real-time PCR, LipL32, Multilokusová sekvenční typizace, ELISA, Mikroaglutinační test

## SUMMARY

During Ph.D. study program real-time PCR method based on detection of gene encoding surface lipoprotein LipL32 was designed, devised and introduced into clinical laboratory practice of laboratory diagnosis of acute form of leptospirosis. Positive and negative analytical specificity 100.0 % in both cases was defined and limit of detection in range 1 – 5 copies of genome/ml of liquid biological material was determined. Real-time PCR method was in clinical practice on biological materials gained in period April 2010 – April 2013 from 295 patients suspicious on leptospirosis verified. Total number of 9 (3,1 %) persons from whom 15 biological materials originated were as LipL32 positive evaluated.

Real-time PCR was tested during the analysis of environmental samples for the presence of *Leptospira*. From 680 samples (surface water, waste water, wet substrates) were 5 real-time PCR reactions (0.7 %) evaluated as borderline, results sequence analysis were repeatedly "uncultivable bacteria." All samples were as negative evaluated. The results suggest that the proposed methodology is not sufficiently specific and sensitive for the detection of *Leptospira* in environmental samples.

Multilocus sequence typing analysis detecting 5 genes (*adk*, *icdA*, *rrs2*, *lipL41* and *lipL32* gene) was used to create the library of sequences of 11 laboratory strains of pathogenic *Leptospira*. With its help could then be determined which infecting serovar of pathogenic leptospires in patients with suspected leptospirosis infection was present.

In retrospective study of leptospirosis in the Czech Republic in the years 2002 - 2013 total of 5840 patients with suspected leptospirosis were examined, from whom 101 persons (1.7 %) were evaluated as positive. The disease was diagnosed more often in men (n = 71, 70.3 %) than in women (n = 30, 29.7 %). Maximum incidence of leptospirosis was recorded in 2002 (n = 21, 20.8 %) and 2005 (n = 25, 24.8 %), when the Czech Republic was affected both large and local flooding. The highest number of positive patients was recorded in November (n = 20, 19.8 %). The most frequent infectious type in study was serovar *Leptospira grippotyphosa* (n = 41, 42.3 %).

To confirm the results of real-time PCR analysis the results of microagglutination test and ELISA were evaluated. Total of 1553 members of the Army of the Czech Republic were using ELISA method for the presence of specific antibodies IgM and IgG examined.

In case of IgM 292 (18.8 %) and IgG antibodies 392 (25.5 %) persons were as leptospira-positive determined. The vast majority of positive blood serum was using microagglutination test with 11 laboratory strains of pathogenic *Leptospira* used in the Czech Republic and non- pathogenic *Leptospira biflexa* as negative evaluated. In 26 blood sera (1.7 %) was recorded weak reactions in titers 1:50 - 1:200. For this reason, we decided to test the diagnostic sensitivity and specificity of the microagglutination test and ELISA kit. In study it was shown that the method of microagglutination test has 100.0 % diagnostic sensitivity and specificity and therefore is suitable to confirm the results of real-time PCR test. Analyzed diagnostic kits SERION ELISA *classic Leptospira* IgM/IgG leptospira showed in both cases diagnostic sensitivity of 100.0 % and the diagnostic specificity for detection of IgM antibodies was 88.6 % and in IgG antibodies only 54.3 %.

**Key words :** *Leptospira*, real-time PCR, LipL32, Multilocus sequence typing, ELISA, Microagglutination test

## SEZNAM ZKRATEK

<b>A</b>	Adenin	<b>DNA</b>	Deoxyribonukleová kyselina (angl. Deoxyribonucleic acid)
<b>AČR</b>	Armáda České republiky	<b>dNTP</b>	Deoxyribonukleotidtrifosfát (angl. Deoxyribonucleotidtriphosphate)
<b>ALP</b>	Alkalická fosfatáza	<b>dsDNA</b>	Dvouvláknenná DNA (angl. Double strand DNA)
<b>ALT</b>	Alaninaminotransferáza	<b>EDTA</b>	kyselina ethylendiaminotetraoctová (angl. Ethylenediaminetetraacetic acid)
<b>AST</b>	Aspartátaminotransferáza	<b>EKG</b>	Elektrokardiograf
<b>ARDS</b>	Akutní respirační syndrom dechové tísně (angl. Acute respiratory distress syndrome)	<b>EMJH</b>	Ellinghausen-McCulloch-Johnson-Harris
<b>BAL</b>	Bronchoalveolární laváž	<b>ELISA</b>	Enzymová imunoanalýza angl. Enzyme-linked immunosorbent assay)
<b>BBG</b>	IgG protilátky proti boréliím	<b>FAFLP</b>	Analýza polymorfismu délky fluorescenčně značených amplifikačních fragmentů - (angl. Fluorescent amplified fragment length polymorphism)
<b>BHQ</b>	„Zhášec černé díry“ (angl. Black hole quencher)	<b>FG</b>	Filtrace plynů
<b>bp</b>	Párů bází (angl. Base pair)	<b>FN HK</b>	Fakultní nemocnice Hradec Králové
<b>BSA</b>	Bovinní sérový albumin	<b>FRET</b>	Fluorescenční rezonační přenos energie (angl. Fluorescence resonance energy transfer)
<b>C</b>	Cytosin	<b>G</b>	Guanin
<b>CBO</b>	Centrum biologické ochrany Těchonín	<b>HAVG</b>	IgG protilátky proti viru hepatitidy A
<b>cDNA</b>	Komplementární DNA (angl. complementary DNA)	<b>Hap</b>	Protein spojený s hemolýzou (angl. Haemolysis associated protein)
<b>CMV</b>	Cytomegalovirus	<b>HBS Ab</b>	Prottilátky proti australskému antigenu
<b>Ct</b>	počet cyklů k dosažení prahu detekce (angl. Cycle of Threshold)	<b>HEX</b>	Hexachlorofluorescein
<b>CV</b>	Variační koeficient (angl. coefficient of variation)	<b>HSVg</b>	IgG protilátky proti herpes simplex viru
<b>ČOV</b>	Čistírna odpadních vod	<b>IC</b>	Inhibiční kontrola (angl. Inhibition control)
<b>ČR</b>	Česká republika	<b>KEG</b>	IgG protilátky proti viru klíšťové encefalitidy
<b>Dabcyl</b>	4 - ((4 (dimethylamino)phenyl)azo) benzoová kyselina	<b>KFR</b>	Komplement fixační reakce
<b>Dabsyl</b>	4- (dimethylamin)azobenzen – 4' - sulfatyl chlorid	<b>KREA</b>	Kreatinin
<b>ddATP</b>	Dideoxyadeninukleotidtrifosfát (angl. Dideoxyadenin triphosphate)		
<b>ddCTP</b>	Dideoxycytosinnukleotidtrifosfát angl. Dideoxycytosin triphosphate)		
<b>ddGTP</b>	Dideoxyguaninnukleotidtrifosfát (ngl. Dideoxyguanin triphosphate)		
<b>ddTTP</b>	Dideoxythiminnukleotidtrifosfát (ngl. Dideoxythimin triphosphate)		



<b>LD</b>	Laktátdehydrogenáza	<b>SZÚ</b>	Státní zdravotní ústav
<b>LF HK</b>	Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice Hradec Králové	<b>T</b>	Thymin
<b>LPS</b>	Lipopolysacharid	<b>TAMRA</b>	6 – karboxy – tetramethylrhodamin
<b>MAT</b>	Mikroaglutinační test	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor nekrotizující faktor $\alpha$ (z angl. Tumor necrosis factor $\alpha$ )
<b>MK</b>	Mastná kyselina	<b>U</b>	Jednotka (angl. Unit)
<b>MM</b>	reakční směs (angl. Master mix)	<b>ÚKBD</b>	Ústav klinické biochemie a diagnostiky
<b>MRSA</b>	Meticilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>	<b>ÚKM</b>	Ústav klinické mikrobiologie
<b>MLST</b>	Multilokusová sekvenační typizace (angl. Multilocus sequence typing)	<b>UV</b>	Ultrafialové záření (angl. Ultra violet)
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Nekrotizující faktor $\kappa$ B (angl. Necrosis factor $\kappa$ B)	<b>VCAG</b>	IgG protilátky proti viru varicelly
<b>NK</b>	Nukleová kyselina	<b>VNTR</b>	Variabilní počet tandemových repetice (angl. Variable number of tandems repeat)
<b>NPV</b>	Negativní prediktivní hodnota (angl. Negative predictive value)	<b>VZVG</b>	IgG protilátky proti varicella zoster viru
<b>PBP</b>	Protein vázající penicilin (z angl. Penicilin binding protein)	<b>WHO</b>	Světová zdravotnická organizace (angl. World Health Organisation)
<b>PBS</b>	Fosfátový pufr (angl. Phosphate buffer saline)		
<b>PCR</b>	Polymerázová řetězová reakce (angl. Polymerase chain reaction)		
<b>PFGE</b>	Elektroforéza v gelu využívající pulzujícího elektrického pole (angl. Pulse field gel electrophoresis)		
<b>PPV</b>	Pozitivní prediktivní hodnota (angl. Positive predictive value)		
<b>REA</b>	Analýza využívající restrikčních endonukleáz (angl. Restriction endonuclease analysis)		
<b>RNA</b>	Ribonukleová kyselina (angl. Ribonucleid acid)		
<b>Rpm</b>	Otáčky za minutu (angl. Revolutions per minutes)		
<b>RS</b>	Roztroušená skleróza		
<b>rRNA</b>	Ribozomální RNA		
<b>RTI</b>	Královský tropický institut (angl. Royal Tropical Institute)		
<b>Rt PCR</b>	Real-time PCR		
<b>Sph</b>	Sfingomyelináza (angl. Sphingomyelinase)		
<b>ssDNA</b>	Jednovláknová DNA (angl. Single strand DNA)		

# OBSAH

1. ÚVOD.....	13
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	15
2.1 Historické aspekty leptospirózy.....	15
2.2 Morfologie leptospir.....	15
2.3 Energetický metabolismus.....	18
2.3.1 Metabolismus lipidů.....	18
2.3.2 Metabolismus purinů a pyrimidinů.....	18
2.4 Kultivace.....	18
2.4.1 Růstové požadavky.....	18
2.4.2 Kultivační média.....	19
2.4.3 Uchovávání leptospir.....	20
2.5 Taxonomie leptospir.....	20
2.5.1 Sérologická klasifikace.....	21
2.5.2 Genetická klasifikace.....	21
2.6 Genomika.....	21
2.7 Epidemiologie.....	22
2.7.1 Chroničtí přenašeči leptospirózy.....	23
2.7.2 Výskyt leptospirózy ve světě.....	24
2.7.3 Epidemiologická situace v ČR.....	25
2.8 Patogeneze leptospirózy.....	27
2.8.1 Antigenní determinanty a faktory virulence.....	27
2.8.2 Patogeneze leptospirózy.....	30
2.9 Klinická a laboratorní diagnostika leptospirózy.....	31
2.9.1 Klinická manifestace onemocnění.....	31
2.9.2 Laboratorní nálezy.....	34
2.10 Laboratorní diagnostika leptospirózy.....	35
2.10.1 Přímé metody.....	35
2.10.2 Nepřímé metody.....	37
2.11 Terapie.....	38
2.12 PCR – konvenční způsob provedení.....	38
2.12.1 Historické souvislosti.....	38
2.12.2 PCR – praktická aplikace v mikrobiologii.....	38

2.12.3 Princip provedení PCR konvenční metody .....	39
2.13 Rt PCR .....	45
2.13.1 Využití rt PCR v mikrobiologii .....	45
2.13.2 Princip provedení rt PCR metody .....	45
2.14 Praktická aplikace PCR v laboratorní diagnostice patogenních leptospir .....	57
2.14.1 Cílové geny pro PCR detekci leptospir .....	57
2.14.2 Typy PCR reakcí používaných pro detekci patogenních leptospir .....	58
2.14.3 Další metody molekulární biologie pro diagnostiku DNA patogenních leptospir .....	59
3. MATERIÁL A METODY .....	68
3.1 MATERIÁL .....	68
3.1.1 Laboratorní kmeny .....	68
3.1.2 Biologické materiály od pacientů se suspektní leptospirozou .....	72
3.1.3 Vzorky z vnějšího prostředí .....	73
3.1.4 Epidemiologické šetření výskytu leptospirózy v Královéhradeckém, Pardubickém kraji a části kraje Vysočina .....	73
3.1.5 Krevní séra .....	74
3.1.6 Laboratorní pomůcky a vybavení .....	75
3.1.7 Použité chemikálie .....	76
3.2 METODY .....	79
3.2.1 Rt PCR pro detekci genu kódující lipoprotein LipL32 .....	79
3.2.2 MLST analýza .....	92
3.2.3 Epidemiologické šetření výskytu leptospirózy v Královéhradeckém, Pardubickém kraji a části kraje Vysočina .....	96
3.2.4 Serion ELISA <i>classic Leptospira</i> IgM/IgG .....	96
3.2.5 MAT .....	99
4. VÝSLEDKY .....	101
4.1 Rt PCR metoda detekce genu kódujícího lipoprotein LipL32 .....	101
4.1.1 Ověření pozitivní analytické specifity .....	101
4.1.2 Ověření negativní analytické specifity .....	101
4.1.3 Ověření detekčního limitu .....	101
4.1.4 Výsledky rt PCR detekce genu pro LipL32 u 230 sbírkových kmenů leptospir .....	103
4.1.5 Výsledky rt PCR vyšetření u pacientů suspektních na leptospirozou .....	103

4.1.6 Optimalizace rt PCR metody .....	107
4.1.7 Validace rt PCR metody.....	110
4.1.8 Výsledky rt PCR vyšetření vzorků získaných ze zevního prostředí .....	111
4.2 MLST analýza.....	112
4.2.1 MLST analýza u 11 laboratorních kmenů patogenních leptospir vyskytujících se na území ČR.....	112
4.2.2 Vyhodnocení sekvence DNA patogenních leptospir a určení infikujícího sérovaru u pacienta s potvrzenou leptospirozou.....	113
4.2.3 Optimalizace reakčních komponent MLST analýzy.....	114
4.3 Vyhodnocení výskytu leptospirózy v Pardubickém, Královéhradeckém kraji a části kraje Vysočina .....	114
4.4 Serion ELISA classic <i>Leptospira</i> IgM/IgG .....	117
4.4.1 Výsledky ELISA vyšetření krevních sér příslušníků AČR na přítomnost specifických IgM/IgG protilátek proti leptospirám.....	117
4.4.2 Stanovení diagnostické senzitivity a specificity soupravy Serion ELISA classic leptospira IgM/IgG.....	119
5. DISKUZE.....	120
6. ZÁVĚR.....	134
7. LITERATURA.....	137
8. SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ A GRAFŮ .....	153
9. PŘÍLOHY .....	157

# 1. ÚVOD

Leptospiroza je akutní horečnaté onemocnění rozšířené celosvětově, které se vyskytuje u lidí i zvířat jak v městských, tak i venkovských oblastech [1,2]. Infekce se stává globálním zdravotním problémem, výskyt v rozvojových, tak i v průmyslově rozvinutých zemích [3].

Výrazně vyšší incidence této infekce je popisována zejména v zeměpisných oblastech s teplejším a vlhčím klimatem, kde se pohybuje v rozmezí 1 - 100/100 000 obyvatel [1,2,3,4]. Na evropském kontinentu je leptospiroza nejčastěji diagnostikována v mediteránní oblasti, např. v Chorvatsku je incidence 1,73/100 000, v Portugalsku 0,68/100 000, ve Francii 0,39/100 000, v České republice (ČR) osciluje mezi 0,3 - 0,4/100 000 obyvatel [5]. Vyšší výskyt leptospirozy je zpravidla zaznamenáván v letních měsících (červen – září).

Jedná se o typickou zoonózu, přenos infekce je zpravidla realizován prostřednictvím vody či vlhkých substrátů, jež jsou kontaminovány močí rezervoárových zvířat – hlodavců (potkan, krysa a další) či přímým kontaktem s infikovaným zvířetem samotným [1,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14]. Zvýšenému nebezpečí jsou vystaveni především veterinární lékaři, pracovníci ve stokách a kanalizacích, v zemědělství a masokombinátech [2,6,7,10,15,16,17,18,19,20,21]. Leptospiry mají schopnost pronikat oděrkami v kůži, při delším pobytu ve vodě i neporušenou kůží a sliznicemi [15]. K rizikovým faktorům v ČR patří vodní sporty, konzumace vody z neošetřených zdrojů, pohyb a pobyt v záplavami postižených místech. V těchto oblastech jsou každoročně popisovány epidemie leptospirozy.

Laboratorní diagnostika tohoto infekčního onemocnění se odvíjí od typického dvojfázového průběhu onemocnění. V prvním týdnu nejsou produkovány specifické protilátky, a proto je pro laboratorní diagnostiku akutní fáze leptospirozy doporučována metoda polymerázové řetězové reakce (PCR), méně často kultivační či mikroskopické vyšetření. Zlatým standardem sérologického vyšetření je, od druhého týdne onemocnění, metoda mikroaglutinačního testu (MAT) [6,12,17,22,23,24,25,26,27,28, 29].

Leptospiry jsou citlivé k většině antibiotických preparátů kromě chloramfenikolu a rifampicinu. Abychom zabránili rozvoji těžkých komplikací leptospirozy, Weilovy choroby, je esenciální, aby antibiotická léčba byla zahájena co nejdříve [22,23,28,29,30,31,32]. Ročně je celosvětově popisováno více než 500 000 případů těžké

formy leptospirózy s přibližně 10% mortalitou. [26,33,34]. Je proto nesmírně důležité, aby byla k dispozici spolehlivá, senzitivní, specifická a především rychlá metoda pro laboratorní diagnostiku akutní formy leptospirózy.

Předmětem řešení dizertační práce bylo zpřesnění a urychlení průkazu DNA patogenních leptospir z biologického materiálu osob se suspektní leptospirozou a ze vzorků ze zevního prostředí. Dále jsme se zaměřili na zavedení laboratorních metodik do rutinní diagnostiky leptospirózy a přípravu standardních operačních postupů pro laboratorní účely. Navržená molekulárně biologická metodika byla ověřena na pacientech se suspektní leptospirozou, porovnána s výsledky ELISA metody a potvrzena mikroaglutinačním testem. Z důvodu, že v České republice nejsou dlouhodobě k dispozici žádná data mapující a vyhodnocující území z hlediska přítomnosti leptospir v zevním prostředí, pokusili jsme se v několika okresech o tento průkaz.

## **CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE**

- a) Zavést do klinického provozu vhodnou PCR metodu pro laboratorní diagnostiku akutní formy leptospirózy.
- b) Určit vhodnou metodiku pro sekvenaci DNA patogenních leptospir a pokusit se vyhledat sekvenci typickou pro Weilovu chorobu a tímto ji odlišit od jiných typů leptospirózy.
- c) Modifikace PCR metodiky pro detekci patogenních leptospir ve vzorcích ze zevního prostředí.
- d) Epidemiologické šetření výskytu leptospirózy v Královéhradeckém, Pardubickém kraji a části kraje Vysočina v letech 2002 – 2013.
- e) Stanovení diagnostické specifity a senzitivity MAT a Serion ELISA *classic* *Leptospira* IgM/IgG – konfirmace výsledků PCR vyšetření.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Historické aspekty leptospirózy

První zmínky o onemocnění podobnému leptospiróze se objevují již ve starověké literatuře. Na území dnešní Číny byly u farmářů pracujících na rýžových polích, pravděpodobně kontaminovaných močí infikovaných rezervoárových zvířat (hlodavců), popisovány klinické příznaky připomínající dnešní leptospirózu.

Typická klinická definice leptospirózy byla stanovena lékařem Adolfem Weilem roku 1886. Weil popsal klinický stav u čtyřech mužů, kteří trpěli těžkým ikterem, horečkou, hemoragiemi a ledvinovým poškozením, na základě kterého získalo onemocnění své dnešní jméno – Weilova choroba. Původce potíží však nebyl ještě detekován. To se podařilo až o více než 20 let později Stimsonovi, který léčil pacienta se suspektní žlutou zimnicí, u kterého po speciálním obarvení histologického preparátu ledvin byly patrné spirální mikroorganismy, následně pojmenované *Spirocheta interrogans*. Roku 1914 byla prokázána přítomnost saprofytických leptospir (*Spirocheta biflexa*) ve vzorcích ze zevního prostředí, včetně pitné vody.

V roce 1915 Inada a Ido jako první na světě izolovali původce Weilovy choroby, v tomto případě se konkrétně jednalo o patogenní kmen leptospir Ictero No. 1, sérovar *Icterohaemorrhagiae* (*Spirocheta icterohaemorrhagiae japonica*). Zanedlouho na to (1917) byl jako hlavní rezervoár a zdroj patogenních leptospir určen potkan

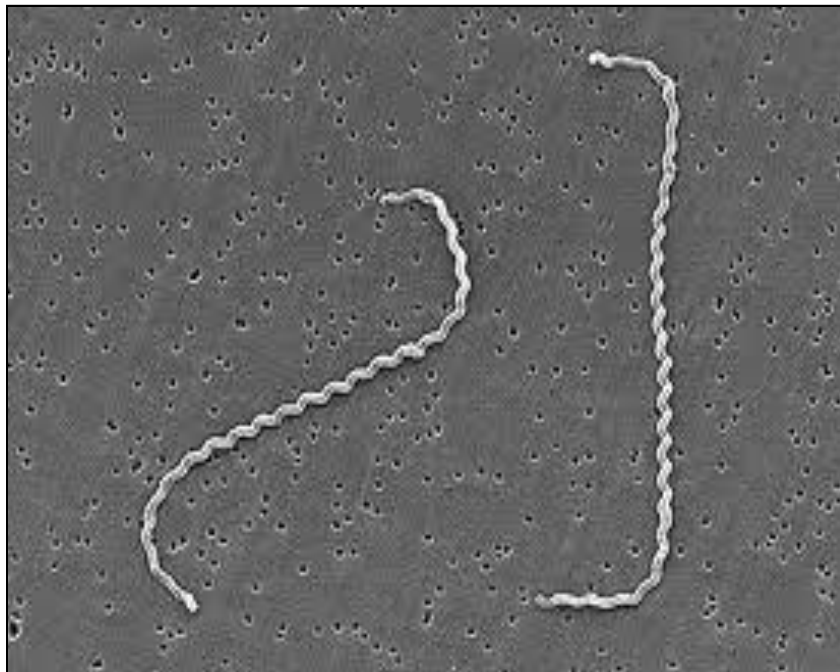
Jméno bakterie *Leptospira* (znamená tenká spirála) bylo navrženo v roce 1918 japonským vědcem Noguchim.

Podrobnější informace o buněčné struktuře a genetickém profilu leptospir byly získány až po zavedení elektronové mikroskopie a molekulárně biologických metod v 90. letech 20. století [22,30,35,36].

### 2.2 Morfologie leptospir

Původcem onemocnění jsou bakterie rodu *Leptospira* (*L.*), tenké, spirální, specifickým způsobem pohybující se mikroorganismy. Jsou zpravidla zahnuté na jednom či obou koncích, vytvářejí tedy typické háčky na okraji buňky. Vyskytují se i rovné varianty mikroorganismu, které jsou obvykle méně pohyblivé. V tekutém médiu vyvíjejí leptospiry charakteristický rychlý a vlnivý pohyb s ohyby a konstantním rotačním pohybem okolo své vlastní osy. Ve viskózních médiích a na buněčném povrchu se vlní podobně jako had [7,22,37,18].

Jejich délka se obvykle uvádí mezi 10 - 20  $\mu\text{m}$ , šroubovice je pravotočivá s amplitudou 0,1 - 0,15  $\mu\text{m}$  a délkou vlny 0,5  $\mu\text{m}$ , jak je vidět na obrázku (obr.) 1 [7,17,36,37].



**Obr. 1** *Leptospira* sp.

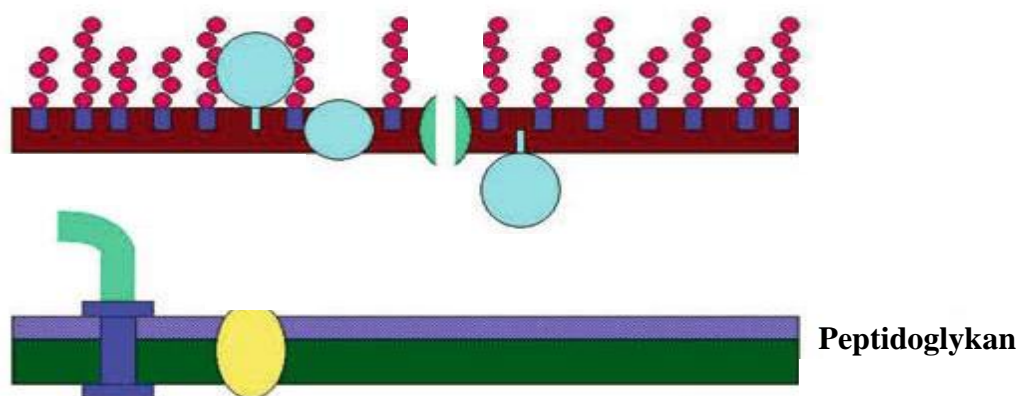
<http://aapredbook.aappublications.org/content/1/SEC131/SEC210/F1150.expansion.html>

Mají vlastnosti podobné jako jsou u  $G^-$  a  $G^+$  bakterií. Pokud se dle Grama obarví, jeví se jako  $G^-$  bakterie. Leptospiry se ve světelném mikroskopu špatně pozorují především proto, že jsou tenčí než vlnová délka viditelné části světelného spektra. Nejlépe je lze pozorovat v zástině. Z barvicích technik lze použít stříbření či imunofluorescenční barvení [7,10,18,20,37].

Leptospiry jsou charakterizovány vysokým podílem lipidů a neobvyklých mastných kyselin (MK). Určení jednoznačného složení lipidů bakteriální buňky je komplikováno tím, že přítomnost MK je vyžadována v kultivačním médiu. Tyto MK mohou následně ovlivňovat a také ovlivňují výslednou skladbu lipidů. Celkový podíl lipidové komponenty tvoří 14 - 26 % sušiny. Z tohoto množství jsou 50 - 70 % fosfolipidy, 5 - 10 % fosfatidylglycerol, 1 - 5 % difosfatidylglycerol a 0 - 3 % fosfatidylethanolamin [37].



Bakteriální buňka je složena z vnitřní membrány, peptidoglykanu, periplazmatického prostoru a vnější membrány (viz obr. 2) [36,37,38]



**Obr. 2** Buněčná stavba leptospir [37]

### **Buněčný povrch – vnější membrána**

Vnější membrána obsahuje proteinovou, lipidovou, lipoproteinovou a lipopolysacharidovou komponentu. Její součástí jsou významné antigenní determinanty leptospir – lipopolysacharid (LPS), lipoproteiny LipL32, LipL36, LipL41 či protein vnější membrány OmpL 1. Buněčný povrch je nabit záporně. Při kultivaci jsou leptospiry vždy pokryty adherentní vrstvou proteinu z kultivačního média [10,37].

### **Peptidoglykan**

Peptidoglykanová vrstva leptospir je podobná typické  $G^-$  bakterii. Bylo popsáno, že peptidoglykan může stimulovat fagocytózu a produkci cytokinu  $TNF\alpha$  u lidských monocytů a rovněž bylo prokázáno, že penicilin vázající proteiny jsou součástí buněčného komplexu vnitřní membrány a peptidoglykanu [37,39,40,41].

### **Bičíky**

Leptospiry mají dva periplazmatické bičíky, jež jsou umístěny na vnitřním membráno-peptidoglykanovém komplexu a zasahují až do periplazmatického prostoru mezi peptidoglykanem a vnější membránou. Bičíky obvykle dosahují délky 15 - 18  $\mu m$  a

svojí strukturou jsou podobné bičíkům jiných G<sup>-</sup> bakterií. Zodpovídají za vysokou motilitu leptospir a jsou tvořeny flagelinem FlaA a FlaB. Elektronovou mikroskopií bylo prokázáno, že tzv. *flaB* mutant bičík netvoří, je tedy nepohyblivý a méně virulentní [10,37,42,43].

## 2.3 Energetický metabolismus

Bakterie rodu *Leptospira* jsou typičtí zástupci chemoorganotrofů a jsou plně závislé na dostupnosti organických látek a přítomnosti kyslíku. Hlavním zdrojem energie a uhlíku jsou vyšší mastné kyseliny, které ve svém uhlíkatém řetězci obsahují více než 14 uhlíků. Cukry fermentovány nejsou [37].

### 2.3.1 Metabolismus lipidů

Leptospiry zkracují či desaturují esenciální MK a včleňují je do své struktury, *de novo* je ale syntetizovat nemohou. Tyto esenciální MK, které bakterie potřebují pro své energetické požadavky, mohou být v některých případech i toxické, proto musí být v médiu přítomen detoxikant, který je adsorbuje. Takovýmto činidlem může být bovinní sérový albumin (BSA), sklo, silikagel apod.

Nenasycené MK umožňují růst patogenních druhů, jiné energetické zdroje, jako glycerol, potencují růst jen některých leptospir, zatímco přídavek pyruvátu a vyšší tenze CO<sub>2</sub> podporují růst leptospir v koloniích na pevných kultivačních médiích [37].

### 2.3.2 Metabolismus purinů a pyrimidinů

Metabolismus purinů a pyrimidinů leptospir vykazuje druhové rozdíly. *L. biflexa* syntetizuje puriny a pyrimidiny a roste v přítomnosti 2,6-diaminopurinu a 8-azaguaninu, naproti tomu *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, a některé sérovary *L. interrogans* rostou v jen přítomnosti 2,6-diaminopurinu. 8-azaguanin inhibuje růst všech patogenních druhů této bakterie [37].

## 2.4 Kultivace

### 2.4.1 Růstové požadavky

Leptospiry jsou obligátní aerobní bakterie s optimální kultivační teplotou pohybující se mezi 28 – 30 °C a rozmezím pH média od 7,2 – 7,6 [10,22,37]. Pomnožení leptospir může být urychleno mícháním, třepáním či zvětšením povrchu kultivačního média. Růst bakterií v tekutém médiu je pomalý, v primární kultuře může trvat až 13 týdnů, u subkultivace 2 týdny [7,18,36,37]. To je dáno poměrně dlouhou generační dobou

leptospir, která se u patogenních druhů pohybuje mezi 6 - 8 h. U primárních izolátů se může generační doba prodloužit i na 24 h.

Většina kmenů roste na pevném médiu jako podpovrchové kolonie, některé sérovary nelze na pevných médiích kultivovat vůbec. Leptospiry jsou závislé na přítomnosti celé řadě sloučenin, jako jsou fosfáty, amonné, vápenaté, horečnaté a železité soli, ale také vitamin B<sub>12</sub>, B<sub>1</sub> nebo H [10,37]. Inkubace trvá zpravidla 3 - 4 týdny, přidavek pyruvátu nebo králičího séra (5 - 10 %) podporuje růst některých kmenů leptospir. [36,37]. V případě přidání hemoglobinu vyrůstají leptospiry v růžových koloniích.

Kultury těchto bakterií zůstávají na kultivačním médiu viditelné po velmi dlouhou dobu, na Korthoffově médiu při 35 °C minimálně 10 let.

K předběžnému rozlišení patogenních a saprofytických leptospir se používá růstu při 13 °C a citlivosti k 8-azaguaninu. Saprofytické leptospiry se při 13 °C množí a jsou rezistentní k výše zmíněné chemické sloučenině [6,22,44].

#### **2.4.2 Kultivační média**

Leptospiry se obvykle kultivují v tekutých médiích. Mezi tato kultivační média patří Ellinghausen – McCulloch – Johnson - Harris médium (EMJH), Korthoffovo, Stuartovo či Vervoostovo médium, setkáváme se však i s médii polotekutými – Fletcherovo a Noguchiho a tuhými – Coxovo médium [7,18,36,37].

##### **2.4.2.1 Kultivační média se sérem**

Do většiny médií se přidává králičí sérum. Nejlépe je použít sérum lehce hemolyzované, aby došlo k uvolnění železa a vitamínu B<sub>12</sub> obsaženého v erytrocytech do okolního prostředí. Nejběžnějším tekutým médiem je Korthoffovo, které obsahuje 8 - 10 % lehce hemolyzovaného králičího séra [37,45].

##### **2.4.2.2 Kultivační média bez séra**

Kultivační média bez séra obsahují kyselinu olejovou a TWEEN jako zdroje vyšších mastných kyselin a bovinní sérový albumin s funkcí detoxikantu. Nejznámějším, a také nejčastěji využívaným médiem tohoto druhu, je EMJH médium [37].

##### **2.4.2.3 Média bez proteinu**

Jedná se o média, u nichž jsou podmínky vyváženy a přísady voleny tak, abychom se vyhnuli případné toxicitě jednotlivých složek média. Médium se používá při vývoji vakcín, kdy se musíme vyhnout kultivaci v médiu s bovinním sérovým albuminem, protože

jeho přítomnost je zcela nepřijatelná z důvodu rizika hypersenzitivity či autoimunitní reakce u očkovaných jedinců [37].

#### **2.4.2.4 Pevná média**

Přídavek agaru v rozmezí 0,8 - 1,0 % podporuje růst podpovrchových kolonií, povrchové kolonie můžeme vidět na médiu, které obsahuje 1,2 – 2,0 % agaru. Kolonie mohou být vizualizovány ještě před tím, než začnou být pouhým okem viditelné na médiu. K tomuto účelu slouží redox indikátory jako např. 2-6 dichlorofenol-indofenol. Zóna bezbarvého až narůžovělého ohraničení modrého indikátoru označuje místo, na němž se kolonie leptospir během 1 - 2 dnů objeví [37].

#### **2.4.2.5 Selektivní média**

Součástí selektivního média jsou antimikrobiální látky, které potlačují růst nežádoucích bakterií. Nejčastěji se používá 5-fluorouracil s kombinací nalidixové kyseliny, vankomycinu a polymyxin B sulfátu či kombinace aktidionu, bacitracinu, 5-fluorouracilu, neomycin sulfátu, polymyxinu B a rifampicinu.

Pro saprofytické leptospiry je selektivní médium s obsahem 8-azaguaninu, na kterém tyto leptospiry spolehlivě vyrůstají, růst patogenních leptospir uvedená látka inhibuje [22,37,44].

#### **2.4.3 Uchovávání leptospir**

Pro dlouhodobé skladování je nejvhodnější leptospiry uchovávat v tekutém dusíku, který zaručuje zachování viability, antigenicity a virulence [37]. Základní protokol zahrnuje přídavek 5 – 40 % dimethylsulfoxidu k bakteriální kultuře v lag fázi růstu kultivované v EMHJ médiu, poté následuje pomalé schlazení až na  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **2.5 Taxonomie leptospir**

Leptospiry patří dle taxonomického zařazení do řádu Spirochaetales, čeledi Leptospiraceae, rodu *Leptospira*.

Původně čeleď Leptospiraceae zahrnovala pouze jediný rod *Leptospira* a leptospiry byly rozlišovány pouze sérologickými metodami – *L. interrogans* zahrnovala všechny sérovary leptospir patogenních pro člověka, *L. biflexa* všechny sérovary pro člověka nepatogenní. V roce 1979 byl navržen Hovind-Hougenem druhý rod *Leptonema*. O 2 roky později ten samý autor určil druh *Leptonema parva*. V roce 1992 bylo Výborem pro taxonomii leptospir rozhodnuto, že *Leptonema parva* je geneticky rozdílná jak od rodu

*Leptospira*, tak *Leptonema*. Byl tedy vytvořen nový, třetí rod *Turneria* (*T.*) s jediným zástupcem *T. parva* [46].

### 2.5.1 Sérologická klasifikace

Dle variability antigenního složení lipopolysacharidu se leptospiry rozčleňují do sérologických skupin s příslušnými sérovary. U patogenních leptospir je známo více než 260 sérovarů a více než 65 sérovarů se vyskytuje u leptospir nepatogenních.

Výsledky sérologické diagnostiky ale nekorelují s výsledky získanými molekulárně biologickými metodami [6,30].

### 2.5.2 Genetická klasifikace

Podle genetických vlastností se čeleď *Leptospiraceae* rozčleňuje do celkem 21 genomospecies.

V případě rodu *Leptospira* tato genetická klasifikace, založená na homologii DNA, rozděluje patogenní druhy do 13 genomospecies, do nichž se začleňuje *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. sanatosai*, *L. kirschneri*, *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. licerasiae*, *L. terpstrae* a *L. wolfii*.

Mezi zástupce saprofytických bakterií tohoto rodu patří *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawe*, *L. kmetyi*, *L. vanthielli* a *L. wolbachii* [6,10,44].

U rodu *Leptonema* je jediným genomospecies *Leptomema illini*, u rodu *Turneria* rovněž jediné genomospecies *T. parva* (dříve *L. parva*), která je považována za intermediárně patogenní [30,47].

## 2.6 Genomika

Chromozóm leptospir je charakterizován obsahem guaninu (G) + cytozinu (C) v rozmezí 34 – 41 mol % v závislosti na testovaném genomospecies. Velikost genomu leptospir se pohybuje v rozmezí 3,9 – 4,6 Mb. Genomospecies *L. interrogans* a *L. borgpetersenii* disponují 2 cirkulárními chromozómy.

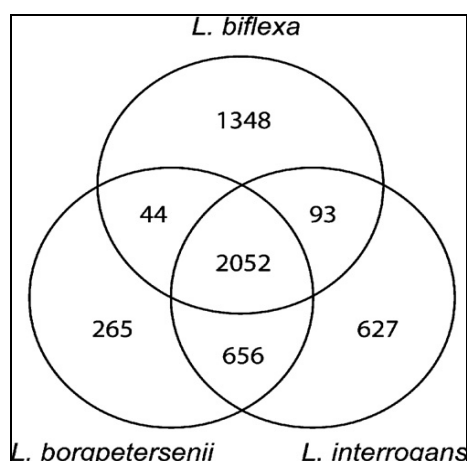
Do dnešního dne bylo popsáno celkem 6 kompletně osekvenovaných genomů leptospir: genomospecies *L. interrogans* (sérovary Lai a Copenhageni), genomospecies *L. borgpetersenii* (2 laboratorní kmeny sérovaru Hardjo), genomospecies *L. biflexa* (2 laboratorní kmeny sérovaru Patoc), jak je naznačeno v tabulce (tab.) 1.

**Tab. 1** Charakteristika genomů 3 patogenních genomospecies leptospir [6]

Genomospecies	Velikost genomu (kb)	Počet genů	Počet pseudogenů
<i>L. interrogans</i>	4627	3379	41
<i>L. borgpetersenii</i>	3931	2844	368
<i>L. biflexa</i>	3956	3590	33

Komparativní studie osekvenovaných genomů 2 patogenních genomospecies a 1 saprofytického genomospecies leptospir ukázala, že celkem 2052 genů je společných pro všechna tři genomospecies, zatímco 1348 bylo unikátních pro *L. biflexa*, 627 pro *L. interrogans* a 265 genů pro *L. borgpetersenii*.

Dále bylo zjištěno, že z 627 genů specifických pro genomospecies *L. interrogans*, 500 genů (více než 80 %) kóduje pouze hypotetické proteiny, podobně u genomospecies *L. borgpetersenii* z 265 specifických genů 200 genů kóduje proteiny neznámé funkce (viz obr. 3) [6].



**Obr. 3** Komparativní genomika 3 osekvenovaných genomospecies leptospir [6]

## 2.7 Epidemiologie

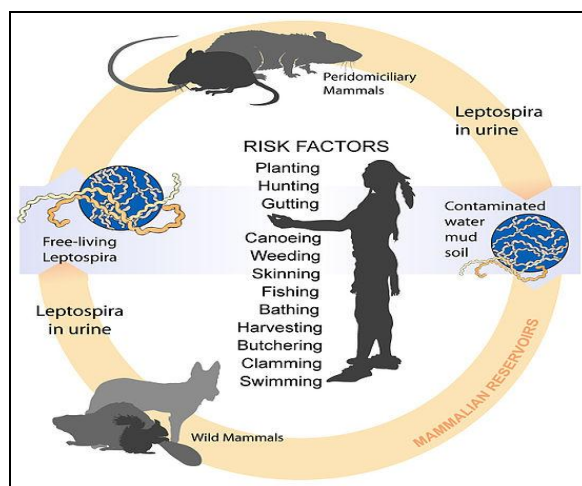
Leptospiróza se stává globálním zdravotním problémem, výskyt se zvyšuje jak v rozvojových, tak i v průmyslově rozvinutých zemích. Onemocnění se především objevuje v tropických a subtropických oblastech, příležitostně i v mírném pásu.

Incidence je vázána na rizikové faktory a podmínky jako jsou povodně či úhrn dešťových srážek. V rozvinutých zemích je leptospiróza nejčastěji spojována s aktivitami, které lidé provozují ve svém volném čase. Mezi rizikové činnosti patří plavání, vodní sporty, lovení zvířat či povolání (veterinární lékaři, pracovníci v zemědělství, rybáři, pracovníci ve stokách a kanalizacích), u kterých dochází ke zvýšenému kontaktu s

domácími mazlíčky, dobyt看em či hlodavci (viz obr. 4). Počet hostitelských zvířat, která vylučují leptospiry močí a tím kontaminují zevní prostředí, je značný [30]. Hlavním a prvním identifikovaným rezervoárem leptospirózy jsou hlodavci. Leptospiry jsou vylučovány jejich močí do vnějšího prostředí, v němž za vhodných podmínek mohou přežívat i po dlouhou dobu.

Přenos onemocnění může být přímý prostřednictvím tkání, tělních tekutin, ojediněle transplacentárně, hematogenně či sáním mateřského mléka. Při tomto přenosu se onemocnění často vyskytuje u řezníků, veterinářů či chovatelů dobytka.

Nepřímý přenos se uskutečňuje z vnějšího prostředí kontaktem s vodou, která je kontaminována močí s leptospirami, nejčastější vstupní branou je poraněná kůže a sliznice. Nepřímou se leptospiróza může také přenést konzumací vody z chemicky neošetřených vodních zdrojů (studánky) či kontaminovanou potravou (nejčastěji zeleninou). Incidence onemocnění stoupá po záplavách, cyklónech či monzunech [14,30].



**Obr. 4** Možné způsoby přenosu leptospirózy

<http://www.thedominican.net/2011/05/leptospirosis-claims-more-lives.html>

### 2.7.1 Chroničtí přenašeči leptospirózy

Kromě již výše zmíněných hlodavců (především potkani a krysy), jež jsou považováni za hlavní chronické nosiče leptospirózy (sérovary *Icterohaemorrhagiae*, *Copenhageni*, *Bataviae*, *Autumnalis*, *Australis* a *Zanoni*) byla popsána kolonizace leptospirami i u dalších savců [37].

Leptospiróza byla poprvé diagnostikována u psů, kteří mohou být kolonizováni sérovary *Canicola* a *Icterohaemorrhagiae*. Akutní leptospiróza u psů je označována jako

Stuttgartská choroba a manifestuje se hepatorenálním selháním, horečkou, zvracením a krvavou stolicí, i s fatálním koncem [6,20,48,49,50].

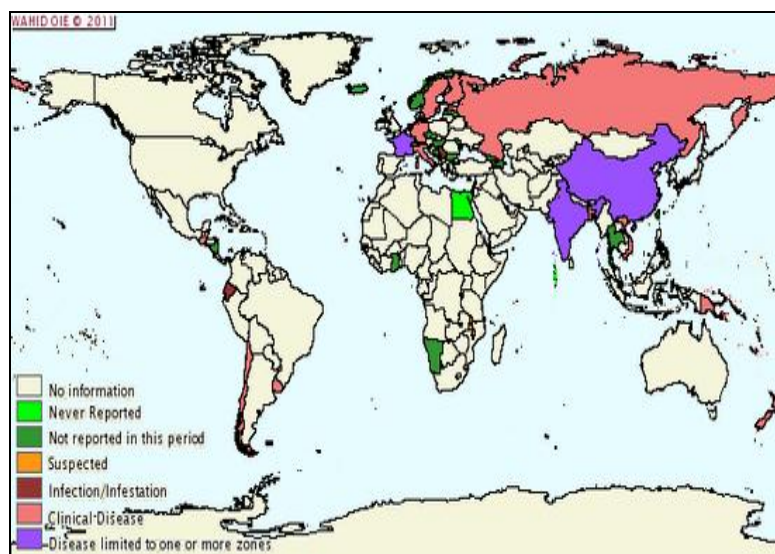
Onemocnění způsobené leptospirami bylo u dobytka poprvé zjištěno v Rusku. Nejčastěji se objevovala kolonizace sérovary Hardjobovis, Pomona, Grippytyphosa, Icterohaemorrhagiae, Bratislava, Autumnalis, Sejroe, Canicola či Bataviae. Příznaky mohou být u těchto zvířat od velmi mírných, resp. inaparentních až po rozvoj těžké klinické manifestace [20,36,51,52].

Onemocnění se také často vyskytuje u prasat, u nichž jsou diagnostikovány sérovary Pomona, Tarassovi, Grippytyphosa, Bratislava, Sejroe, Icterohaemorrhagiae, Canicola. Sporadicky se leptospiróza objevuje u ovcí, netopýrů a divokých prasat [6,7,20,36,50,52,53,54,55,56].

Leptospiróza u zvířat způsobuje velké ekonomické ztráty – váhový úbytek u dobytka, snížení produkce mléka, aborty, v těžkých případech končí i fatálně [51,57,58,59,60,61,62].

## 2.7.2 Výskyt leptospirózy ve světě

Mezi endemické oblasti výskytu onemocnění patří většina zemí jihovýchodní Asie. V nedávné době byla popsána vzplanutí v Nikaragui, Salvadoru, Brazílii či Indii. Výskyt infekce v celosvětovém měřítku je zobrazen na obr. 5. Ročně je diagnostikováno až 500 000 nových případů těžké formy leptospirózy [26,63].



**Obr. 5** Výskyt leptospirózy ve světě

<http://www.caribvet.net/en/diseases/leptospirosis>



### 2.7.3 Epidemiologická situace v ČR

V ČR je výskyt leptospirózy sporadický, ke zvýšení incidence dochází především po povodních či při přemnožení hlodavců. Incidence onemocnění je udávána 0,3/100 000 obyvatel. Po rozsáhlých povodních v roce 1997 se výskyt v ČR zvýšil trojnásobně [64]. Je potřeba mít ale na paměti, že incidence tohoto onemocnění může být značně podhodnocená a epidemiologická data nemusejí být přesná.

Nejvíce případů leptospirózy bylo v ČR v letech 1990 – 2008 popisováno v období červenec – říjen, s výrazným vzestupem v měsíci srpnu. Nejvyšší výskyt byl zaznamenán ve věkovém rozmezí 15 – 19 a 45 – 49 let, většinu pacientů tvořili muži [16]. Přehled hlavních přenašečů leptospirózy na území ČR je uveden v tab. 2 [65].

Na našem území náleží patogenní leptospiry do 3 genomospecies : *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* a *L. kirschneri*, do těchto genomospecies patří následujících 11 kmenů patogenních leptospir: *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava, *L. copenhageni* Lebe, *L. grippotyphosa* P125, *L. grippotyphosa* Ž6, *L. sejroe* M64, *L. istrice* J20, *L. bratislava* Jež Bratislava, *L. pomona* Šimon, *L. polonica* Poland, *L. canicola* S392 a *L. sorex-jalna* *Sorexjalna*. Podrobné zařazení jednotlivých kmenů patogenních leptospir do genomospecies je uvedeno níže:

#### **Genomospecies *Leptospira kirschneri*:**

- *L. grippotyphosa* P125
- *L. grippotyphosa* Ž6

#### **Genomospecies *Leptospira borgpetersenii***

- *L. sejroe* M64
- *L. sorex-jalna* *Sorexjalna*
- *L. istrice* J20
- *L. polonica* Poland

#### **Genomospecies *L. interrogans***

- *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava
- *L. copenhageni* Lebe
- *L. pomona* Šimon
- *L. bratislava* Jež Bratislava
- *L. canicola* S392

**Tab. 2** Přehled některých sérovarů leptospir a jejich hlavních přenašečů zjištěných v ČR [65]

Sérovar	Onemocnění	Hlavní hostitel
<b>Icterohaemorrhagiae Copenhageni</b>	Weilova choroba- ikterická leptospiróza	potkan, krysa
<b>Grippotyphosa</b>	polní, vodní horečka	hraboš polní
<b>Sejroe</b>	polní horečka	myš domácí, myšice
<b>Pomona</b>	nemoc pasáků vepřů	prase domácí, myšice
<b>Sorex-jalna</b>	anikterická leptospiróza	rejsek
<b>Bratislava</b>	anikterická leptospiróza	ježek
<b>Canicola</b>	Stuttgartská choroba psů	pes, prase
<b>Arborea</b>	anikterická leptospiróza	myš domácí, myšice
<b>Bataviae</b>	horečka rýžových polí	myška drobná
<b>Jalna</b>	anikterická leptospiróza	myšice
<b>Tarassovi</b>	nemoc pasáků vepřů	prase domácí
<b>Hardjo</b>	-	hovězí dobytek

Ve studii Státního zdravotního ústavu (SZÚ) byly v ČR nejčastěji diagnostikovány infekční sérovary *L. grippotyphosa* (66 %), *L. icterohaemorrhagiae* (21 %) a *L. sejroe* (10 %) [16].

Podrobnější informace o výskytu leptospirózy v Pardubickém, Královéhradecká kraji a části kraje Vysočina v letech 2002 – 2013 jsou uvedeny v naší epidemiologické studii, jejíž výstupy jsou popsány v části Výsledky.

K zamezení šíření leptospirózy je nutné mít povědomí, informace o tomto relativně vzácném onemocnění a dodržovat epidemiologická nařízení. Základním krokem je pravidelné provádění důkladné deratizace na sídlištích, v hospodářských budovách, odchovných prasat, jatkách či kanalizaci. Dále je třeba se vyvarovat koupání v podezřelé vodě (malé vodní zdroje), nepít vodu ze studánek, které se vyskytují na polích či v jejich těsné blízkosti, či používat v rizikových oblastech (povodňová oblast, kanalizace, skládka, zemědělství) ochranné pomůcky [16,64,66].

## **2.8 Patogeneze leptospirózy**

### **2.8.1 Antigenní determinanty a faktory virulence**

Proteiny a lipopolysacharid (LPS) umístěné ve vnější membráně jsou hlavními antigenními determinantami, proti nimž dochází k tvorbě specifických protilátek. Proteiny vnější membrány mají tedy zásadní roli v interakci hostitel – patogen. Vyvolávají zánětlivou reakci vedoucí k tubulárnímu poškození prostřednictvím Toll-like receptorů. Následně jsou aktivovány nukleární transkripční faktor (NF- $\kappa$ B) a mitogen aktivující proteinové kinázy, což má za následek indukci sekrece chemokinů a cytokinů, jež jsou také odpovědné za rozvoj tubulárního zánětu.

Leptospiry rozeznávají extracelulární matrix molekuly makroorganismu - laminin, kolagen I, IV, fibronectin a adherují na buňky hostitele prostřednictvím proteinů vnější membrány – imunoglobulinu podobným proteinům leptospir (LigA, LigB), endostatinu podobným proteinům leptospir (LenA) a lipoproteinu LipL32 [67].

#### **Lipopolysacharid**

LPS je hlavní antigenní determinantou leptospir, jež je spojována s patogenitou leptospir. Tento antigen tvoří specifický cíl pro aglutinační a opsonizující protilátky. Protilátky proti LPS poskytují pasivní ochranu proti infekci.

LPS je strukturně a imunologicky podobný LPS  $G^-$  bakterií, ale vyznačuje se až 10 $\times$  menší toxicitou. Redukovaná toxicita může být způsobena absencí  $\beta$ -hydroxy-myristové kyseliny. Purifikovaný LPS aktivuje makrofágy a působí jako mitogen B lymfocytů. Jeho přesná struktura není známa, ale je popisována skutečnost, že stavebními kameny LPS jsou hexózy, aminohexózy, pentózy, xylóza a arabinóza [6,10,22].

Představuje důležitý nástroj pro sérologickou typizaci leptospir, podle značné variability jeho antigenní struktury lze leptospiry rozčlenit do jednotlivých sérovarů. V současné době je popsáno více než 300 sérovarů leptospir.

#### **OmpL1**

Jedná se o povrchově exponovaný transmembránový protein s porinovou aktivitou, jehož struktura je vysoce konzervativní u patogenních leptospir [68].

#### **LipL32**

LipL32 je další povrchový lipoprotein o molekulové hmotnosti 32 kDa složený z 251 aminokyselin. Je přítomen pouze u patogenních leptospir a jeho struktura je mezi nimi vysoce konzervativní (až 98% shoda v primární sekvenci AMK). Jedná se o hlavní proteinovou složku vnější membrány leptospir (více než 75 % celkové hmotnosti proteinů).

Bylo také zjištěno, že tento lipoprotein působí jako adhezin, který se váže na proteiny hostitelských buněk - kolagen I, kolagen IV, kolagen V, laminin a plazma fibronektin. Více než 95 % pacientů s leptospirózou mělo v krvi přítomny specifické protilátky proti této antigenní determinantě. LipL32 potencuje hemolýzu zprostředkovanou sfingomyelinázou H (SphH) a z toho důvodu je označován jako protein spojený s hemolýzou (Hap) Hap-1 [69,70,71,72].

### **LipL36**

Lipoprotein vnější membrány LipL36 je produkován v logaritmické fázi růstu bakteriální kultury, pak už k jeho tvorbě nedochází. *In vivo* jeho produkce prokázána nebyla [73].

### **LipL41**

Struktura tohoto lipoproteinu je obdobně jako u OmpL1 a LipL32 vysoce konzervativní u patogenních leptospir. LipL41 je exprimován *in vivo* během aktivního infekčního procesu. Rekombinantní LipL41 antigen je společně s proteinem vnější membrány OmpL1 používán u subjednotkových vakcín určených k vakcinaci zvířat [74].

### **LipL53**

Nový povrchově exponovaný lipoprotein, jenž umožňuje navázání bakterie na extracelulární matrix molekuly makroorganismu, v tomto případě konkrétně na laminin. Jeho exprese je regulována osmolaritou a teplotou [67].

### **Lsa 27**

Lsa27 je povrchový adhezin leptospir o molekulové hmotnosti 27 kDa. Je detekovatelný *in vitro* a *in vivo* se proti tomuto proteinu tvoří protilátky, jež byly zjištěny u pacientů s klinicky potvrzenou leptospirózou. Z tohoto důvodu je také zvažována možná souvislost Lsa27 s patogenitou leptospir [75].

### **Lsa63**

Lsa63 (povrchový adhezin leptospir o molekulové hmotnosti 63 kDa) je rozpoznáván protilátkami v krevním séru pacientů v konvalescentní fázi onemocnění. Byla také prokázána schopnost tohoto proteinu se silně vázat na laminin a kolagen IV a možná spoluúčast na patogenitě leptospir [76].

### **Loa22**

Loa22 patří mezi adheziny vnější membrány leptospir a je jedním z prvním geneticky identifikovaných faktorů virulence. Slabě se váže k extracelulárním matrix proteinům. Jeho struktura je vysoce konzervativní u patogenních leptospir, což potvrzuje skutečnost, že se opravdu jedná o jeden z faktorů virulence [77,78].

### **LigA, LigB a LigC**

Imunoglobulinu podobné proteiny leptospir (LigA, LigB a LigC) jsou povrchově exponované proteiny. Vyskytují se pouze u patogenních leptospir. Zprostředkovávají vazbu bakteriální buňky s extracelulárními matrix proteiny makroorganismu – především fibrinogenem, dále elastinem, tropoelastinem, kolagenem I, kolagenem IV a lamininem [10,34,77,78,79].

### **FlaA, FlaB proteiny**

FlaA proteiny jsou přítomné ve vnější vrstvě bičíku a jsou tvořeny dvěma bílkovinnými jednotkami. FlaB proteiny najdeme ve vrstvě korové a skládají se ze čtyř proteinových částí. Tyto proteiny se vyskytují pouze u patogenních leptospir. Bakterie jsou schopné díky své vysoké motilitě aktivně prostupovat kůží, při dlouhodobém pobytu ve vodním prostředí dokonce i kůží neporušenou [43,80,81,82,83]. Z důvodu, že jsou tyto proteiny přítomny pouze u patogenních leptospir, jsou považovány za faktory virulence. FlaB byl navržen jako vhodný kandidát pro detekci patogenních leptospir molekulárně biologickými metodami. [81].

### **Len A**

Endostatinu podobný protein leptospir Len A se váže k plazminogenu hostitelské buňky, je schopný jeho přeměny na plazmin. Následuje degradace fibrinogenu a tím je usnadněno rychlejší šíření infekčního procesu [78].

### **Hemolyziny**

Použitím molekulárně biologických metod bylo prokázáno více než 7 genů, které se podílejí na produkci hemolyzinů – sfingomyelináz. Mezi nejčteněji zmiňované zástupce patří SphC, SphH a protein spojený s hemolýzou Hap 1 více známý po zkratce LipL32. Hemolyziny jsou proto považovány za významný faktor v patogenezi leptospirózy [6,7,36,83,84].

### **Cytotoxiny**

Některé sérovary leptospir - Pomona a Copenhageni produkují také cytotoxin. *In vivo* je tento toxin zodpovědný za typický histopatologický efekt s výraznou infiltrací makrofágů a polymorfonukleárních leukocytů.

Z dalších významných faktorů virulence leptospir je nutné zmínit produkci fosfolipázy, lipázy, hyaluronidázy, katalázy a inhibitoru tvorby Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPázy [36].

### **2.8.2 Patogeneze leptospirózy**

Pomocí specifických proteinových a lipoproteinových komponent vnější membrány (LipL32, Loa22, LigA, LigB, LigC, Len A) adherují leptospiry na endoteliální a epiteliální buňky, fibroblasty, monocyty či makrofágy. Leptospiry rychle pronikají do krevního oběhu člověka (řádově minuty) a jejich počet se v krevním řečišti pohybuje v rozmezí 10<sup>5</sup> – 10<sup>7</sup> mikroorganismů/ml [10,78].

Leptospiry jsou schopny pronikat oděrkami v kůži, v případě delšího pobytu ve vodě dokonce kůží neporušenou a sliznicemi. Do krevního či lymfatického systému mohou také vstoupit přímo přes spojivkový vak, sliznici nasopharyngu, přes lamina cribrosa čichové kosti, či přímo do plic po inhalaci aerosolu kontaminovaného leptospirami [2,22,85].

Za penetraci a následné šíření infekčního procesu je zodpovědná schopnost leptospir pronikat za využití šroubovitého pohybu axiálních vláken bičíku do tkáně, významným faktorem je také produkce enzymu hyaluronidázy, jež umožňuje další šíření infekce. Diseminace, proliferace a produkce toxických enzymů vedou k rozvoji systémového onemocnění s širokým spektrem klinických symptomů [10,78].

Velmi důležitou skutečností, která má zásadní vliv na další šíření infekčního procesu, je fakt, že leptospiry jsou rezistentní k fagocytóze a ke komplementu. Během septické fáze onemocnění jsou leptospiry rychle distribuovány makroorganismem [6,17,78].

Během imunitní fáze onemocnění dochází k tvorbě specifických protilátek a k případnému ukládání imunokomplexů, jež mohou hrát významnou roli při endoteliálním poškození [86].

Leptospiry jsou schopné perzistovat v některých anatomicky lokalizovaných a imunologicky privilegovaných místech i po tom, co po spoluúčasti specifických protilátek a fagocytárních buněk došlo k jejich eliminaci z ostatních míst makroorganismu. Nejčastěji k tomuto procesu dochází při perzistentním osídlení renálních tubulů [22].

## **2.9 Klinická a laboratorní diagnostika leptospirózy**

### **2.9.1 Klinická manifestace onemocnění**

Onemocnění nejčastěji způsobuje patogenní genomospecies *L. interrogans* a *L. borgpetersenii* [33].

Inkubační doba je zpravidla 7 - 14 dnů, v některých případech i měsíc [10,30]. Pro jednoznačnou diagnostiku onemocnění musí být brány do úvahy symptomy, laboratorní nálezy, ale i epidemiologické souvislosti a celková anamnéza pacienta.

Při diferenciální diagnostice je zapotřebí mít na paměti, že leptospiróza se může manifestovat podobnými klinickými příznaky, jaké se vyskytují u infekcí způsobených prvoky či viry. Infekce vyvolaná patogenními leptospirami může v některých případech připomínat onemocnění, jež jsou charakteristická pro tropy a subtropy (malárie a horečka dengue) či hepatitidy a infekce s chřipkovitými symptomy [18,26,87,88,89].

Průběh infekce způsobené leptospirami se liší v závažnosti podle typu sérovaru, věku pacienta, jeho zdravotního stavu a stravovacích návyků [10].

Leptospiróza může probíhat jako mírné chřipkovité onemocnění spjaté s náhlou horečkou, bolestmi hlavy a myalgií. V 90 % se rozvíjí anikterická forma nemoci, pro 10 % případů je charakteristický těžký ikterický průběh infekce, dochází k rozvoji Weilovy choroby [22,87].

#### **2.9.1.1 Anikterická forma leptospirózy**

U anikterického typu leptospirózy je infikujícím agens zpravidla sérovar *Grippotyphosa*, méně často sérovary *Hardjo* či *Pomona* [37]. Infekce probíhá většinou ve dvou fázích, leptospiremické a imunitní.

Pro první fázi je typické akutní horečnaté onemocnění spojené s třesavkou, bolestmi hlavy, myalgií (oblast šíje, abdominální oblast), vyrážkou (transientní urtikárie,

makuly, makulopapuly, purpura), zvracením či konjunktivální sufuzí. Během této fáze jsou leptospiry přítomny v krevním oběhu, likvoru či tkáních.

Během imunitní fáze dochází k osidlování renálních tubulů leptospirami a k rozvoji aseptické meningitidy spjaté s bolestí hlavy, fotofobií, strnutím šíje, rozmazaným viděním, alterací mentálního stavu, deliriem, halucinacemi až komatem; další komplikace mohou zahrnovat neuritis, uveitis či iridocyclitis [18,22,36,78,86].

### **2.9.1.2 Ikterická forma leptospirózy**

Pro ikterickou formu jsou typické také dvě fáze. Průběh onemocnění je zpravidla dramatický, rozvíjí se hepatorenální selhání, hemoragická diatéza, petechie, krvácení do GIT, myokarditida a hemoragické poškození plic – Weilova choroba. Těžká forma infekce je spojována se sérovary Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Lai či dalšími [7,17,22,37,78,86]. Mortalita této těžké formy onemocnění se pohybuje v rozmezí od 5 do 15 % [36]. Každoročně je popisováno více než 500 000 nových případů těžké formy leptospirózy [33].

### **Hepatální postižení**

Pro jaterní insuficienci jsou typické degenerativní změny hepatocytů, hypertrofie, hyperplazie Kupferových buněk, cholestáza, petechie či nekrotická ložiska. Ikterus se zpravidla objevuje mezi 4. - 6. dnem. Přítomna je mírná infiltrace mononukleáry. Leptospiry jsou také schopny indukovat apoptózu hepatocytů, snižují zánětlivou odpověď a tím přispívají k snadnější proliferaci mikroorganismu. [17].

V naší studii (2013) [90] jsme dospěli k závěru, že 58,3 % našich pacientů s prokázanou leptospirózou vykazovalo známky hepatálního poškození (ikterus, hepatosplenomegalie). Covic a kol. (2003) [8] v jejich odborném sdělení popisují hepatální insuficienci u 83,3 %, Abguenguen a kol.(2008) [1] u 38,7 %, Mansour-Ghanaei a kol. (2005) [91] u 68,9 % a Esen a kol. (2004) [92] u 36,1 % pacientů s leptospirózou.

### **Renální postižení**

Postižení ledvin se manifestuje jako difúzní tubulointersticiální zánět spojený s infiltrací lymfocytů, polymorfonukleárních lymfocytů a makrofágů. Často se rozvíjí tubulární nekróza, hyperplazie, hemoragické postižení a akutní vaskulitida [17,30].



V naší studii (2013) [90] jsme zjistili, že 41,6 %, Esen a kol. (2004) [92] 38,0 %, Covic a kol. (2003) [8] 100 % a Katz a kol. (2001) [93] 26,3 % pacientů infikovaných patogenními leptospirami vykazovalo známky renálního poškození.

### **Respirační postižení**

U infikovaných plic můžeme zaznamenat výrazné překrvení a hemoragické léze postihující alveoly. Leptospiry ničí endotelové buňky, dochází k profuznímu prosakování plazmy do intersticia. Následkem tohoto procesu bývá hypovolemie. Dále se objevuje teplota, bolesti hlavy, suchý kašel, později s příměsí krve. Pokud dojde až k rozvoji akutního respiračního syndromu dechové tísně (ARDS) můžeme se u nemocného jedince setkat s respiračním selháním, hemoptýzou, hypoxií a edémem. Tyto příznaky jsou doprovázeny problémy s dýcháním, tachykardií, tachypnoí a hypertenzí. Mortalita může dosahovat 50 - 70 %. Respirační postižení vyžaduje okamžité připojení pacienta na umělou plicní ventilaci. [7,13,17,30,36,55,86,94].

### **Kardiální postižení**

Srdeční postižení je charakterizováno rozvojem myokarditidy, objevují se nespecifické abnormality na elektrokardiografu (EKG), arytmie – zpravidla fibrilace síní [7,17,86].

Klinické příznaky postižení myokardu zahrnují abnormality v T vlnách při EKG vyšetření, jež byly zaznamenány u 10 % z 80 pacientů s těžkou formou leptospirózy v Lousianě, USA [36].

### **Okulární postižení**

Postižení očí se může rozvinout relativně brzy či s odstupem až 18 měsíců po akutní fázi infekce [17]. Změny jsou pozorovány jak v septické, tak v imunitní fázi onemocnění.

V akutní fázi infekce se postižení očí projevuje v rozmezí 2 – 90 %. Pro tuto fázi je typická konjunktivální kongesce, chemóza, subkonjunktivální hemoragie a zažloutlá skléra.

V pozdní fázi klinických symptomů dochází k rozvoji zákalu rohovky, katarakty, retinální vaskulitidy, optické neuritidy či retinálních hemoragií [7,36,95,96].

## **2.9.2 Laboratorní nálezy**

### **2.9.2.1 Hematologické parametry**

Pacienti s anikterickou formou leptospirózy mají zvýšenou hodnotu sedimentace erytrocytů, počet bílých krvinek je buď v normálu, nebo lehce zvýšen [36].

U pacientů infikovaných patogenními leptospirami je přítomna mírná anémie a trombocytopenie. S hemolytickou anémií, diseminovou intravaskulární koagulopatií se setkáváme u těžkých případů Weilovy choroby [13,18,36,86].

Mansour-Ghanaei a kol. (2005) [91] publikovali, že trombocytopenie (počet trombocytů  $< 150,000 \text{ mm}^3$ ) byla zaznamenána u 87,3 % pacientů, 15,5 % případů mělo počet trombocytů menší než  $20,000/\text{mm}^3$ . Katz a kol. (2001) [93] popsal trombocytopenii u 58,0 % případů.

### **2.9.2.2 Hepatální postižení**

U jaterního postižení dominuje zvýšená hodnota alkalické fosfatázy (ALP), laktátdehydrogenázy (LD), alaninaminotrasferázy (ALT) a bilirubinemie. Při těžkém průběhu onemocnění je popisována hyperamylasemie. [30,36,86].

Hodnoty aspartátaminotransferázy (AST) byly nad horním limitem u 82,6 % a ALT u 86,9 % pacientů. ALP byla zvýšená u 95,5 % pacientů, 72,1 % osob vykazovalo příznaky hyperbilirubinemie. Ve většině případů se jednalo o zvýšenou koncentraci přímého bilirubinu [91]. Dále byly publikovány zvýšené hodnoty ALT a bilirubinu u 73,0 %, resp. 70,0 % infikovaných osob [93].

### **2.9.2.3 Renální postižení**

Pro ledvinnou insuficienci je typická proteinurie, pyurie, hematurie, přítomnost hyalinních válců, zvýšená koncentrace močoviny a kreatininu (KREA) jak v séru, tak v moči. Neobvyklým nálezem je v případě postižení ledvin polyurie a z ní vyplývající hypovolemie a hypokalemie [17,86].

Mansour-Ghanaei a kol. (2005) [91] publikovali, že zvýšení hodnoty sérového KREA byly detekovány u 27,3 % případů a více než 70,0 % pacientů vykazovalo abnormality v moči, které spočívaly v mikroskopickém průkazu přítomnosti erytrocytů a proteinů. Katz a kol. (2001) [93] popsali, že u 54,0 % postižených osob byla zaznamenána zvýšená hladina KREA, u 72,0 % pacientů byla přítomna hematurie a v 54,0 % byla zaznamenána proteinurie.

#### **2.9.2.4 Postižení centrálního nervového systému**

Při rozvinutí aseptické meningitidy se můžeme setkat se zvýšenou hodnotou proteinů v cerebrospinální tekutině. Zajímavá je také skutečnost, že abnormality nálezu v likvoru jsou zaznamenávány u více než 80 % pacientů s leptospirózou, ale pouze u poloviny pacientů se rozvinou charakteristické symptomy onemocnění. [86].

### **2.10 Laboratorní diagnostika leptospirózy**

V laboratorní diagnostice leptospirózy se uplatňují jak metody přímé (průkaz antigenu), tak metody nepřímé založené na průkazu specifických protilátek. Typ vyšetřovaného biologického materiálu by měl být volen podle délky probíhajícího infekčního procesu [6,17,22,23]. V prvním týdnu, kdy ještě nedochází k tvorbě specifických protilátek, je vyšetřována krev či likvor. Doporučenou metodou je proto metoda PCR. [24,25,27]. V druhém týdnu onemocnění, kdy by již protilátky měly být v krvi pacienta přítomny, vyšetřujeme jejich titer metodou mikroaglutinačního testu, případně za použití ELISA metody. Pro toto období je také typická leptospiurie [12,17,23,26].

#### **2.10.1 Přímé metody**

##### **2.10.1.1 Kultivace**

Kultivace leptospir je obtížná a běžně se neprovádí, jelikož má velmi nízkou senzitivitu [16]. Růst bakterií v tekutém kultivačním médiu je pomalý, u primární kultury se může projevit až po 13 týdnech, u subkultivace trvá zpravidla 2 týdny. Kultivace probíhá pod kontrolou mikroskopického vyšetření vzorku v zástinu jednou týdně, v případě pozitivního nálezu by měla být provedena subkultivace.

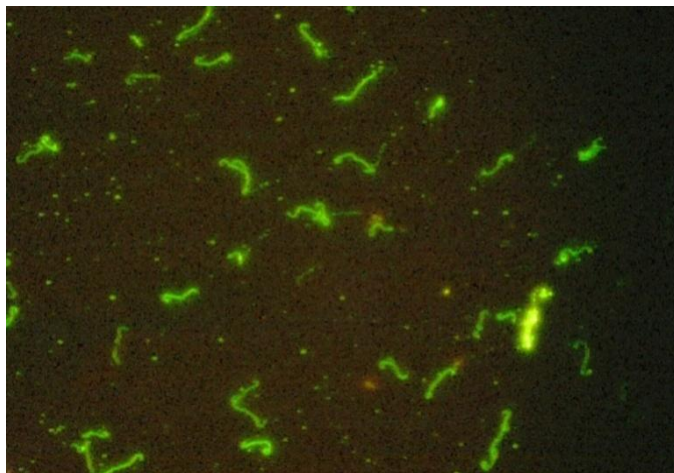
Odběr krve se musí provést co nejdříve a před zahájením antibiotické terapie. Standardizovaná metoda kultivace leptospir z krve pacienta vyžaduje aplikaci 1 – 5 kapek (100 - 200  $\mu$ l) plné krve do EMJH média, abychom se vyvarovali inhibice růstu patogenních leptospir díky přítomnosti protilátek, antibiotik, hemoglobinu a či jiných krevních komponent [97].

Likvor se zpracovává obdobně jako krev. Moč je pro kultivační průkaz využívána výjimečně, doporučuje se okamžitá kultivace na selektivní kultivační medium, abychom zabránili degradaci leptospir působením jiných bakterií přítomných v moči [7,22,37,86].

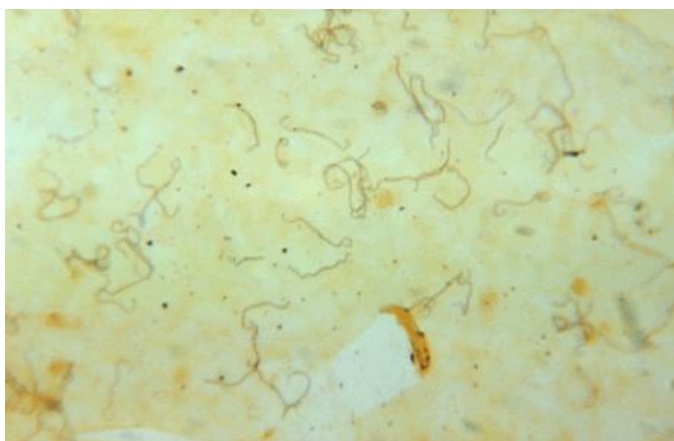
##### **2.10.1.2 Přímé pozorování**

Aby byl mikroskopický průkaz přítomnosti leptospir spolehlivý, v mikroskopickém poli musí být alespoň  $10^4$  leptospir/ml. K barvení leptospir se rutinně používá stříbření či

imunofluoresce (viz obr. 6 a 7). Nejčastěji je však využíváno pozorování leptospir mikroskopickou technikou v zástinu [18,23,36,37].



**Obr. 6** Leptospiry vizualizované metodou nepřímé imunofluorescence  
<http://www.genoprice.com/leptospira.htm>



**Obr. 7** Leptospiry obarvené stříbřením - biopsie jater

<http://bestpractice.bmj.com/bestpractice/monograph/913/resources/image/bp/3.html>

### 2.10.1.3 PCR

Metoda PCR má v přímé laboratorní diagnostice, především akutní formy leptospirózy, významné postavení. Z tohoto důvodu jsou molekulárně biologickým metodám věnovány samostatné kapitoly v teoretické části předkládané dizertační práce (viz kapitoly 2.12, 2.13, 2.14)

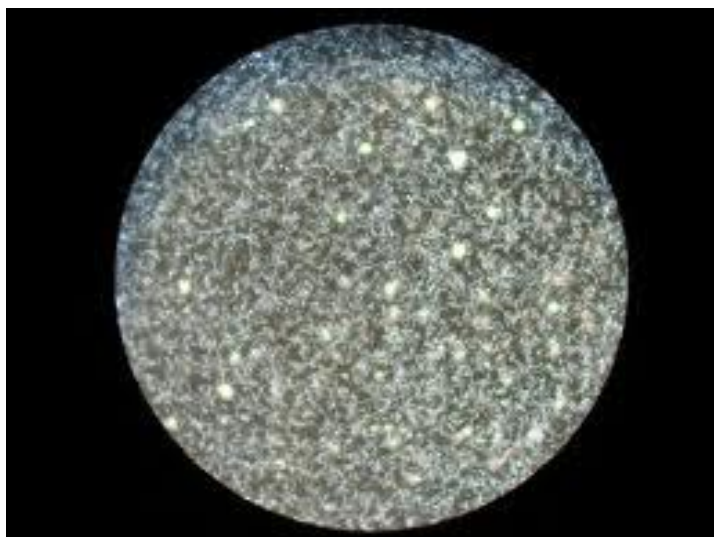
## 2.10.2 Nepřímé metody

### 2.10.2.1 Mikroaglutinační test

Zlatým standardem pro průkaz protilátek proti leptospirám je MAT (Mikroaglutinační test (MAT)), v jiných publikacích označovaný jako Mikroaglutinace-lýza.

Jedná se o aglutinační reakci živých kmenů leptospir s krevním sérem pacienta, pozorování se provádí v zástinovém mikroskopu (viz obr. 8). MAT je jeden z nejcitlivějších a nejspecifičtějších testů nepřímé laboratorní diagnostiky leptospirózy.

Významným diagnostickým kritériem je čtyřnásobné zvýšení počátečního titru, titr vyšší než 1:400 svědčí pro počínající tvorbu specifických protilátek [7,12,30,36].



Obr. 8 MAT

[https://en.wikipedia.org/wiki/File:Leptospirosis\\_darkfield.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Leptospirosis_darkfield.jpg)

### 2.10.2.2 ELISA

ELISA diagnostické kity často využívají fixované celobuněčné antigeny, zpravidla nepatogenní *L. biflexa* [17,37,98]. Tyto imunoenzymatické metody však detekují rodově specifické protilátky proti leptospirám třídy IgM a IgG [19,82]. Všeobecně je u těchto souprav známo, v souladu s výsledky naší studie, že častým problémem ELISA souprav je zkřížená reaktivita protilátek s jinými infekčními agens, nejčastěji s boréliemi, treponémami, cytomegalovirem, herpes virem, varicella zoster virem či chlamydiemi.

Jiné druhy ELISA souprav využívají fixovaných antigenních determinant patogenních leptospir LipL32, LipL41, OmpL1, LigA či LigB [12,101,102,103,104].

Mezi jiné testy, které jsou sporadicky používány, ale nejsou doporučovány pro rutinní nepřímou diagnostiku leptospirózy, patří komplement fixační reakce (KFR), pasivní hemaglutinace či sklíčkový aglutinační test [12,80,82,104,105,106].

## **2.11 Terapie**

Léčba leptospirózy záleží na závažnosti onemocnění a stavu pacienta. Na základě *in vitro* citlivosti jsou leptospiry senzitivní k většině antibiotik, kromě chloramfenikolu a rifampicinu.

Mírný průběh onemocnění dovoluje pouze léčbu symptomatickou, popřípadě doplněnou orální aplikací penicilinu, ampicilinu či doxycyklinu (100 mg 2× denně po dobu 7 dnů), doxycylin bývá také využíván v profylaxi leptospirózy.

Lékem volby v případě těžké formy leptospirózy, Weilovy choroby, je intravenózní penicilin v dávce 6 milion U denně. Délka léčby by se měla pohybovat mezi 10 - 14 dny. Při těžkém průběhu je také možno podávat amoxicilin či erytromycin. Tetracyklin je kontraindikován u pacientů s renální insuficiencí, dětí a těhotných žen. U dětí lze vedle penicilinu podávat také ampicilin [22,23,30].

## **2.12 PCR – konvenční způsob provedení**

### **2.12.1 Historické souvislosti**

PCR metoda byla vyvinuta roku 1985 vědeckým pracovníkem Kary. B. Mullisem. O pouhé 2 roky později spatřila světlo světa modifikace této metody, která umožňuje kvantifikaci nálože nukleové kyseliny (NK) příslušného mikroba – real-time PCR (rt PCR). Od tohoto data je popisován značný nárůst odborných publikací zabývajících se touto problematikou. Roku 1993 získal Mullis Nobelovu cenu za chemii za objev PCR. V roce 1996 se rt PCR stala díky společností Applied Biosystems a zavedení cykléru 7700 komerčně dostupnou a byla považována za nejpřesnější a nejcitlivější metodu detekce a kvantifikace deoxyribonukleové kyseliny (DNA) [107,108].

### **2.12.2 PCR – praktická aplikace v mikrobiologii**

Metoda se stala neocenitelným pomocníkem v mikrobiologii především pro laboratorní diagnostiku těch infekčních agens, jež se obtížně kultivují (viry nelze kultivovat na bezbuněčných mediích, ke svému životu potřebují permissivní buňku) nebo je kultivovat nelze jako např.- *Treponema pallidum* či rickettsie.

PCR neslouží pouze k identifikaci infikujícího agens, umožňuje také identifikovat virulenční faktory či například specifické geny kódují rezistenci k antibiotikům. Významným příkladem je detekce genu *mecA*, jež je zodpovědný za rezistenci bakterie *Staphylococcus (St.) aureus* k meticilinu a oxacilinu. Získáním tohoto genu dochází k selekci nebezpečného patogenu MRSA (Meticilin rezistentní *St. aureus*).

### 2.12.3 Princip provedení PCR konvenční metody

#### 2.12.3.1 Izolace nukleových kyselin

Správná izolace NK je základním krokem pro úspěšné provedení PCR reakce. K izolaci DNA je nejčastěji používáno silikagelových kolonek, fenol - chloroformové extrakce, pryskyřice či magnetických částic. Pro následný správný průběh PCR je důležité, aby reakční směs nebyla kontaminována ribonukleovou kyselinou (RNA), z tohoto důvodu se přidává do směsi RNáza [109,110].

#### Silikagelové kolonky

Nejprve dochází k lýze buněk za použití extrakčního pufru. Poté následuje adsorpce DNA na silikát v přítomnosti chaotropních solí (guanidinium thiokyanát). Chaotropní sole denaturují NK, jež se posléze naváží na membránu silikagelové kolonky (viz obr. 9).

Opakovaným promýváním chaotropními solemi dochází k odstranění nežádoucích kontaminant. DNA zůstává na silikátu adherovaná až do té chvíle, než je aplikován eluční pufr (roztok s nízkým či žádným obsahem solí - Tris pufr či voda), jež adsorbovanou DNA ze silikátu uvolní [110,111].

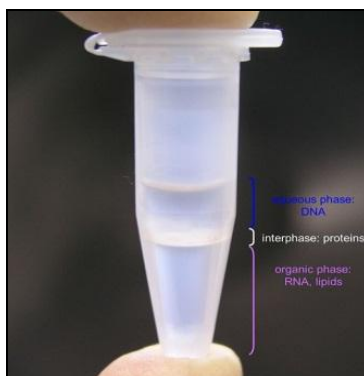


**Obr. 9** Silikagelové kolonky

<http://www.goffinmoleculartechnologies.com/genomic-and-plasmid-dna-isolation/>

## Fenol – chloroformová extrakce

K lyzovaným buňkám je přidán fenol, jenž způsobí denaturaci proteinů a degradaci lipidů. Následuje centrifugace, během níž dochází k oddělení spodní organické fáze, mezifáze s denaturovanými proteiny a vrchní fáze s přítomnými NK, ukázka je uvedena na obr. 10. Poté dochází k separaci horní fáze a následné precipitaci NK etanolem. Po tomto kroku může být NK rozpuštěna ve vhodném pufru či vodě [109,111].



**Obr. 10** Fenol- chloroformová extrakce

[http://openwetware.org/wiki/Image:DNA\\_extraction\\_w\\_phenol\\_chloroform.jpg](http://openwetware.org/wiki/Image:DNA_extraction_w_phenol_chloroform.jpg)

## Pryskyřice

Pryskyřice (anglicky resin) umožňuje izolace NK na základě iontoměničových vlastností (viz obr. 11). Principiálně izolace DNA spočívá v navázání a následném uvolnění NK za využití specifických iontoměničů. Nejprve dochází k lýze buňky, poté k navázání DNA na resinový iontoměnič a následně je provedena filtrace či separace. V posledním kroku je NK z pryskyřice uvolněna a za vhodných podmínek uskladněna [110].



**Obr. 11** Resin

<http://worldwide.promega.com/products/pm/genetic-identity/dna-iq/dna-iq/>



## **Magnetické částice**

Metoda používá magnetické částice, jejichž jádro je tvořeno magnetitem či zlatem. Povrch těchto částic je specifickým způsobem modifikován tak, aby se na ně mohla navázat NK. K vyšetřované NK jsou přidány magnetické částice a ta se na ně posléze naváže. Poté se zkumavka umístí do blízkosti magnetu, magnetické částice jsou separovány k povrchu zkumavky a zbylý roztok je odstraněn. Následně jsou NK z vazby na magnetické částice uvolněny a eluovány do roztoku [110].

### **2.12.3.2 PCR – reakční komponenty**

Správná volba vhodných reakčních komponent je nezbytným předpokladem pro standardizaci a reprodukovatelnost PCR reakce. Mezi základní složky potřebné k realizaci této molekulárně biologické metody patří:

- templátová DNA
- primery
- $Mg^{2+}$  ionty
- volné deoxyribonukleotidtrifosfáty
- reakční pufr
- DNA polymeráza

### **Templátová DNA**

Pro správné provedení PCR reakce je nutné, aby DNA byla „čistá“ (přítomnost RNA snižuje výtěžnost reakce) a v dostatečném množství. Pro bakteriální DNA je doporučováno množství 1 – 10 ng (některé publikace uvádějí i 50 pg), pro virovou NK 0,17 pg, pro plazmidovou 0,1 – 1 ng. Pokud bychom chtěli detekovat přítomnost RNA, musí být nejprve tato molekula „přepsána“ specifickým enzymem reverzní transkriptázou do cDNA [112,113].

### **Primery**

Primery jsou uměle syntetizované specifické sekvence DNA v délce 18 – 24 bp. Na primery jsou kladeny specifické požadavky. Nesmí být k sobě navzájem komplementární, poměr DNA bází G : C by se měl pohybovat v rozmezí 40 – 60 % a měly by mít obdobnou teplotu tání ( $T_m$ ).  $T_m$  je specifická teplota, při níž je 50 % dvouvláknové DNA (dsDNA) denaturováno na jednovláknovou DNA (ssDNA). Vzorec pro výpočet  $T_m$  je následující :

$$T_m = ((\text{počet G} + \text{C}) \times 4 \text{ }^\circ\text{C} + (\text{počet A} + \text{T}) \times 2 \text{ }^\circ\text{C})$$

Koncentrace primerů musí být optimalizována, zpravidla se pohybuje mezi 0,1 až 0,6  $\mu\text{M}$ . Nízká koncentrace vede ke snížení výtěžnosti PCR reakce, vysoká koncentrace může mít za následek chybné nasedání primerů během annealingu či vznik nespecifických PCR amplikonů [109,112,114].

### **Mg<sup>2+</sup> ionty**

Mg<sup>2+</sup> ionty jsou důležité pro správnou funkci DNA polymerázy, jelikož tvoří komplex s volnými nukleotidy, který je pro enzym nesmírně „atraktivní“. Přesná koncentrace Mg<sup>2+</sup> se ve většině případů stanovuje pouze experimentálně, její rozmezí by se mělo pohybovat mezi 1,5 – 6 mM [109].

### **Volné deoxyribonukleotidtrifosfáty**

PCR reakce vyžaduje ekvimolární poměr všech 4 deoxyribonukleotidtrifosfátů (dNTP). Zásobní roztoky mají zpravidla koncentraci dNTP v rozmezí 100 – 300 mM. Optimální pracovní koncentrace dNTP by se měla pohybovat mezi 50 – 250  $\mu\text{M}$  [109,114].

### **Reakční pufr**

Hodnota pH reakčního pufru by se měla být v rozmezí pH = 8,3 – 9,0, její udržení je esenciální pro správný průběh PCR reakce. Pufr zpravidla obsahuje 100 mM Tris-HCl (pH = 8,5), maximálně 500 mM KCl (esenciální pro specifické nasednutí primeru na templátovou DNA ve fázi annealingu), dalšími komponentami mohou být dimethylsulfoxid (2 – 10% v/v - redukuje nespecifické vazby primeru), detergenty (Tween 20) apod. [112,114].

### **DNA polymeráza**

Termostabilní enzym DNA polymeráza je ve většině případů izolována z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Enzym pomáhá přiřazovat volné dNTP rychlostí 60 bp/s a pomáhá k syntéze komplementárního vlákna. Optimální množství DNA polymerázy by mělo být 0,5 - 0,25 U na 25 – 50  $\mu\text{l}$  reakční směsi. Byla prokázána skutečnost, že heparin, porfyryny, methanol a detergenty inhibují aktivitu tohoto enzymu [109,112].

#### **2.12.3.3 Provedení konvenční PCR reakce**

Jak je naznačeno na obr. 12, PCR probíhá v 3 základních krocích:

- denaturace
- annealing
- extenze (viz obr. 12)

### Denaturace

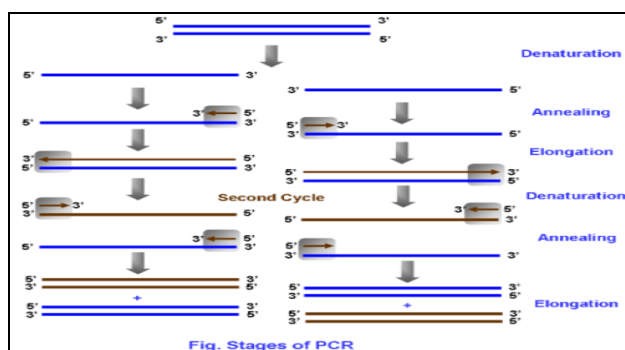
Během této fáze dochází při teplotě 92 – 95 °C k rozpletení dvouvláknové DNA a vzniku 2 templátových vláken ssDNA. Pro krátké PCR amplikony (< 300 bp) je doporučována délka reakce 1 min při použití standardní DNA polymerázy, při použití Hot start polymerázy (HS) je vyžadováno pro její aktivaci až 15 min [107].

### Annealing

Ve fázi annealingu je reakční teplota snížena na 55 – 60 °C. Během tohoto kroku dochází ke specifickému nasedání použitých primerů, které hybridizují k templátové ssDNA na základě komplementarity DNA bází. Jeden primer nasedá na 1. templátové vlákno ve směru 5' → 3', druhý primer na specifický úsek 2. templátového vlákna také ve směru 5' → 3'. Tímto krokem vznikne přesně ohraničený úsek DNA, který chceme amplifikovat. Optimálně zvolená teplota annealingu závisí na  $T_m$  primerů, správné koncentraci  $Mg^{2+}$  a koncentraci reakční směsi tzv. master mixu (MM) [107,114].

### Extenze

Ve třetím kroku, extenzi, se reakční teplota opět zvýší zpravidla na 72 °C a termostabilní DNA polymeráza začíná na základě komplementarity DNA bází syntetizovat nový řetězec DNA [108,115].



Obr. 12 Princip PCR reakce

<http://molecularhub.blogspot.cz/2011/01/pcr.html>

## Počet PCR cyklů

Všechny cykly se opakují zpravidla 35 – 40×, počet nově syntetizovaných kopií roste geometrickou řadou dle funkce  $T_n = T_0 (E)^n$ , kde  $n$  znamená počet realizovaných PCR cyklů,  $T_0$  počet templátů DNA v cyklu 0,  $T_n$  počet templátů v cyklu  $n$  [116].

### 2.12.3.4 Detekce PCR amplikonů

Molekuly DNA mají záporný náboj díky přítomnosti fosfátových skupin a ve stejnosměrném elektrickém poli tedy putují k anodě. Detekce DNA amplikonů se u konvenční PCR reakce realizuje gelovou elektroforézou za využití agarózového či polyakrylamidového gelu.

#### Agarózové gely

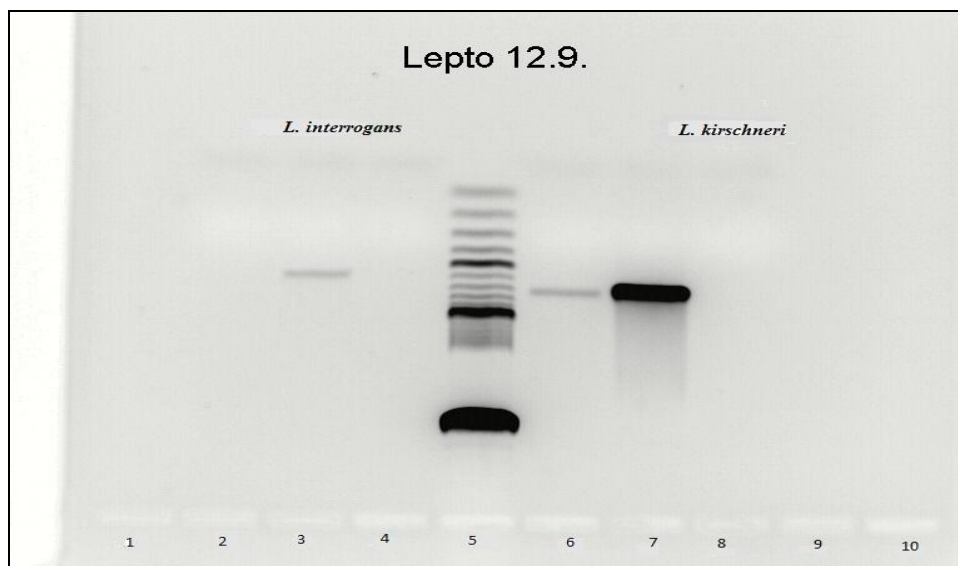
Agarózové gely mají rozlišovací schopnost, jež se pohybuje mezi 50 – 20 000 bp a jejich příprava je velice jednoduchá. Velikost pórů, tedy separační schopnost agarózového gelu, je závislá na koncentraci agarózy.

#### Polyakrylamidové gely

Polyakrylamidové gely mají vysokou rozlišovací schopnost, jež se pohybuje v rozmezí 5 - 500 bp, u těchto gelů můžeme od sebe oddělit i DNA fragmenty lišící se o bp. Jejich příprava je však složitější.

Detekční činidlem je v tomto případě interkalační barvivo ethidium bromid, který se integruje do velkého žlábků molekuly DNA. Po expozici barviva ultrafialovému záření (UV) o délce  $\lambda = 260 - 300$  nm dochází k excitaci fluorescenčního barviva a k jeho následné vizuální detekci.

Pro zvýšení senzitivity vyšetření lze k detekci PCR amplikonů použít i metoda Southern – blotu, kdy je uskutečněna hybridizace amplikonů ke specificky značené sondě (angl. probe). Velikost PCR amplikonů je odečtena na základě porovnání pozice amplifikačního proužku detekovaného PCR produktu s hmotnostním markerem [109]. Na obr. 13 je PCR záznam na agarózovém gelu pro genom-species *L. interrogans* a *L. kirschneri*: pozice 1 -, pozice 2 negativní pacient *L. interrogans*, pozice 3 pozitivní kontrola *L. interrogans*, pozice 4 negativní kontrola *L. interrogans*, pozice 5 hmotnostní marker, pozice 6 pozitivní pacient *L. kirschneri*, pozice 7 pozitivní kontrola *L. kirschneri*, pozice 8 negativní kontrola *L. kirschneri*, pozice 9 a 10 -.



**Obr. 13** Elektroforetická detekce PCR ampliconů patogenních leptospir na agarózovém gelu

## 2.13 Rt PCR

Na rozdíl od konvenčního provedení PCR reakce, jsou data týkající se detekce PCR ampliconu k dispozici již během samotné PCR metody, ne až na konci amplifikace po realizaci elektroforetické detekce. Jedná se o velice senzitivní a pružnou metodu identifikace infekčního agens.

### 2.13.1 Využití rt PCR v mikrobiologii

Rt PCR metoda byla vědeckými pracovníky vyvinuta pro on-line záznam sledování syntézy DNA, pro potřeby její kvantifikace, nepostradatelným pomocníkem je také pro určení počátečního množství kopií DNA testovaného mikroorganismu. K detekci nově syntetizované DNA se používá on-line záznam fluorescence NK značené fluorescenčním barvivem na konci každého PCR cyklu. Přibližně 75 – 90 % detekcí NK mikroorganismů je realizováno rt PCR metodou [115,116].

### 2.13.2 Princip provedení rt PCR metody

#### 2.13.2.1 Izolace nukleových kyselin

Princip izolace nukleových kyselin je obdobný jako u konvenčního způsobu provedení PCR reakce (viz kapitola 2.12.3.1), k izolaci DNA jsou nejčastěji využívány silikagelové kolonky.

### 2.13.2.2 Reakční komponenty

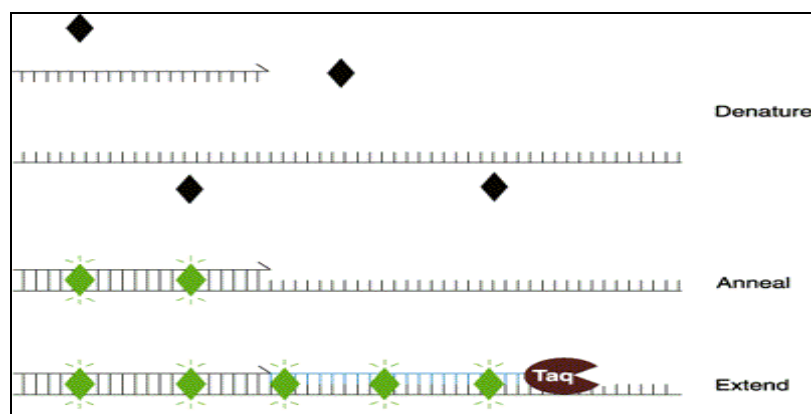
Reakční komponenty jsou opět obdobné jako u konvenčního PCR provedení, k fluorescenčnímu značení DNA se používají následující fluorescenční sondy:

#### a) Nespecifické fluorescenční sondy

V rt PCR reakci se využívá nespecifických fluorescenčních sond - interkalačních barviv jako je SybrGreen I, Ethidium bromid, EvaGreen, která se začleňují do „malého žlábků“ dvouvláknové DNA.

Fluorescenci lze u nespecifických sond detekovat pouze u dvouvláknové DNA, pokud jsou přítomny samostatně v roztoku, nefluoreskují. V průběhu PCR dochází při denaturační fázi (zvýšení teploty na 95 °C) k prudkému poklesu fluorescenčního záření z výše zmíněného důvodu, ve fázi annealingu a v průběhu syntézy komplementárního řetězce DNA polymerázou exponenciálně narůstá intenzita fluorescence (viz obr. 14) [107,109,115]. Výhodou použití těchto nespecifických fluorescenčních barviv je jejich nízká pořizovací cena, snadné vytvoření PCR eseje a jejich využití pro detekci různých mikroorganismů [107].

Nevýhodou nespecifických sond je skutečnost, že se mohou navázat i na nespecifické PCR produkty a také že u nich dochází k tvorbě tzv. dimerů primerů. Tato skutečnost nemá zásadní vliv na vyhodnocení  $T_m$ , ale při kvantitativním vyhodnocení může vést k nepřesnostem [109].



Obr. 14 SybrGreenI

<http://www.b2b.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Nucleic-Acid-Detection-and-Genomics-Technology/Nucleic-Acid-Detection-and-Quantitation-in-Solution.html>

## **b) Specifické fluorescenční sondy**

Mezi specifické fluorescenční sondy patří – hybridizační sondy FRET, hydrolyzační sondy TaqMan, Molecular beacons sondy a sondy Scorpions. Sondy jsou specifické k vybranému úseku jednovláknové DNA, se kterým v rámci principu komplementarity DNA bází specificky hybridizují.

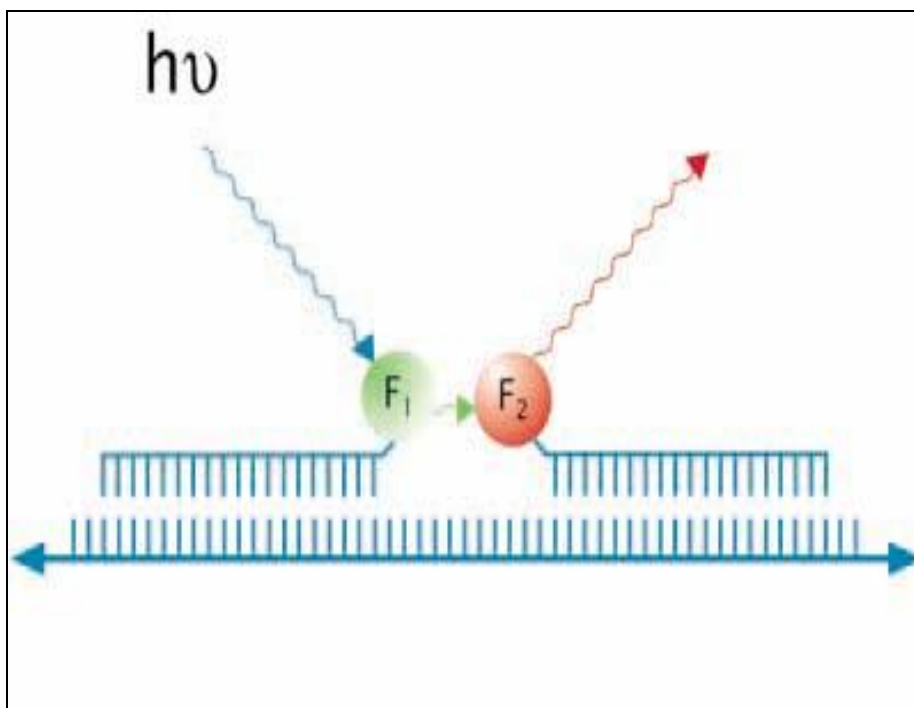
Specifické sondy pracují na systému fluorescenčně rezonančního přenosu energie (FRET) mezi molekulou fluorescenčního barviva a zhášedčem. Jedná se o interakci mezi 2 molekulami v excitovaném stavu, jež je závislá na vzdálenosti, při které je excitovaný stav přenesen z donoru na akceptor bez emise přebytečného záření. Podmínkou pro uskutečnění této interakce je blízkost (10 – 100Å) molekuly donoru a akceptoru. Ve většině případů jsou molekuly odlišné a FRET je detekován intenzitou fluorescence akceptoru, ne zhášením fluorescence donoru. Nárůst hodnoty fluorescence je zapříčiněn zvýšením relativní vzdálenosti mezi molekulou fluoroforu a zhášedče. Fluorochromy absorbují UV záření, přičemž dochází k excitaci elektronů a následné emisi přebytečné energie ve formě viditelného světla [109,114].

### **Hybridizační sondy FRET**

Při praktické aplikaci této metodiky, se využívají 2 sondy, jež na PCR produktu hybridizují těsně vedle sebe v maximální vzdálenosti 1 – 5 bp. Jedna sonda je značena na 5' konci, druhá na 3' konci. Pokud dojde k jejich hybridizaci na templátovou DNA, sondy se dostanou do bezprostřední blízkosti a následně dochází po aplikaci světelného záření vhodného  $\lambda$  k FRET (viz obr. 15).

U těchto hybridizačních sond se ve většině případů nevyužívá molekuly zhášedče, ale je přítomno sekundární fluorescenční barvivo s vyšší  $\lambda$  než primární fluorescenční barvivo.

Se zvyšujícím se počtem amplifikované DNA vzrůstá i množství molekul sekundárního fluoroforu (akceptor). Následně dochází k nárůstu intenzity fluorescence sekundárního fluorescenčního barviva, jež je detekována ve fázi annealingu (viz obr. 15) [107,109,116,117].



**Obr. 15** Hybridizační sondy FRET

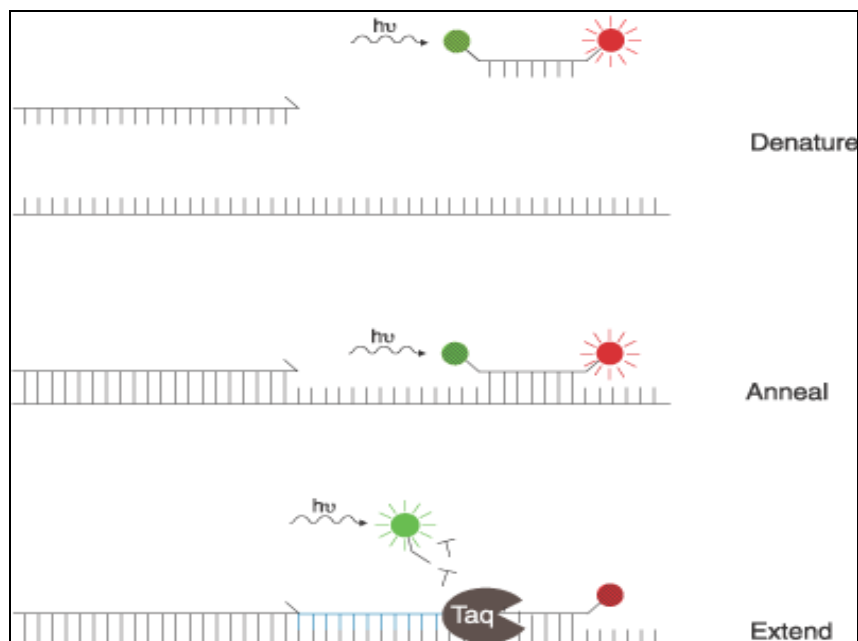
<http://www.ysinhhocphantu.com/training/ky-thuat-real-time-pcr/8/>

### Hydrolyzační sondy TaqMan

Jak je naznačeno na obr. 16, princip použití hydrolyzačních sond spočívá v tom, že jejich sekvence je komplementární k ssDNA a následně s ní ve fázi annealingu hybridizují. TaqMan sondy mají na jednom konci navázáno fluorescenční barvivo, na druhém konci jiný typ fluorescenční molekuly či tzv. zhášeč.

Využívá se tzv. 5' → 3' exonukleázové aktivity enzymu DNA polymerázy, která TaqMan sondu ve fázi extenze hydrolyzuje a následně dochází k odloučení dvou rozdílných fluorescenčních barviv nebo fluorescenční molekuly a zhášeče. Molekula zhášeče začne po excitaci vydávat přebytečnou energii ve formě fluorescenčního záření. Se zvyšujícím se množstvím nasyntetizovaných molekul DNA, dochází i k nárůstu oddělených molekul fluorescenčního barviva, což má za následek odpovídající zvýšení intenzity fluorescence [107,109,114].





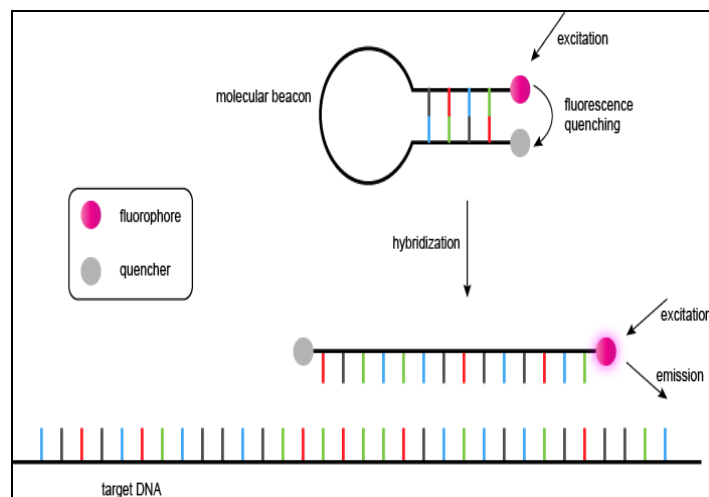
**Obr. 16** Hydrolyzační sonda

<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/Molstudents/spring2003/Pierce/realtimepcr.htm>

### **Beacon sondy**

Z obr. 17 je patrné, že beacon sonda se skládá se dvou částí, vnitřní část je komplementární k templátové DNA a následně s ní hybridizuje, na obou koncích má ale navíc krátké sekvence (5 - 8 bp), jež jsou k sobě navzájem komplementární. „Volná“ beacon sonda má tvar vlásenky a díky komplementárnímu spojení obou jejích konců (na jednom je přítomno fluorescenční barvivo a na druhém molekula zhášedce) je přítomen intenzivní FRET. K emisi fluorescenčního záření nedochází, protože molekula fluoroforu a zhášedce jsou v těsné vzdálenosti.

Za situace, že je přítomen specifický PCR produkt, beacon sonda k němu během fáze annealingu specificky hybridizuje. Po odštěpení molekuly fluoroforu a zhášedce DNA polymerázou, emituje beacon sonda po excitaci přebytké množství energie ve formě fluorescence [109,116,117].



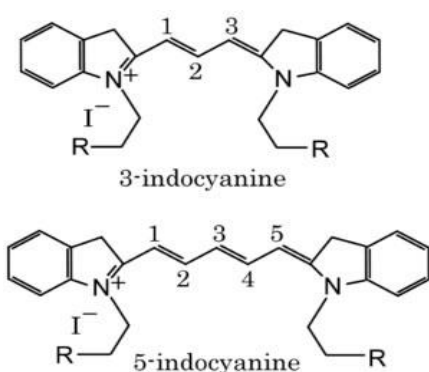
**Obr. 17** Beacon sonda

<http://www.atdbio.com/content/20/Sequencing-forensic-analysis-and-genetic-analysis>

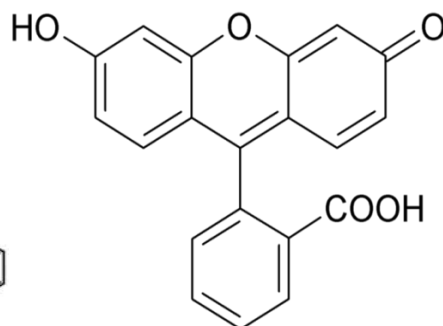
### Fluorescenční barviva a zhášče

V praxi se nejčastěji používají fluorescenční barviva fluorescein, hexachlorfluorescein (HEX), cyaninová barviva Cy3 a Cy5 (vzorce fluoresceinu a Cy3 a Cy5 jsou uvedeny na obr. 18 a 19).

Jako zhášče se používá 6-karboxy-tetramethylrhodamin (TAMRA), 4-((4-(dimethylamino)phenyl)azo) benzoová kyselina (DABCYL), 4-(dimethylamin)azobenzen-4'-sulfatyl chlorid (DABSYL) a nejčastěji tzv. „zhášče černé díry“ (BHQ) [107,109].



**Obr. 18** Vzorec Cy3 a Cy5



**Obr. 19** Vzorec fluoresceinu

#### 2.13.2.3 Provedení rt PCR reakce

Samotný průběh rt PCR je principiálně obdobný konvenční PCR analýze. Nejprve dochází zpravidla při teplotě 95 °C k rozpletní dvouvláknové DNA a k aktivaci DNA polymerázy, následuje fáze annealingu charakterizovaná nasednutím specifických primerů

na templátovou DNA a snížením reakční teploty na 55 – 60 °C. V závěrečné fázi PCR reakce, extenzi, se teplota opět zvyšuje nejčastěji na 72 °C. Celkový počet uskutečněných amplifikačních cyklů se pohybuje mezi 30 – 45 [115].

#### **2.13.2.4 PCR cykléry**

PCR cykléry prodělaly v posledních letech dynamický rozvoj. Dříve se k regulaci teploty během samotného provedení PCR reakce používal olej proudící v dutinách hliníkového bloku amplifikační komory. Jiný typ PCR cyklérů využívá k ohřevu tzv. Peltierova bloku, při jeho použití se zkrátila doba potřebná pro realizaci jednoho PCR cyklu o jednu třetinu. Při těchto dvou variantách PCR cykléru byly používány reakční zkumavky [118].

#### **Rapid cykléry – LightCycler (Roche)**

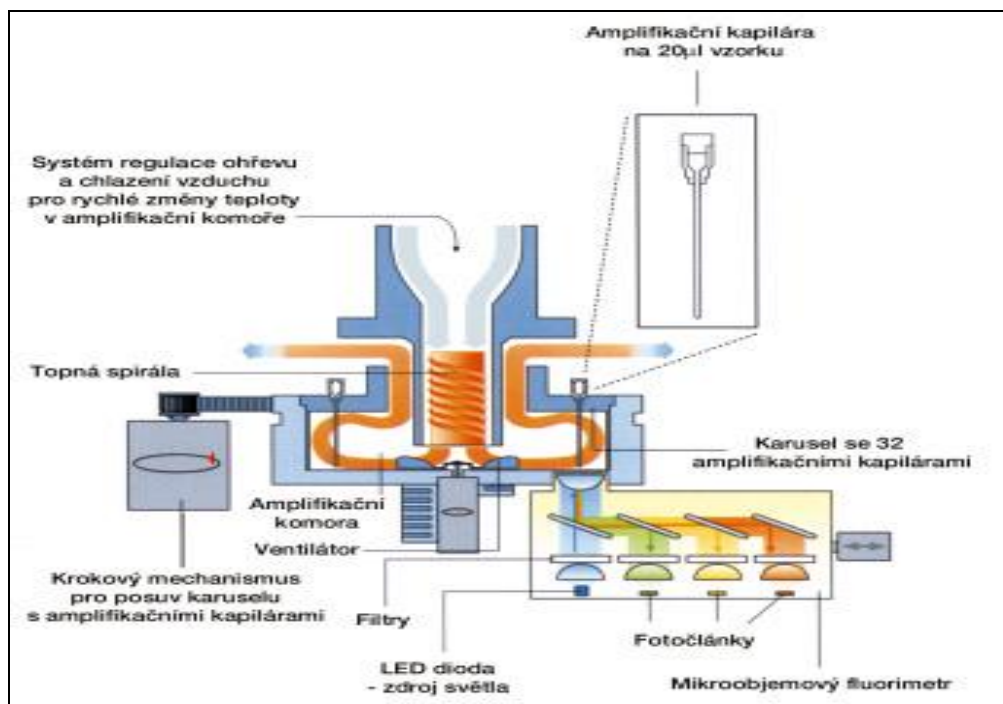
Rapid cykléry již nevyužívají reakční zkumavky, jsou nahrazeny reakčními kapilárami z křemičitého skla. Teplotní změny v cykléru jsou založeny na změně teploty proudícího vzduchu, jenž je ohříván halogenovou lampou. Teplotní čidlo se nachází na stěně skleněné kapiláry, regulace teploty (ohřev a chlazení) má na starosti mikroprocesor. Teplotní změny jsou velmi rychlé, dějí se rychlostí 20 °C za s, zvolené amplifikační teploty je dosahováno s přesností  $\pm 0,3$  °C.

Doba potřebná k syntéze DNA se zkrátila více než 15×, doba jednoho PCR cyklu se zkrátila na 30 s. Najednou je možné zpracovat až 32 biologických materiálů. Po každém provedeném PCR cyklu jsou kapiláry „přesunuty“ z amplifikační komory do pozice, v níž je detekována intenzita fluorescence. LED dioda ozáří skleněnou kapiláru světelným zářením o vlnové délce  $\gamma = 470$  nm, při které dochází k excitaci fluorescenčního barviva, přebytečná energie je vyzářena ve formě fluorescenčního záření. Emitované záření je dále vedeno přes filtry, zrcadla až do měřicích kanálů - 530 nm, 640 nm a 710 nm (viz obr. 20 a 21) [118].



**Obr. 20** LightCycler 1.5 (Roche)

<http://tuba-negin.com/product/5/>



**Obr. 21** Schematické uspořádání LightCycleru [118]

### **2.13.2.5 Amplifikační křivka**

#### **Počáteční amplifikace - baseline**

Pro typickou amplifikační křivku závislosti intenzity fluorescence na počtu realizovaných PCR cyklů získanou v průběhu rt PCR platí, že na počátku amplifikace je hodnota fluorescence velmi nízká, pod úrovní detekce [107]. Jak je naznačeno na obr. 22 křivka se skládá z exponencionální, lineární a plató fáze.

#### **Exponencionální fáze**

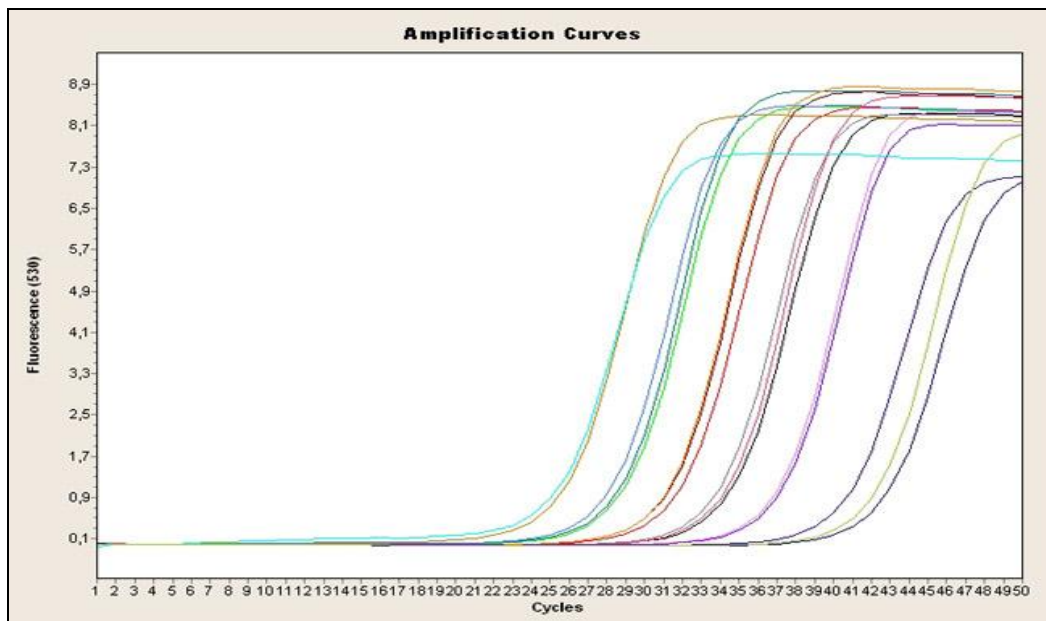
Po nasyntetizování dostatečného množství nových kopií DNA dochází k exponencionálnímu nárůstu intenzity fluorescence. V dalším kroku dochází k překonání prahu detekce (angl. threshold), což je hodnota fluorescence nastavená automaticky PCR cyklérem či samotným uživatelem. Pro číslo cyklu (Ct), ve kterém dochází k překročení prahu detekce, je charakteristické, že čím nižší je jeho hodnota, tím vyšší počet kopií genomu byl přítomen na počátku amplifikačního procesu a naopak. Jak je uvedeno na obr. 22 nejvyšší počet kopií genomu obsahoval vzorek s tyrkysovou barvou amplifikační křivky. Délka této fáze závisí na koncentraci templátu a optimálně zvolených parametrech rt PCR, v ideálním případě jsou z 1 molekuly templátu syntetizovány 2 nové molekuly DNA [107,115].

#### **Lineární fáze**

Poté následuje fáze lineárního nárůstu intenzity fluorescenčně značeného PCR produktu, kdy intenzita fluorescence rovnoměrně stoupá s počtem uskutečněných PCR cyklů. [115].

#### **Plató fáze**

Ve fázi plató jsou plně vyčerpány primery a volné dNTP, jež byly pro PCR reakci k dispozici. Dochází k zastavení nárůstu intenzity fluorescence, její hodnota a množství syntetizované DNA zůstává konstantní [115].



**Obr. 22** Záznam rt PCR analýzy

<http://www.ijm.fr/ijm/plates-formes/genomique>

### 2.13.2.6 Metody kvantifikace genové exprese

#### a) Absolutní metoda kvantifikace genové exprese

Absolutní metoda kvantifikace genové exprese využívá tzv. standardní křivky získané pro známý standard. Ct vzorku může poté být porovnána se standardní křivkou připravenou pro různé počty kopií genomu a následně tedy může být podle výsledné hodnoty Ct určeno množství DNA ve vzorku [111,115].

**Základní rovnice pro tvorbu produktu PCR reakce [115] :**

$$C_n = C_0 \times (1 + E)^n$$

$C_n$  - aktuální počet kopií genomu v cyklu  $n$

$C_0$  - počet kopií genomu v cyklu 0

$E$  - efektivita amplifikace cílového genu

$n$  - počet uskutečněných PCR cyklů

**Základní rovnice pro intenzitu fluorescence v průběhu PCR reakce [115] :**

$$R_n = R_0 \times (1 + E)^n$$

$R_n$  - aktuální hodnota intenzity fluorescence v cyklu  $n$

$R_0$  - počáteční hodnota intenzity fluorescence

$E$  - efektivita amplifikace cílové genu

$n$  – počet uskutečněných PCR cyklů

**Efektivita PCR amplifikace [117]**

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

$E$  – efektivita PCR amplifikace, **Slope** – směrnice standardní křivky

Efektivita PCR amplifikace rovná 100 % svědčí o robustnosti a reprodukovatelnosti PCR analýzy. V praktickém provedení se pohybuje mezi 90 – 105 %. Snížená efektivita svědčí o špatném návrhu sekvencí použitých primerů a špatné optimalizaci parametrů PCR reakce. Hodnoty nad 100 % poukazují na chybu v pipetování či vzniku nespecifických PCR amplikonů [117].

## **b) Relativní metoda kvantifikace genové exprese**

Relativní metoda kvantifikace genové exprese spočívá v porovnání genové exprese stanovovaného genu s kontrolou, jíž ve většině případů bývá housekeepingový gen. Při použití této metody odpadá tedy potřeba přípravy standardní křivky [115,117].

**Základní rovnice pro výpočet relativní metody kvantifikace genové exprese [115]**

$$R = \frac{E_{tar}^{\Delta C_t(\text{control} - \text{sample})}}{E_{ref}^{\Delta C_t(\text{control} - \text{sample})}}$$

$E_{tar}$  = efektivita PCR genové exprese cílové genu

$E_{ref}$  = efektivita PCR genové exprese referenčního genu

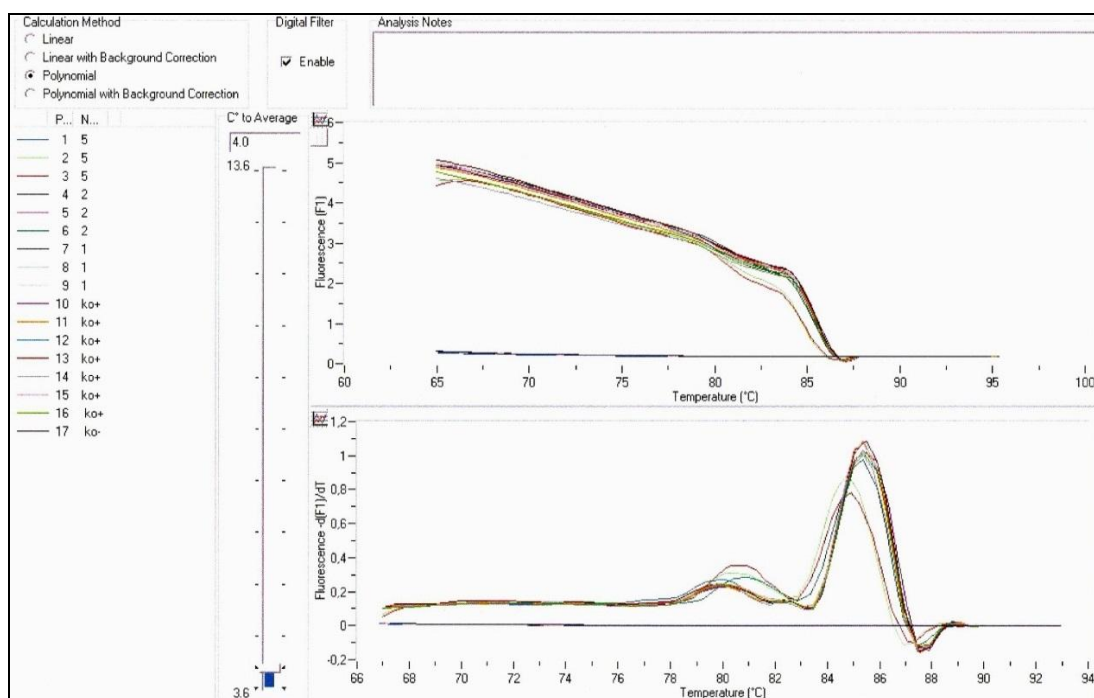
$\Delta C_{tar}(\text{control} - \text{sample})$  = rozdíl v počtu  $C_t$  mezi kontrolou a analyzovaným vzorkem

$\Delta C_{ref}(\text{control} - \text{sample})$  = rozdíl v počtu  $C_t$  mezi referenční kontrolou a vzorkem

### 2.13.2.7 Analýza teploty tání

Po provedení rt PCR analýzy se povaha PCR ampliconu zjišťuje provedením tzv. analýzy teploty tání. Princip spočívá v postupném zvyšování reakční teploty (maximálně na 95 °C), tj. nad hodnotu, při níž je očekávána  $T_m$  analyzované DNA.  $T_m$  je teplota, při níž DNA taje nejrychleji a při vynesení závislosti intenzity fluorescence na reakční teplotě a její derivaci –  $dF/dT$  se jedná o nejvyšší reakční pík, jenž je specifický pro námi sledovaný PCR produkt. Píky charakteristické pro specifické produkty PCR reakce mají vyšší teplotu než nespecifické reakční produkty.

V případě, že je detekována pouze jediná  $T_m$  a souhlasí s hodnotou experimentálně vypočítanou pro konkrétní PCR produkt, může být daný výsledek  $T_m$  spolehlivě vyhodnocen. Pokud jsou dále přítomny nespecifické PCR produkty, mohou být přítomny další píky. V případě, že jsou přítomny pouze  $T_m$  odlišné od experimentálně vypočítané hodnoty, nelze považovat výsledek analýzy teploty tání za dostatečně průkazný. V horní části obr. 23 je typický záznam analýzy teploty tání – závislosti intenzity fluorescence na teplotě, dolní část zachycuje první derivaci záznamu. Pro DNA patogenních leptospir platí, že  $T_m = 84,6 \pm 0,13$ .



Obr. 23 Záznam Analýzy teploty tání



## 2.14 Praktická aplikace PCR v laboratorní diagnostice patogenních leptospir

Pro diagnostiku akutní formy leptospirózy (1. týden klinických příznaků) je nezbytné, aby PCR metoda používaná k detekci DNA patogenních leptospir v krvi či moči měla co nejvyšší detekční limit. Důvodem je skutečnost, že na počátku onemocnění je počet kopií genomu patogenních leptospir v biologickém materiálu nízký. Pro molekulárně biologickou metodu je také charakteristická skutečnost, že má výrazně vyšší citlivost detekce než zlatý standard přímého průkazu infekce – kultivační vyšetření. Limit detekce u většiny zavedených PCR metod používaných pro identifikaci DNA v klinických vzorcích se pohybuje v rozmezí 5 – 10 kopií genomu/ml.

Zavedením rt PCR metod, kdy se detekuje fluorescenčně značená DNA v reálném čase, ne tedy pouze v „end point“ bodu detekce a bez následné nutné elektroforézy PCR ampliconů v agarózovém gelu, lze zkrátit dobu potřebnou pro detekci NK na přibližně 5 h. Tato skutečnost je důležitá pro zahájení efektivní antibiotické terapie, jejíž včasná iniciace může mít zásadní vliv na další průběh onemocnění a může zabránit rozvoji těžkých komplikací Weilovy choroby – hepatorenálního selhání, akutního respiračního distress syndromu, hemoragické diatézy. Včasným zahájením efektivní léčby antibiotickými preparáty se výrazně snižuje mortalita leptospirózy.

Ideální PCR metoda musí mít vysokou specifitu, rychlost detekce a umožňovat simultánní provedení co nejvyššího počtu reakcí. Vzorky biologických materiálů k průkazu DNA původce by měly být odebrány co nejdříve od počátku klinických příznaků a ještě před zahájením antibiotické terapie nebo co nejdříve po její iniciaci (max. do 24 hodin).

Správný odběr biologického materiálu je limitující pro výsledek laboratorního vyšetření, neboť leptospiry se při účinné antibiotické terapii rychle rozpadají a PCR reakce může být falešně negativní, ačkoliv v organismu leptospiróza probíhá. Ke stejnému fenoménu dochází i při produkci specifických protilátek [90].

### 2.14.1 Cílové geny pro PCR detekci leptospir

#### Gen *lipL32*

Novou a perspektivní metodou v molekulární biologické diagnostice leptospir se stává průkaz genu kódujících lipoprotein LipL32, významný povrchový antigen

patogenních leptospir. Vyskytuje se u všech patogenních leptospir, jeho struktura je vysoce konzervativní a u nepatogenních leptospir jej nenacházíme [44,69,119]

### **Gen *flaB***

Dalším slibným genem pro molekulárně biologickou diagnostiku patogenních leptospir je gen kódujícího flagelin FlaB [37,119].

### **Gen *rrs2***

V mnoha odborných publikacích se také setkáváme s amplifikací 16S rRNA, konkrétně genu *rrs2*. Cerqueira a kol. (2009) [44] ve své práci uvádějí, že tato metoda detekce DNA leptospir je schopná rozlišit patogenní, intermediárně patogenní a saprofytické kmeny leptospir. V kontrastu je však tvrzení autorů Juliana Vital-Brazil a kol. (2010) [11] a Aviat a kol. (2009) [120], kteří neshledali, že by detekce 16S rRNA byla schopna rozlišit patogenní a saprofytické leptospiry. Upřednostňují detekci genu pro LipL32, podobně jako Moreno a kol. (2010) [119].

### **Další geny používané k průkazu DNA leptospir**

Nadějnými kandidáty pro odlišení patogenních leptospir od saprofytických jsou geny *rpoB*, *gyrB*, *lfb1* a *s-10-spc-a*. [119].

## **2.14.2 Typy PCR reakcí používaných pro detekci patogenních leptospir**

Pro detekci leptospirózy bylo vyvinuto široké spektrum modifikací PCR reakcí, jež se používají k laboratornímu průkazu DNA patogenních leptospir.

### **Rt PCR**

Jako optimální modifikace konvenční PCR se jeví rt PCR metoda, jež vyniká značnou rychlostí, senzitivitou, velkým počtem simultánně zpracovaných vzorků a možností kvantifikace počátečního počtu kopií genomu patogenních leptospir. Spektrum genů detekovaných za použití této techniky je široké. V hojné míře se jedná především o kvalitativní a kvantitativní detekci genu kódujícího povrchový lipoprotein LipL32 [31,87,121,122,]. V jiných publikacích je také popsána rt PCR detekce 16S rRNA, *gyrB*, *secY*, *lfb1*, *lipL41* a *flaB* genů [26,31,123,124,125,126].

### **Multiplex PCR**

Kromě konvenční PCR metody se v odborné literatuře můžeme setkat s multiplexovou PCR reakcí, kdy v 1 reakci je použito více primerů pro simultánní detekci požadovaného spektra genů. Metoda je schopná specificky rozlišovat mezi patogenními a nepatogenními genomospecies leptospir.

V publikaci Bedir a kol. (2010) [127] se autoři pokoušeli zavést multiplex PCR metodu pro odlišení patogenních leptospir od saprofytických. Využili PCR detekci oblasti pro 16S rRNA, *ligA/B* geny pro identifikaci patogenních leptospir a oblast 23S rRNA specifickou pro nepatogenní *L. biflexa*. Sugathan a kol. (2005) [25] zavedli multiplex PCR využívající G1, G2 primery a B64 I, B64 II primery pro detekci patogenních leptospir. Prokázali, že G1, G2 primery amplifikují DNA genom-species *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. santarosai* a *L. meyeri*, B64-I a B64-II jsou schopny amplifikovat pouze DNA genom-species *L. kirschneri*.

Multiplex PCR nebyla vyvinuta pouze pro detekci DNA patogenních leptospir v biologických materiálech, své využití také nachází při epidemiologických studiích zaměřených na výskyt patogenních a saprofytických leptospir ve vzorcích povrchových vod [11].

### **Nested PCR**

Nested PCR využívá 2 setů primerů, vnitřní a vnější primery. Tento krok výrazně zvyšuje senzitivitu a specifitu detekce DNA patogenních leptospir.

Nassi a kol. (2003) [128] vyvinuli nested PCR metodu detekující gen *lipL32* pro diagnostiku humánní leptospirozy. Při konvenčním provedení PCR detekce genu pro LipL32 o velikosti 264 bp měla metoda vysokou specifitu, ale nízkou senzitivitu. K odstranění tohoto nedostatku byl použit druhý pár primerů, jenž detekoval produkt o velikosti 183 bp z oblasti genu *lipL32*. Senzitivita nested PCR metody se tím zvýšila více než 20× až na 20 kopií DNA/ml.

## **2.14.3 Další metody molekulární biologie pro diagnostiku DNA patogenních leptospir**

### **2.14.3.1 Sekvenační analýza**

Pomocí sekvenační analýzy můžeme získat informace o primární struktuře DNA, tedy o specifickém pořadí nukleotidů. Principiálně existují 2 metody sekvenace DNA - první metoda je nazývána Sangerova (enzymatická), druhá Maxam – Gilbertova (chemická). Obě metody byly vyvinuty nezávisle na sobě v roce 1977.

### **Sangerova (enzymatická) metoda**

Sangerova metoda využívá kromě tradičních PCR komponent tzv. dideoxynukleotidů, jež mají funkci terminátorů PCR. Tyto dideoxynukleotidy se od tradičních nukleotidů liší tím, že i na 3' konci jsou deficitní v OH skupině. Z tohoto

důvodu nemůže dojít ke vzniku fosfodiesterové vazby se sousedním nukleotidem a DNA nemůže být dále syntetizována.

Reakce se dříve prováděla ve 4 oddělených zkumavkách, jež obsahovaly templátovou DNA, volné deoxynukleotidy, DNA polymerázu a jeden ze čtyř dideoxynukleotidů – dideoxyadenintrifosfát (ddATP), dideoxycytosintrifosfát (ddCTP), dideoxyguanintrifosfát (ddGTP) nebo dideoxythymintrifosfát (ddTTP), jež jsou fluorescenčně značeny.

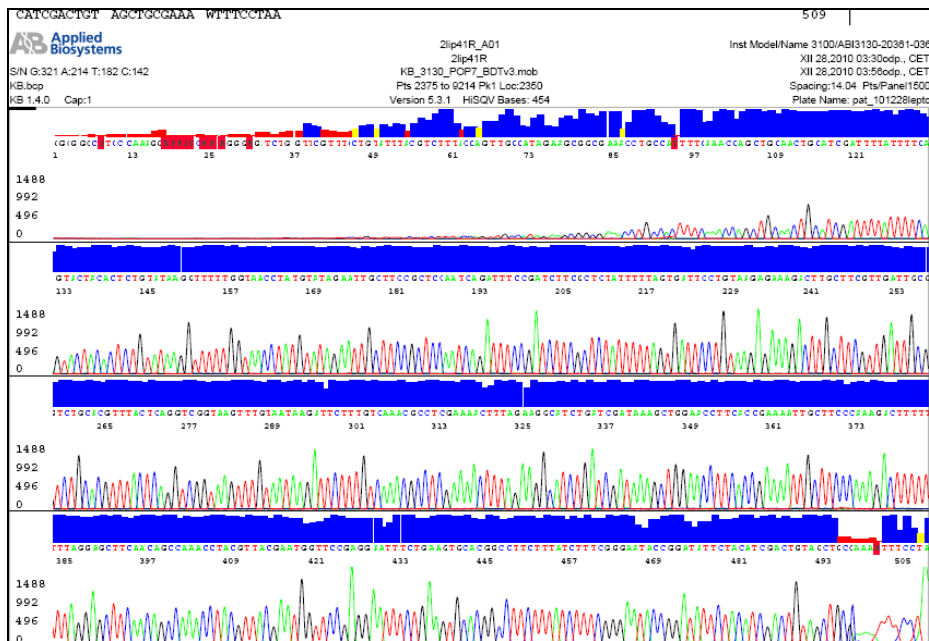
Poměr deoxynukleotidů k dideoxynukleotidům je volen 1:100, aby mohla PCR reakce probíhat standardně. Výslednými produkty PCR reakce jsou amplikony různé délky vždy zakončené specifickým dideoxynukleotidem. Amplifikační produkty jsou následně separovány na polyakrylamidovém gelu. Po ozáření UV světlem vhodné vlnové délky dochází k excitaci fluorescenčního barviva a přebytečná energie je vyzářena ve formě fluorescence. Na polyakrylamidovém gelu poté vznikají charakteristické proužky (700 - 800 bp), z jejichž polohy lze určit primární sekvenci DNA.

V dnešní době je tato metoda sekvenace již modifikovaná. K detekci specifické DNA sekvence se využívá kapilární elektroforéza. Ve většině případů je každý dideoxynukleotid značen jiným fluorescenčním barvivem a sekvenační reakce probíhá pouze v jedné kapiláře. Ze specifické barvy fluorescenčního záření lze určit pořadí nukleotidů v primární sekvenci DNA – A zelený, G černý, C modrý a T červený pik (viz obr. 24) [129,130].

### **Maxam – Gilbertova (chemická) metoda**

Principem této sekvenační metody je, že molekuly DNA jsou chemicky štěpeny za použití specifických enzymů v bázích určitého typu. Molekula ssDNA je značena radioaktivním  $P^{32}$  na 5' konci.

Sekvenační analýza probíhá ve 4 samostatných reakcích ve 4 reakčních zkumavkách s G, G + A, T, T + C. Poté následuje elektroforetická separace na polyakrylamidovém gelu. Podle specifické polohy amplifikačních proužků, lze po aplikaci určité vlnové délky světla určit, o jakou nukleotidovou bázi se jedná a následně určit primární sekvenci DNA [129,130].



**Ob. 24** Záznam Sangerovy sekvenace s využitím kapilární elektroforézy

### 2.14.3.2 Multilokusová sekvenační analýza

Multilokusová sekvenační analýza (MLST) je jednoduchá modifikace PCR techniky. Během jejího provedení se zaznamenávají a charakterizují alely přítomné v rozdílných cílových genech.

Mezi zvolené cílové lokusy všeobecně patří tzv. housekeepingové geny, které se v rámci evolučního procesu vyvíjejí velmi pozvolna. Ve studii autorského kolektivu Romero a kol. (2011) [131] se setkáme s využitím následujících housekeepingových genů: *mreA*, *pfkB*, *pntA*, *sucA*, *tpiA*, *fadD* a *glmU*. Rettinger a kol. (2012) [132] se při praktickém provedení MLST analýzy zaměřili na průkaz následujících genů: *secY*, *rrs2* (16S rRNA), *adk*, *lipL32* a *lipL41*.

Ahmed a kol. (2011) [133] ve své práci popisují dva typy MLST analýzy: detekci genů *adk*, *icdA*, *lipL32*, *lipL41*, *rrs*, *secY* a genů *pntA*, *sucA*, *pfkB*, *tpiA*, *mreA*, *glmU* a *fadD*.

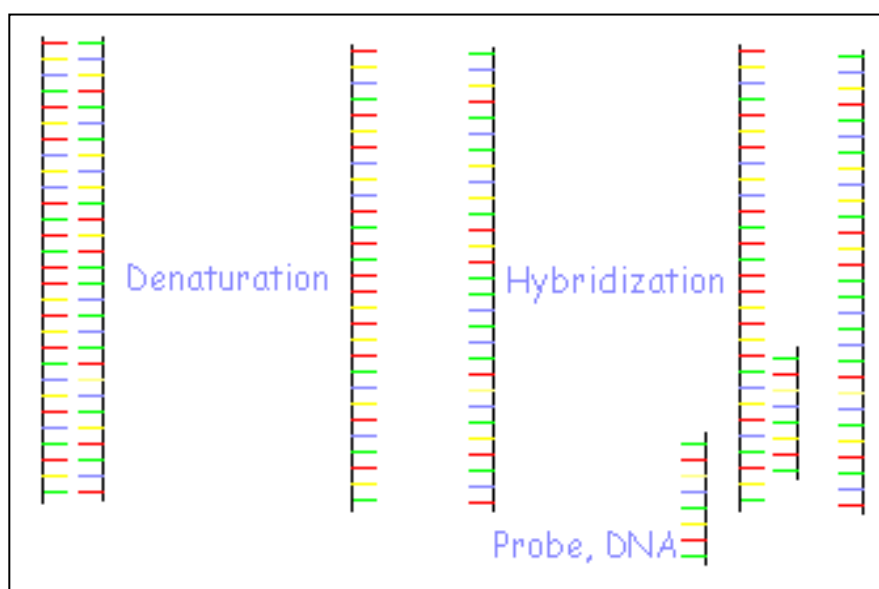
MLST analýza se stala alternativní molekulárně biologickou metodou pro identifikaci mikroorganismů na úrovni druhu, dokonce se můžeme více dozvědět i o charakteristice jednotlivých kmenů.

### 2.14.3.3 DNA - DNA hybridizace

NK, která obsahuje specifickou sekvenci, je izolována, naštěpena a specificky označena radioaktivně ( $P^{32}$ ), biotinem, digoxinem či fluorescenčním barvivem. Jak je vidět na obr. 25, značená ssDNA specificky hybridizuje k denaturované ssDNA ve tkáni (*in situ* hybridizace), na „blotovacím papíře“ (Southern blot hybridizace) či v roztoku (hybridizace v roztoku).

Pokud jsou sekvence DNA sondy komplementární k sekvencím ve vyšetřovaném vzorku, dochází k hybridizaci a výsledek tohoto procesu je detekován autoradiograficky ( $P^{32}$ ), kalorimetricky (značení biotinem, digoxinem) či je detekována fluorescence [22].

Hybridizační metoda je zlatým standardem pro identifikaci leptospir na úrovni druhu. Na základě hybridizačních reakcí bylo identifikováno 20 genomspecies leptospir [44].



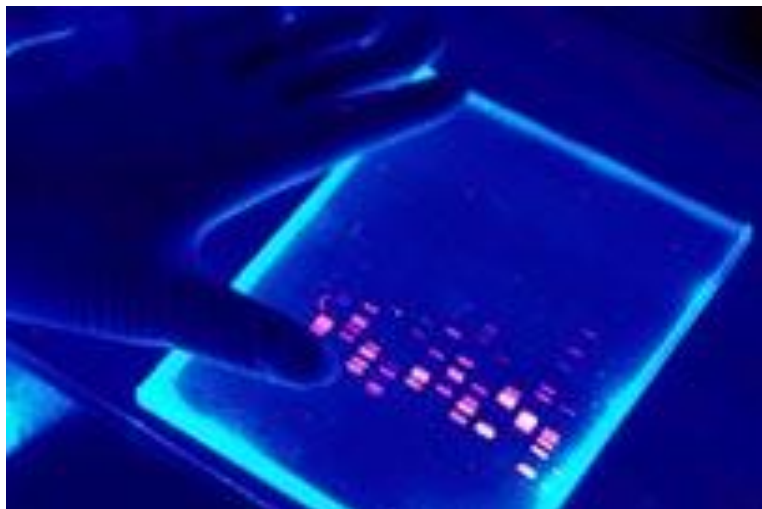
**Obr. 25** DNA – DNA hybridizace

<http://www.rothamsted.ac.uk/notebook/blot.htm>

### 2.14.3.4 DNA fingerprinting

Při metodě „otisku“ DNA nejprve dochází za použití restrikčních endonukleáz k naštěpení molekuly DNA ve specifických oblastech a ke vzniku fragmentů DNA, jež se liší svojí velikostí. Po následném provedení gelové elektroforézy lze z pozice PCR ampliconů určit specifický „otisk“ DNA (viz obr. 26), který je charakteristický pro

konkrétní genom [109]. Metoda umožňuje rychlou identifikaci čerstvě vyizolovaných kmenů leptospir [36].



**Obr. 26** DNA fingerprinting

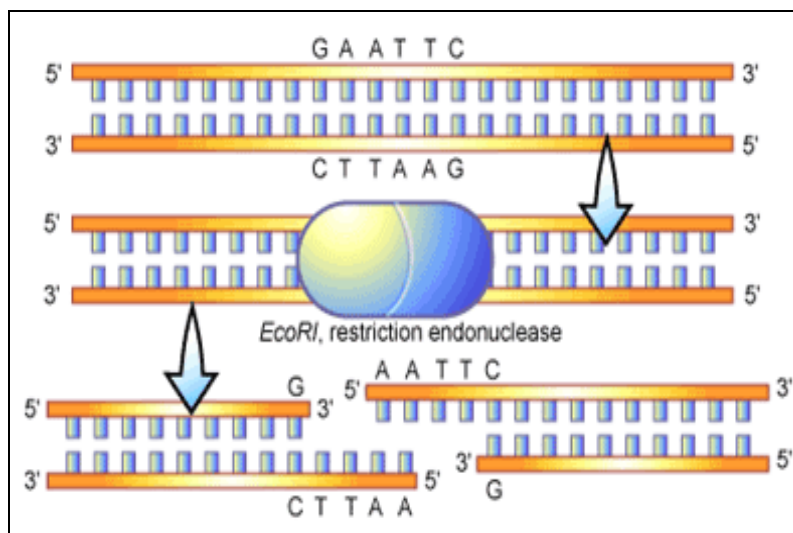
<http://www.cropgeninternational.com/DrKoebner.html>

#### **2.14.3.5 Analýza využívající restrikčních endonukleáz**

Analýza využívající restrikční endonukleázy (REA) byla poprvé pro identifikaci leptospir popsána autory Marshall a kol. v roce 1981 [22].

Jedná se o molekulárně biologickou metodu, jež není založena na sekvenačních reakcích. Za použití specifických enzymů, tzv. restrikčních endonukleáz, dochází k „naštěpení“ molekuly DNA na specifických místech a ke vzniku DNA fragmentů různé délky (viz obr. 27). Tyto specifické DNA „štěpy“ jsou následně detekovány na agarózovém či polyakrylamidovém gelu. Identifikace leptospir za použití REA metody je založena na restrikčním štěpení PCR produktů z oblasti 16S rRNA a 23S rRNA. Prvními identifikovanými sérovary leptospir analyzovanými touto metodou byly Hardjobovis a Hardjoprajitno [37].

Omezení této metody spočívá v její praconosti, neboť pro restrikční analýzu je zapotřebí poměrně velké množství bakteriální kultury a velký počet PCR ampliconů na agarózovém gelu znesnadňuje jejich přesnou identifikaci [44].



**Obr. 27** Štěpení DNA restriční endonukleázou *EcoRI*

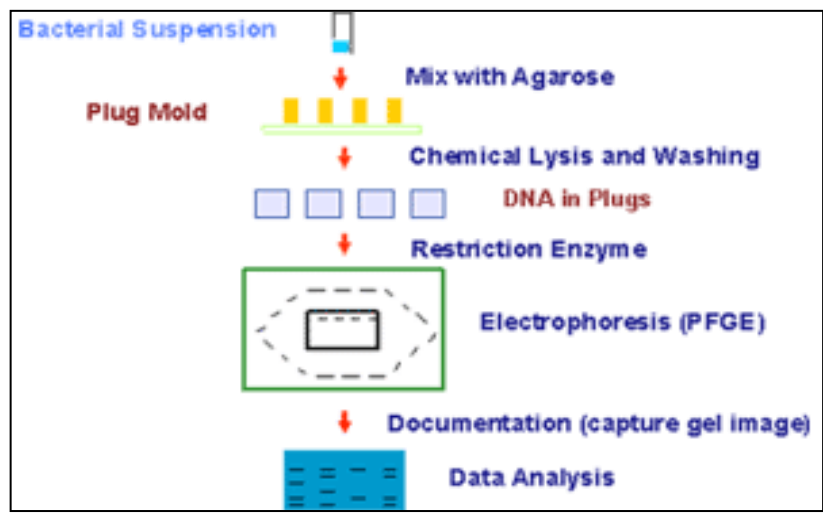
<http://www.scq.ubc.ca/restriction-endonucleases-molecular-scissors-for-specifically-cutting-dna/>

#### 2.14.3.6 Elektroforéza v gelu využívající pulzujícího elektrického pole

Jak je uvedeno na obr. 28, při elektroforéze v gelu využívající pulzujícího elektrického pole (PFGE) nejprve dochází ke smíchání bakteriální suspenze s agarózou, k lýze buněk chemickými činidly, promytí a následně k restričnímu štěpení genomu za použití specifických restričních endonukleáz, *NotI* či *SgrAI*. Poté je uskutečněna samotná pulzní gelová elektroforéza. Tato metoda je vhodná pro typizaci jednotlivých kmenů leptospir a vyhodnocení jejich příbuznosti. PFGE analýza je mnohem rychlejší než sérologické vyšetření a je považována za užitečného pomocníka při epidemiologických studiích [22].

Herrman a kol. (1992) [134] publikovali, že výsledky PFGE analýzy se shodují s výsledky sérotypizace, avšak na tuto skutečnost nelze absolutně spoléhat. Galloway a kol. (2008) [135] popsali, že PGFE analýza není schopná rozlišit mezi sérovary *Icterohaemorrhagiae* a Copenhageni genomospecies *L. interrogans*. I přes tento zmíněný fakt je metoda považována za zlatý standard molekulární typizace leptospir na úrovni příslušného sérovaru [37,44].





**Obr. 28** Praktické provedení PGFE analýzy

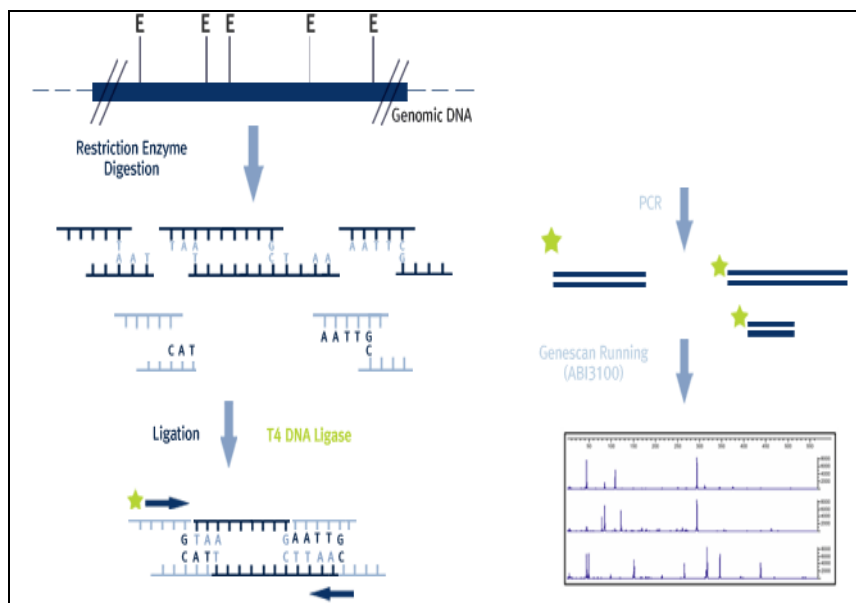
<http://www.cdc.gov/pulsenet/whatis.htm>

### 2.14.3.7 Analýza polymorfismu délky fluorescenčně značených amplifikačních fragmentů

Jedná se o velice oblíbenou genotypizační metodu, která kombinuje metodu analýzy délky restrikčních fragmentů (RFLP) s flexibilním využitím PCR [136]. Tato molekulárně biologická metoda je efektivně využívána pro epidemiologické studie a pro porozumění evoluci patogenů.

Principem metody je, že molekula DNA je restrikčními endonukleázami naštěpena na malé fragmenty a poté navázána k fluorescenčně značené sondě, jež je komplementární k použitým PCR primerům. Následně dochází k amplifikaci fragmentů (viz obr. 29) [44].

Viyajachari a kol. (2004) [136] využili analýzu polymorfismu délky fluorescenčně značených amplifikačních fragmentů (FAFLP) pro fylogenetickou analýzu příbuznosti izolátů leptospir získaných během 3 hlavních vzplanutí leptospirózy a několika jednotlivých případů leptospirózy na Andamanských ostrovech. Účelem bylo především porozumět distribuci a evoluci patogenních leptospir a sledovat asociace mezi genetickými vlastnostmi infikujících kmenů a klinickou manifestací u pacientů.



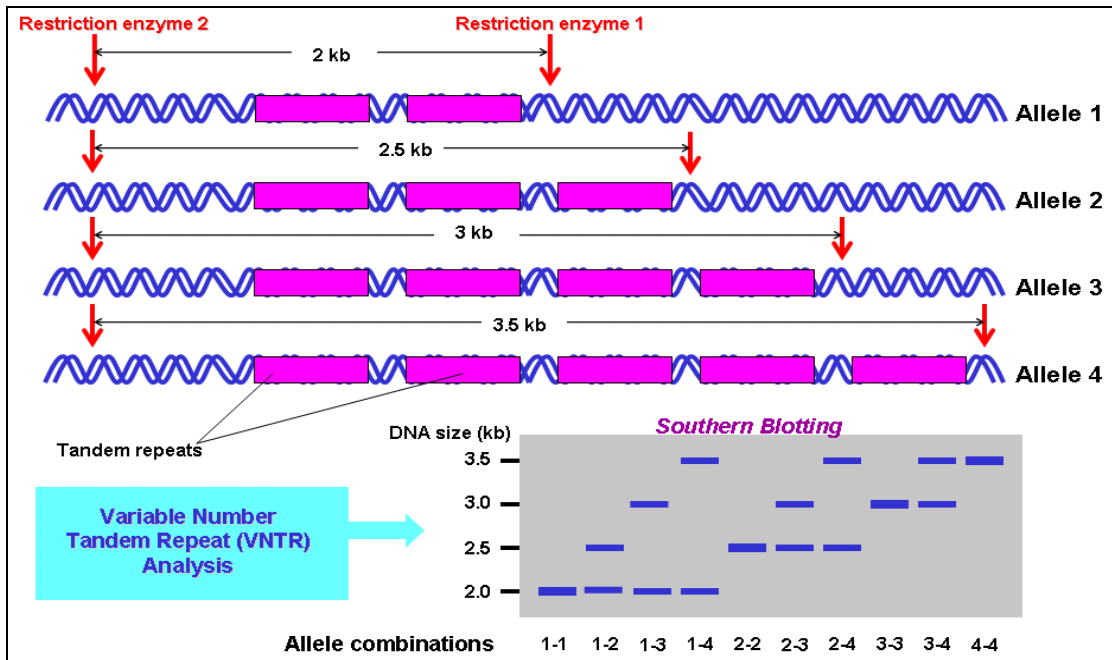
**Obr. 29** Princip provedení FAFLP analýzy

<http://www.solgent.com/english/pages/content/technology/sequencing/sequencing1.html>

#### 2.14.3.8 Analýza variabilního počtu tandemových repetit

Variabilní počty tandemových repetit (VNTR) jsou DNA polymorfizmy, jež se vyskytují v minisatelitních oblastech DNA. Jedná se o opakující se sekvence, jejichž délka se pohybuje mezi 20 - 100 bp. Odlišnost příslušných alel spočívá v počtu opakování se určitého genetického motivu, což se následně projeví ve výsledné délce alely. Využívá se restrikčních enzymů k získání specifických DNA fragmentů, jež jsou následně detekovány na agarózovém gelu metodou Southern blotu (viz obr. 30). Podmínkou pro vyšetření NK touto metodou je skutečnost, že vyšetřovaná DNA musí být nepoškozená, jelikož slouží jako templát.

K detekci VNTR polymorfizmů se používá gelová elektroforéza na agarózovém gelu, PCR amplikony je možné na tomto typu gelu relativně dobře identifikovat [109]. Jedná se o velice spolehlivou metodu umožňující studium struktury bakteriální populace a sloužící i k charakterizaci monomorfní bakteriální populace [137]. Tato metoda byla původně navržena pro patogenní genom-species *L. interrogans*, protože dovoluje identifikaci leptospir až na úroveň sérovaru.



**Obr. 30** Princip provedení VNTR analýzy

<http://classroom.sdmesa.edu/eschmid/Lab9-Biol210.htm>

## 3. MATERIÁL A METODY

### 3.1 MATERIÁL

#### 3.1.1 Laboratorní kmeny

##### 3.1.1.1 Laboratorní kmeny *Leptospira* a dalších bakterií

Pro určení pozitivní analytické specifity rt PCR metody detekce genu pro lipoprotein LipL32 bylo použito 11 laboratorních kmenů patogenních leptospir, jež se vyskytují na území České republiky (*L. icterohaemorrhagiae* Fryšava, *L. copenhageni* Lebe, *L. grippotyphosa* P125, *L. grippotyphosa* Ž6, *L. sejroe* M84, *L. istrica* J20, *L. bratislava* Jež Bratislava, *L. Pomona* Šimon, *L. canicola* Hond Utrecht IV, *L. polonica* Poland, *L. sorex-jalna* Sorexjalna). Všechny kmeny byly kultivovány a pasážovány v Korthoffově médiu s králičím sérem při teplotě 28 °C (Testline, Brno, ČR). Tyto laboratorní kmeny byly dále použity při multilokusové sekvenační analýze k vytvoření referenční knihovny DNA sekvencí patogenních leptospir izolovaných na území České republiky a při praktickém provedení mikroaglutinačního testu.

Pro stanovení negativní analytické specifity rt PCR metody byly použity: *Escherichia coli* referenční kmen ATCC 11775, *Streptococcus pneumoniae* referenční kmen ATCC 49619, *Borrelia (B.) burgdorferi* (klinický izolát), CMV (klinický izolát) a *L. biflexa* kmen Patoc Patoc I.

##### 3.1.1.2 Referenční kmeny *Leptospira*, Royal Tropical Institute, Holandsko

Soubor 11 laboratorních kmenů patogenních leptospir detekovaných na území ČR byl doplněn o 230 certifikovaných laboratorních kmenů leptospir (218 patogenní, 7 nepatogenní, u 5 nebylo genomspecies určené), které byly získány ze sbírky Královského tropického institutu (Royal tropical Institute) v Holandsku. Byly použity následující laboratorní kmeny:

#### a) Genomspecies patogenních leptospir

##### Genomspecies *L. interrogans*

**Serogroup Australis:** Australis Ballico, Bratislava Jez Bratislava, Fugis LT 62-68, Jalna Jalna, Lora Lora, Muenchen München C 90; **Serogroup Autumnalis:** Autumnalis Akiyami A, Bangkinang Bangkinang I, Carlos C 3, Mooris Mores, Rachmati Rachat, Weerasinghe Weerasinghe; **Serogroup Batviae:** Bataviae Swart, Losbanos LT 101-69, Paidjan Paidjan,

Santarosa LT 21-74; **Serogroup Canicola**: Benjamini Benjamin, Bindjei Bindjei, Broomi Patane, Jonsis Jones, Kuwait 136/2/2, Portlandvere MY 1039, Schueffneri Vleermuis 90 C

**Serogroup Djasiman**: Buenos Aires Aires, Djasiman Djasiman, Gurungi Gurung, Sentot Sentot; **Serogroup Grippytyphosa**: Muelleri RM 2, Valbuzzi Valbuzzi; **Serogroup Hebdomadis**: Hebdomadis Hebdomadis, Kremastos Kremastos; **Serogroup Icterohaemorrhagiae**: Birkini Bikin, Copenhageni M 20, Gem Simon, Honghe H2, Icterohaemorrhagiae Ictero I, Icterohaemorrhagiae RGA, Lai 56601, Lai Lai, Lai type Langkawi Langkawi, Mankarso Mankarso, Nalam Naam, Smithi Smith, Lanka R 740; **Serogroup Mini**: Perameles Bandicoot 343, Szwajizak Szwajizak; **Serogroup Pomona**: Pomona Pomona; **Serogroup Pyrogenes**: Abramis Abraham, Biggis Biggs, Camlo LT 64-67, Guarataba An 7705, Manilae LT 398, Pyrogenes Salinem, Robinsoni Robinson, Zaroni Zaroni; **Serogroup Ranarum**: Evansi 267-1348; **Serogroup Sarmin**: Waskurin LT 63-68; **Serogroup Sejroe**: Geyaweera Geyaweera, Haemolytica Marsh, Hardjo type Prajitno Hardjoprajitno, Medanensis Hond HC, Recreo 380, Richardi Richardson, Roumanica LM 294, Saxkoebing Mus 24, Wolfi 3705

#### **Genomospecies *L. kirschneri***

**Serogroup Australis**: Ramisi Musa; **Serogroup Autumnalis**: Bim 1051, Bulgarica Nicolaevo, Butembo Butembo, Erinaceiauriti Erinaceus auritus 670, Lambwe Lambwe , Mujunkumi Yeszsh 237; **Serogroup Bataviae**: Djatzi HS 26; **Serogroup Canicola**: Bafani Bafani, Galtoni LT 1014, Kamituga Kamituga, Sumneri Sumner; **Serogroup Cynopteri**: Cynopteri 3522 C; **Serogroup Grippytyphosa**: Grippytyphosa type Moskva Moskva V, Grippytyphosa type Duyster Duyster, Ratnapura Wumalasena, Valderhoedeni Kipod 179; **Serogroup Icterohaemorrhagiae**: Bogvere LT 60-69, Dakota Grand River, Mwogolo Mwogolo, Ndambari Ndambari, Ndahambukuje Ndahambukuje, Sokoine RM 1; **Serogroup Hebdomadis**.: Kabura Kabura, Kambale Kambale; **Serogroup Pomona**: Kunming K 5, Mozdok 5621, Tsaratsovo B 81/7

#### **Genomospecies *L. borgpetersenii***

**Serogroup Australis**: Pina LT 932; **Serogroup Autumnalis**: Srebarna 1409/69; **Serogroup Ballum**: Arborea Arborea, BallumMus 127, Castellonis Castellon 3, Guangdong 1853, KenyaJenga; **Serogroup Celledoni**: Anhoa LT 90-68, Whitcombi Whitcomb; **Serogroup Hebdomadis**: Jules Jules, Nona Nona, Worsfoldi Worsfold,

**Serogroup Icterohaemorrhagiae:** Tonkini LT 96-98; **Serogroup Javanica:** Ceylonica Piyasena, Dehong De 10, Javanica Vedrat Batavia 46, Menoni Kerala, Poi Poi, Sofia Sofia 874, Yaan 80-27, Zhenkang L 82; **Serogroup Mini:** Mini Sari, Mini Mini; **Serogroup Pyrogenes:** Hamptoni Hampton, Kwake Julu; **Serogroup Sejroe:** Balcanica 1627 Burgas, Dikkeni Mannuthi, Hardjo type bovis JB197, Hardjo type Bovis L550, Hardjo type Bovis Sponselee, Istrica Bratislava, Nyanza Kibos, Sejroe M 84; **Serogroup Tarassovi:** Gengma M 48, Guidae RP 29, Kanana Kanana, Kisuba Kisuba, Tarassovi Perepelitsin, Tunis P 2/65, Yunxian L100

**Genomospecies *L. noguchii***

**Serogroup Australis:** Bajan Toad 60, Nicaragua 1011, Peruviana V 42, Rushan 507; **Serogroup Autumnalis:** Fortbragg Fort Bragg; **Serogroup Bataviae:** Argentinensis Peludo, Claytoni 1348 U; **Serogroup Djasiman:** Huallaga M 7; **Serogroup Louisiana:** Louisiana LSU 1945, Orleans LSU 2580; **Serogroup Panama:** Cristobali 1996 K, Panama CZ 214; **Serogroup Pomona:** Proechimys 1161 U; **Serogroup Pyrogenes:** Myocastoris LSU 1551; **Serogroup Shermani:** Carimagua 9160

**Genomospecies *L. santarosai***

**Serogroup Ballum:** Peru MW 10; **Serogroup Bataviae:** Balboa 735 U, Brasiliensis An 776, Kobbe CZ 320, RiojaMR 12; **Serogroup Cynopteri:** Tingomaria M 13; **Serogroup Djasiman:** Agogo Agogo; **Serogroup Grippytyphosa:** Canalzonae CZ 188, Huanuco M 4,

**Serogroup Hebdomadis:** Borincana HS 622, Goiano Bovino 131, Maru CZ 285, Sanmartini CT 63; **Serogroup Javanica:** Arenal MAVJ 401, Fluminense Aa 3, Vargonicas 24; **Serogroup Mini:** Beye 1537 U, Georgia LT 117, Rugarupae M 3, Tabaquite TRVL 3214; **Serogroup Pomona:** Tropica CZ 299; **Serogroup Pyrogenes:** Alexi HS 616, Princetown TRVL 112499, Varela 1019; **Serogroup Sarmin:** Weaweri CZ 390; **Serogroup Sejroe:** Caribe TRVL 61866, Gorgas 1413 U, Guaricura Bov.G., Trinidad TRVL 34056; **Serogroup Shermani:** Babudieri Shermani, Luis M 6; **Serogroup Tarrasovi:** Atchafalaya LSU 1013, Bakeri LT 79, Bravo Bravo, Chagres 193 K, Darien 637 K, Gatuni 1473 K, Navet TRVL 109873, Sulzeriae LT 82

**Genomospecies *L. inadai***

**Serogroup Canicola:** Malaya H 6; **Serogroup Manhao:** Lichuan Li 130, Lincang L14; **Serogroup Panama:** Mangus TRVL/CAREC 137774; **Serogroup Sherman:** Aguaruna MW 4; **Serogroup Tarrasovi:** Kaup LT 64-68

**Genomospecies *L. weilii***

**Serogroup Celledoni:** Celledoni Celledoni, Hainan 6712, Mengding M 6906; **Serogroup Javanica:** Coxi Cox, Mengma S 590, Mengrun A 102; **Serogroup Manhao:** Quinshui L 105; **Serogroup Mini:** Hekou H 27; **Serogroup Pyrogenes:** MenglianS 621; **Serogroup Sarmin:** Machiguenga MMD 3, Sarmin Sarmin; **Serogroup Tarrasovi:** Moden Compton 746, Langati M 39090, Topaz 94-79970/3, Vughia LT 89-68

**Genomospecies *L. alexanderi***

**Serogroup Hebdomadis:** Manzhuang A 23; **Serogroup Javanica:** Mengla A 85; **Serogroup Manhao:** Manhao 3 L 60; **Serogroup Mini:** Yunnan A 10

**Genomospecies *L. licerasiae***

**Serogroup Hurstbridge:** Varillal VAR 010<sup>T</sup>

**Genomospecies *L. fainei***

**Serogroup Hurstbridge:** Hurstbridge BUT 6<sup>T</sup>

**Genomospecies *L. terpstrae***

**Serogroup Icterohaemorrhagiae:** Hualin LT 11-33<sup>T</sup>

**Genomospecies *L. broomi***

**Serogroup Undesignated:** Undesignated 5399<sup>T</sup>

**Genomospecies *L. wolfii***

**Serogroup Undesignated:** Korta Korat-H2<sup>T</sup>

**Genomospecies *L. alstonii***

**Serogroup Ranarum:** Pinchang 80-412

## **b) Genomospecies nepatogenních a intermediárně patogenních leptospir**

### **Genomospecies *L.biflexa***

**Serogroup Andaman:** AndamanaCH 11; **Serogroup Semarang:** Patoc Patoc I

### **Genomospecies *L.meyeri***

**Serogroup Ranarum:** Ranarum ICF

### **Genomospecies *L.vanthielii***

**Serogroup Holland:** Holland Holland;

### **Genomospecies *L.kmetyi***

**Serogroup Tarrasovi:** Malaysia Bejo-Iso<sup>T</sup>

### **Genomospecies *Turneria parva***

**Serogroup Turneria:** Parva H<sup>T</sup>

### **Genomospecies *L.yanagawae***

**Serogroup Semarang:** SaoPaulo SaoPaulo

## **c) Nedefinované genomospecies leptospir:**

**Serogroup Australis:** Soterpolitana R 93; **Serogroup Icterohaemorrhagiae:** Hongchon 18 R, Yeonchon HM 3; **Serogroup Pyrogenes:** Nigeria Vom; **Serogroup Tarrasovi:** Banna A 31

### **3.1.2 Biologické materiály od pacientů se suspektní leptospirózou**

Od dubna 2010 – do dubna 2013 bylo na pracovišti Ústavu klinické mikrobiologie Lékařské Fakulty a Fakultní nemocnice Hradec Králové (ÚKM LF a FN HK) a Ústavu klinické biochemie a diagnostiky (ÚKBD) LF a FN HK vyšetřeno celkem 455 biologických materiálů, zaslaných z různých klinických pracovišť, od 295 pacientů suspektních na leptospirózu pomocí rt PCR metody detekující gen kódující povrchový lipoprotein LipL32. Z tohoto počtu bylo 202 (68,5 %) mužů a 93 (31,5 %) žen. Průměrný věk osob byl  $44,3 \pm 19,76$ , z toho u mužů činil  $43,9 \pm 19,56$ , u žen  $44,8 \pm 19,96$ . Pacient se suspektní leptospirózou splňoval následující kritéria: klinický obraz - bolest hlavy, svalů, kloubů, horečka, hepatální příznaky, renální postižení, hepatorenální insuficience, akutní



respirační distress syndrom, pneumonie, srdeční insuficience, petechie, hemoragická diatéza, aseptická meningitida, v anamnéze - pobyt anebo koupání ve vodě v přírodě, kontakt s hlodavci, práce v zemědělství, veterinární lékař.

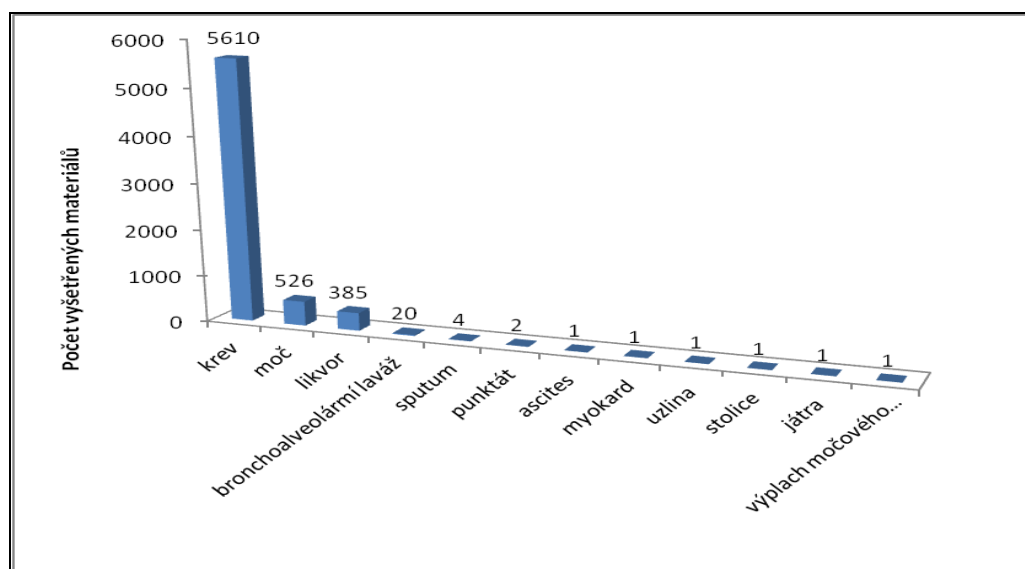
### 3.1.3 Vzorky z vnějšího prostředí

V rámci epidemiologického šetření byly odebírány také vzorky ze zevního prostředí v místech, kde byla v minulosti opakovaně prokázána leptospiróza (Královéhradecký, Pardubický kraj a část kraje Vysočina) a z oblastí postižených povodněmi v roce 2010 (Liberecký kraj).

Celkem bylo odebráno 680 vzorků vod (tekoucí, stojaté vody), nátoků na čistírny odpadních vod (ČOV) a odtoků, rovněž bylo na území Jižní Moravy odebráno 35 vzorků z rybníků a přepouštěcích kanálů, kde se hojně vyskytují hlavní přenašeči patogenních leptospir – potkani, krysy, myšovití hlodavci či bobři.

### 3.1.4 Epidemiologické šetření výskytu leptospirózy v Královéhradeckém, Pardubickém kraji a části kraje Vysočina

V epidemiologické studii zaměřené na výskyt leptospirózy na části území naší republiky (Pardubický, Královéhradecký kraj a část kraje Vysočina) bylo v letech 2002 – 2013 vyšetřeno 5840 pacientů a celkově hodnoceno 6553 biologických materiálů (viz graf 1). Z 5610 krevních vzorků bylo 4690 (83,6 %) analyzováno sérologickou metodou MAT a zbývajících 920 (16,4 %) metodou PCR. Ostatní biologické materiály zaznamenané v grafu č. 1 byly rovněž vyšetřeny metodou PCR.



**Graf 1** Počty vyšetřených biologických materiálů v letech 2002 -2013

### 3.1.5 Krevní séra

#### 3.1.5.1 Krevní séra analyzovaná soupravou ELISA classic *Leptospira* IgM/IgG

Celkem bylo vyšetřeno diagnostickým kitem ELISA classic *Leptospira* IgM/IgG (Serion, Würzburg, Německo) 1553 krevních sér, z nichž 279 (18,0 %) bylo odebráno před výjezdem a 279 (18,0 %) po návratu ze zahraničních misí. Všechna krevní séra pocházela ze sérové banky AČR. Dalších 995 (64,0 %) krevních sér bylo nově získáno od příslušníků AČR, kteří byli po návratu ze zahraniční mise ihned vyšetřeni, popř. byli krátkodobě v karanténě v Centru biologické ochrany (CBO) Těchonín. Soubor tvořilo 1507 (97,0 %) mužů a 48 (3,0 %) žen, průměrný věk u mužů byl  $35,2 \pm 6,14$  (věkové rozmezí 24 – 59), u žen  $36,9 \pm 6,76$  (věkové rozmezí 26 – 56), průměrný věk muži + ženy  $35,3 \pm 6,18$  (věkové rozmezí 24 – 59).

Současně s odběrem krevního séra byl všemi příslušníky AČR podepsán informovaný souhlas a byl vyplněn krátký dotazník týkající se možných klinických příznaků onemocnění během pobytu v zahraničí. Stejný postup byl uplatněn u krevních sér získaných z krevní banky AČR. Všechny dotazníky a informované souhlasy jsou uloženy v CBO Těchonín.

#### 3.1.5.2 Krevní séra pro stanovení diagnostické specificity a senzitivity soupravy ELISA soupravy

Do studie bylo celkem zařazeno 45 krevních sér od 45 pacientů, 30 (66,6 %) krevních sér pocházelo od mužů a 15 (33,4 %) od žen, průměrný věk analyzovaného souboru byl  $44,2 \pm 15,56$  a věkové rozmezí 19 – 82 let.

Byla analyzována krevní séra ( $n = 10$ ; 22,2 %) získaná od pacientů s laboratorně a klinicky potvrzenou leptospirozou. Další krevní séra ( $n = 10$ ; 22,2 %) byla od pacientů vyšetřených metodou MAT, u nichž byl výsledek tohoto sérologického vyšetření opakovaně negativní a nebyly u nich zjištěny žádné protilátky, u kterých bylo již dříve prokázáno, že mohou v ELISA testu způsobovat zkřížené reakce. Zbývající krevní séra ( $n = 25$ ; 55,6 %) bylo získáno od pacientů, u nichž byly sérologicky prokázány protilátky proti jiným spirochétám a infekčním agens ( $n = 10$  borélie,  $n = 5$  treponémy, a v deseti krevních sérech byly prokázány protilátky proti chlamydiím, CMV, herpes simplex viru, viru hepatitidy A, viru klíšťové encefalitidy, australskému antigenu a dva pacienti měli ještě diagnostikovanou roztroušenou sklerózu (RS) viz. tab. 18.

Všechny vzorky byly popsány, anonymizovány přidělením pořadových čísel a od pacientů byl získán informovaný souhlas.

### **3.1.5.3 Krevní séra vyšetřená mikroaglutinačním testem**

Konfirmačně byla mikroaglutinačním testem na přítomnost specifických protilátek vyšetřena krevní séra pacientů se suspektní leptospirozou, jež byla analyzována rt PCR metodou (3.1.2) a všechna krevní séra vyšetřená ELISA testem (viz. 3.1.5.1). Pro detekci protilátek byly použity živé laboratorní kmeny patogenních leptospir (viz 3.1.1.1.).

### **3.1.6 Laboratorní pomůcky a vybavení**

#### **3.1.6.1 Rt PCR**

- Lightcycler 1.5, Roche diagnostic, Stratagene, USA
- Skleněné kapiláry Light cycler capillaries – Roche, Penzberg, Německo
- Centrifuga – ABBOTT LABS 3531 Centrifuge, Excellent, North Chicago, USA
- Chladnička s mrazničkou - Electrolux ERB 34003 W8 Intuition, Stockholm, Švédsko
- Laminární box – Sterile Laminar-Flow-Box Herasafe; Heraeus-Christ, Hanau, Německo
- Elektromagnetické míchadlo - S46720 Barnstead/Thermolyne corporation, Dubuque, USA
- Digitální váha – FA2000 A&D Instruments, Frankfurt/Main, Německo
- Osobní počítač - Hewlett Hewlett packard, Palo Alto, USA
- Automatické mikropipety - Finnpiquette, Helsinky, Finsko
- Zkumavky typu Eppendorf – Eppendorf, Říčany u Prahy, Česká republika
- Laboratorní sklo a pomůcky

#### **3.1.6.2 MLST**

- Cyklér 2720 Thermal Cycler – Life Technologies, Carlsbad, USA
- Elektroforetická vana – Owl D2 Wide Gel System, Thermo Scientific Owl Separation Systems, Waltham, USA
- Zdroj napětí pro elektroforézu – Mini Pro 300V Power Supply, Major Science, Saratoga, USA
- UV transiluminátor – TVC-312A/F, Spectronics corp., New York, USA
- Sekvenátor 3130 - Life technologies , Carlsbad, USA
- Centrifuga – ABBOTT LABS 3531 Centrifuge, Excellent, North Chicago, USA
- Chladnička s mrazničkou – Electrolux ERB 34003 W8 Intuition, Stockholm, Švédsko
- Laminární box – typ Sterile Laminar-Flow-Box Herasafe; Heraeus-Christ, Hanau, Německo

- Elektromagnetické míchadlo – S46720 Barnstead/Thermolyne corporation, Dubuque, USA
- Digitální váha - FA2000 A&D Instruments, Frankfurt/Main, Německo
- Osobní počítač – Hewlett packard, Palo Alto, USA
- Automatické mikropipety pro různé objemy - Finnpiquette, Helsinky, Finsko
- Zkumavky typu Eppendorf - Eppendorf, Říčany u Prahy, Česká republika
- Laboratorní sklo a pomůcky

### **3.1.6.3 Serion ELISA classic *Leptospira* IgM/IgG**

- kit SERION ELISA *classic Leptospira* IgM/IgG leptospira- Serion GmbH, Würzburg, Německo
- Mikropipety a špičky na mikropipety - Finnpiquette, Helsinky, Finsko
- Reader na ELISA destičky MRX 3200 - Dynatech Laboratories, Houston, USA
- Vlhká komůrka
- Vodní lázeň EL 20 R, Lab – Met, Brno, ČR
- Termostat nastavený na 37 °C - Biological thermostat, Laboratorní přístroje, Praha, ČR
- Chladnička s mrazničkou - Electrolux ERB 34003 W8 Intuition, Stockholm, Švédsko
- Drobné laboratorní sklo

### **3.1.6.4 MAT**

- Laminární box – MSC Advantage – biohazard – Thermo Scientific, Trigon, Říčany u Prahy, ČR
- Zástinový mikroskop - Darkfield Microscope B-500TDK, Optika Microscopes, Ponteranica, Itálie
- Termostat nastavený na 37°C - Biological thermostat, Laboratorní přístroje, Praha, ČR
- Vodní lázeň - EL 20 R, Lab – Met, Brno, ČR
- Poloautomatická osmikanálová mikropipeta – Finnpiquette, Helsinky, Finsko
- Plastikové panely na předředění krevních sér
- Sterilní pipety, kahan, gumový balonek
- Mikrotitrační destička
- Podložní sklíčka

## **3.1.7 Použité chemikálie**

### **3.1.7.1 Rt PCR**

#### **Izolace DNA**

*QIAamp® DNA Mini Kit (250)* (Qiagen, Roche, Penzberg, Německo):

- izolační kolonky (750 ks)
- sběrné tuby (750 ks)
- AL pufr (54 ml)
- ATL pufr (50 ml)
- AW1 pufr koncentrát (95 ml)
- AW2 pufr koncentrát (66 ml)
- AE pufr (110 ml)
- QIAGEN proteináza K (6 ml)

#### **PCR směs**

*LightCycler FastStart DNA Master SybrGreen I* (Roche, Penzberg, Německo):

- PCR - grade H<sub>2</sub>O
- 10 x LC FastStart DNA Master SYBRGreen I (1a+1b)
- LC FastStart Enzyme (1a) – „Faststart“ Taq DNA polymeráza
- LC FastStart Reaction Mix SYBRGreen I, 10× conc.(1b) - reakční pufr, směs dNTP (dUTP místo dTTP), SybrGreenI, 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- Zásobní roztok MgCl<sub>2</sub>(25 mM)

#### **Primery**

- Zásobní roztok primeru LipL32-270F (10 pmol/μl), Generi-Biotech, s.r.o., Hradec Králové, ČR
- Zásobní roztok primeru LipL32-692R(10 pmol/μl), Generi-Biotech, s.r.o., Hradec Králové, ČR

### **3.1.7.2 Multilokusová sekvenační typizace**

#### **Izolace DNA**

– Viz kapitola 3.1.7.1

#### **PCR směs**

- PCR - grade H<sub>2</sub>O - Roche, Penzberg, Německo
- Pufr TAKARA 10 x (10 mM Tris - HCl, 50 mM KCl, pH 8,3), TAKARA Bio Inc., Japonsko
- Směs dNTP (2,5 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP), TAKARA Bio Inc., Japonsko

- HS TAKARA polymeráza (5 U/μl), TAKARA Bio Inc., Japonsko
- Zásobní roztok MgCl<sub>2</sub> (25 mM) - Roche, Penzberg, Německo
- Zásobní roztok primeru *lipl32-F*, *adk* – F, *icdA* – F, *lipL41* - F, *rrs2* – F (10 pmol/μl), Generi-Biotech, s.r.o., Hradec Králové, ČR
- Zásobní roztok primeru *lipl32-R*, *adk* – R, *icdA*- R, *lipL41* - R, *rrs2* – R (10 pmol/μl), Generi-Biotech, s.r.o., Hradec Králové, ČR

### **Elektroforéza**

- Destilovaná voda – připravena v destilačním přístroji typ I-DPE 10 Simax, Praha, ČR
- Agaróza – firma Serva electrophoresis, Heidelberg, Německo
- PCR ethidium bromid – Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
- PCR vkládací pufr - Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
- Markery molekulové hmotnosti MXIII - Roche, Penzberg, Německo

### **Přečištění produktů PCR amplifikace**

*InnuPREP PCRpure Kit* (Analytik Jena, Jena, Německo):

- Vazný pufr (250 ml)
- Eluční pufr (30 ml)
- Kolonky – 250 ks.
- Sběrné tuby – 250 ks.
- Eluční tuby – 250 ks

### **Sekvenace**

*BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biotechnologies, Foster City, USA):

#### **1) Připravený reakční mix DNA terminátorů**

- A V3 Dye 2 verze v3.1 – zelená barva
- C V3 Dye 4 verze v3.1 – červená barva
- G V3 Dye 1 verze v3.1 – modrá barva
- T V3 Dye 3 verze v3.1 – žlutá barva
- dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dUTP)
- AmpliTaq DNA Polymeráza, FS
- MgCl<sub>2</sub>
- Tris-HCl buffer, pH 9.0

2) pGEM®-3Zf(+) dvouvláknový templát kontrolní DNA – koncentrace 0.2 μg/μL

3) – 21 M13 Control Primer (F) – koncentrace 0.8 pmol/μL

### **Přečištění produktů sekvenačních reakcí**

*InnuPREP DYEpure Kit* (Analytik Jena, Jena, Německo):

- Pufr odstraňující nenavázané Dye terminátory (125 ml)
- PCR grade H<sub>2</sub>O (10 ml)
- Kolonky – 250 ks
- Sběrné tuby- 250 ks
- Eluční tuby – 250 ks

### **3.1.7.3 Serion ELISA classic IgM/IgG**

*SERION ELISA classic Leptospira IgM/IgG* (Serion -GmbH, Würzburg, Německo):

- Standardní sérum (2x2 ml)
- Negativní kontrolní sérum (2 ml)
- Anti-human- IgG, IgA, IgM konjugát (13 ml)
- Promývací roztok koncentrát (33,3 ml)
- Ředící pufr (2 x 50 ml)
- Zastavovací roztok 1,2 M NaOH (15 ml)
- Substrát p- nitrofenylfosfát (13 ml)
- Certifikát kvality se standardní křivkou a vyhodnocovací tabulkou

### **3.1.7.4 MAT**

#### **Kultivační medium**

- Korthoffovo médium - TestLine, Brno, ČR

#### **Pufr**

- Fosfátový pufr (PBS) - Nemocniční lékárna Fakultní nemocnice Hradec Králové, Hradec Králové, ČR

## **3.2 METODY**

### **3.2.1 Rt PCR pro detekci genu kódující lipoprotein LipL32**

#### **3.2.1.1 Princip metody**

Pro detekci DNA patogenních leptospir byla použita metoda rt PCR, v jejímž průběhu byly využity primery z oblasti genu *lipL32*, jenž kóduje příslušný povrchový lipoprotein LipL32. PCR amplifikace byla realizována na přístroji LightCycler 1.5. K detekci vznikající fluorescenčního záření bylo pro samotné provedení rt PCR použito fluorescenční interkalační barvivo SYBRGreen I, které se nespecificky váže na veškerou

vznikající dvouvláknovou DNA. Identifikace DNA patogenních leptospir byla realizována využitím analýzy teploty tání a on-line záznamu fluorescence při vlnové délce  $\lambda = 530$  nm na fluorescenčním kanálu F1.

Aby bylo zabráněno vzniku falešně negativních výsledků vyšetření, byla do každého experimentu integrována kontrola inhibice DNA polymerázy, jež byla nejprve realizována ve vedlejší reakci amplifikací lidského beta globinového genu metodou PCR s následnou elektroforetickou detekcí. Při modifikaci metody byla detekce inhibice DNA polymerázy následně uskutečněna v jedné reakci v rámci provedení rt PCR analýzy.

### **3.2.1.2 Vyšetřovaný materiál, doporučená množství biologického materiálu, podmínky transportu a uchování biologických materiálů**

Během prvního týdne klinických příznaků byla PCR detekce prováděna v krevní plazmě (množství 2 – 5 ml) popř. v likvoru (množství minimálně 1 ml), v druhém týdnu je doporučeným materiálem moč (množství 10 – 15 ml). Z dalších biologických materiálů byly vyšetřeny podle možností bronchoalveolární laváž, sputum, vzorky tkáně či výplach z močového měchýře.

Biologický materiál určený pro detekci DNA patogenních leptospir by měl být do příslušné laboratoře transportován při 4 °C nejlépe do 12 h od odběru, maximálně do 48 h a musí být zpracovat do 48 h, nejlépe však do 24 h po odběru.

### **3.2.1.3 Pracovní protokol pro přípravu vzorků**

#### **a) Moč**

Moč je nutno zpracovat do 48 h po odběru – nejlépe do 24 h a uchovávat v chladničce při 4 °C.

1. Množství 10 – 15 ml moče bylo centrifugováno 10 min při 2 500 otáčkách za min (rpm), supernatant byl odsát tak, aby zůstalo ve zkumavce přibližně 1,4 ml moče.
2. Přibližně 1,4 ml moče bylo napipetováno do zkumavky o objemu 1,5 ml a centrifugováno 10 min při 13 000 rpm; supernatant byl poté odsát.
3. K peletě bylo připipetováno 180  $\mu$ l ATL pufru a 20  $\mu$ l QIAGEN proteinázy K, vše bylo důkladně promícháno pomocí vortexu.
4. Inkubace byla realizována minimálně 3 h, nebo lépe přes noc, při 56 °C.
5. Po uplynutí inkubační doby bylo připipetováno 200  $\mu$ l AL pufru, vše bylo promícháno na vortexu po dobu 15 s.



6. Poté byla uskutečněna inkubace v délce 10 min, při teplotě 70 °C, po skončení inkubace byla směs krátce odstředěna v centrifuze.
  7. Bylo připipetováno 200 µl 96% etanolu, vše bylo důkladně promícháno pomocí vortexu v pulsech 15 s a krátce přitočeno v centrifuze.
  8. Mix z kroku 7 byl přelit do kolony se sběrnou tubou.
  9. Centrifugace byla provedena po dobu 1 min při 8 000 rpm. Kolona byla umístěna na novou sběrnou tubu – použitá sběrná tuba byla odstraněna.
  10. Do kolony bylo připipetováno 500 µl AW1 pufru, poté byla uskutečněna centrifugace 1 min při 8 000 rpm; kolona byla umístěna na novou sběrnou tubu, použitá sběrná tuba byla odstraněna.
  11. Do kolony bylo připipetováno 500 µl AW2 pufru, vše bylo centrifugováno 3 min při 13 000 rpm, sběrná tuba byla odstraněna.
  12. Kolona byla nasazena na zkumavku o objemu 1,5 ml a bylo připipetováno 200 µl AE pufru nebo sterilní vody.
  13. Vše bylo inkubováno 5 min při laboratorní teplotě a centrifugováno 1 min při 8 000 rpm.
  14. DNA byla uchovávána v chladu do samotného provedení PCR metody.
- Pro dlouhodobé skladování byly vzorky DNA uchovávány při teplotě –20 °C.

## **b) Plazma, Likvor**

Vzorky krevní plazmy a likvoru bylo nutné zpracovat do 48 h po odběru a uchovávat v chladu.

1. 0,5 - 1,5 ml plazmy nebo likvoru bylo centrifugováno 15 min při 13 000 rpm v chlazené centrifuze.
2. Vzniklá peleta byla minimálně 1× promyta 200 µl sterilní vody.
3. Opět byla provedena centrifugace v délce 8 min při 13 000 rpm, nejlépe při 4 °C; supernatant byl odstraněn.
4. K peletě bylo připipetováno 180 µl ATL pufru a 20 µl QIAGEN proteinázy K, směs byla promíchána pomocí vortexu.
5. Inkubace byla uskutečněna v délce minimálně 3 h nebo přes noc při 56 °C.
6. Bylo připipetováno 200 µl AL pufru, vše bylo důkladně promícháno pomocí vortexu po dobu 15 s.

7. Následovala inkubace 10 min při 70 °C, po skončení byla směs krátce odstředěna v centrifuze.
8. Dále bylo připipetováno 200 µl 96% etanolu, vše bylo promícháno na vortexu v pulsech 15 s a krátce odstředěno v centrifuze.
9. Mix z kroku 8 byl přelit na kolonu se sběrnou tubou.
10. Byla provedena centrifugace po dobu 1 min při 8 000 rpm. Kolona byla umístěna na novou sběrnou tubu, použitá sběrná tuba byla odstraněna.
11. Dále bylo na kolonu připipetováno 500 µl AW1, vše bylo centrifugováno 1 min při 8 000 otáčkách, kolona byla umístěna na novou sběrnou tubu, použitá sběrná tuba byla odstraněna.
12. Na kolonu bylo připipetováno 500 µl AW2, byla provedena centrifugace 3 min při 13 000 rpm, sběrná tuba byla odstraněna.
13. Kolona byla nasazena na zkumavku o objemu 1,5 ml a bylo připipetováno 200 µl AE nebo sterilní vody.
14. Inkubace byla realizována po dobu 5 min při laboratorní teplotě a centrifugace 1 min při 8 000 rpm.
15. Vyizolovaná DNA byla uchovávána v chladu do samotného provedení PCR amplifikace.

Pro dlouhodobé skladování byly vyizolované vzorky DNA uchovávány při teplotě -20 °C.

### **c) Tkáňový protokol**

1. Množství 1 až 1,5 ml biologického materiálu bylo odstředěno 10 min při 13 000 rpm.
2. Supernatant byl odsát a k 30 – 50 µl sedimentu bylo připipetováno 180 µl ATL pufru.
3. Dále bylo připipetováno 20 µl QIAGEN proteinázy K, vše bylo důkladně promícháno na vortexu.
4. Inkubace byla realizována po dobu 3 h, popř. přes noc při 56 °C, v průběhu inkubace byla směs příležitostně promíchána, po skončení inkubace krátce odstředěna v centrifuze.
5. Dále bylo připipetováno 200 µl AL pufru, vše bylo promícháno vortexem v pulsech 15 s.
6. Byla uskutečněna inkubace po dobu 10 min při 70 °C, po skončení inkubace bylo vše krátce odstředěno v centrifuze.

7. Dále bylo připipetováno 200 µl 96% etanolu, směs byla promíchána na vortexu v pulsech 15 s a krátce odstředěna v centrifuze.
8. Mix z kroku 6 byl přelit na kolonu se sběrnou tubou.
9. Byla provedena centrifugace po dobu 1 min při 8 000 rpm. Kolona byla umístěna na novou sběrnou tubu, použitá sběrná tuba byla odstraněna.
10. Na kolonu bylo připipetováno 500 µl AW1 pufru, byla uskutečněna centrifugace 1 min při 8 000 rpm, kolona byla umístěna na novou sběrnou tubu, použitá sběrná tuba byla odstraněna.
11. Na kolonu bylo připipetováno 500 µl AW2 pufru, centrifugace 3 min při 13 000 rpm, sběrná tuba byla odstraněna.
12. Kolona byla nasazena na zkumavku o objemu 1,5 ml a bylo připipetováno 200 µl AE pufru.
13. Inkubace byla uskutečněna po dobu 5 min při laboratorní teplotě, následně byla provedena centrifugace 1 min při 8 000 rpm.
14. Pro dlouhodobé skladování vzorků byla vyizolovaná DNA uchovávána při teplotě – 20°C.

#### **3.2.1.4 Izolace DNA**

Izolace DNA patogenních leptospir v moči, séru a likvoru byla provedena pomocí komerčního kitu QIAamp® DNA Mini Kit (250) (Qiagen, Roche, Penzberg, Německo). Před izolací DNA byl úpraven biologický materiál, aby se zvýšil detekční limit na 1 – 5 kopií genomu/ml tekutého biologického materiálu.

#### **3.2.1.5 Amplifikace genu kódujícího povrchový lipoprotein LipL32 metodou rt PCR**

##### **a) Rt metoda bez zavedení vnitřní kontroly v jedné reakci**

Pro detekci DNA patogenních leptospir byla použita metoda rt PCR (formát SYBREGreen) dle metodiky autorů Levett a kol. (2005) [138]. Specifické primery byly vybrány z oblasti genu *lipL32* a amplifikace byla uskutečněna na přístroji LightCycler 1.5. Do každého experimentu byla integrována kontrola inhibice DNA polymerázy, jež byla uskutečněna ve vedlejší reakci amplifikací lidského beta globinového genu metodou PCR s následnou elektroforetickou detekcí

##### **Sekvence použitých primerů:**

LipL32-270F (25 bp) 5'CGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATT3'

LipL32-692R (26 bp) 5'CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTT3'

**Tab. 3** Rozpis amplifikačních směsí („master mixu“):

<b>6 µl směsi + 14 µl templátové DNA</b> (pozitivní kontroly nebo vody)		1 vzorek
voda		<b>0,4 µl</b>
LC FastStart DNA Master SYBR Green I (1a+1b)(10×)	1×	<b>2,0 µl</b>
Mg <sup>2+</sup> (25 mmol/l)	3 mmol/l	<b>2,4 µl</b>
primerLipL32-270F (10 pmol/µl)	0,3 µmol/l	<b>0,6 µl</b>
primerLipL32-692R (10 pmol/µl)	0,3 µmol/l	<b>0,6 µl</b>

#### **Alikvotace**

Nejprve byla rozmrazena při laboratorní teplotě 1 zkumavka LC FastStart Reaction Mix SYBRGreen I, 10× conc. 1b, a poté bylo 18 µl rozplněno do tří zkumavek. Dvě zkumavky byly uloženy při teplotě – 20 °C a třetí byla použita pro přípravu mixu 1a+1b. Kompletní rozpis reagensů a jejich množství použitých při provedení rt PCR analýzy je uveden v tab. 3.

Mix 1a+1b byl připraven přidáním LC FastStart Enzyme 1a k LC FastStart Reaction Mix SYBRGreen I, 10× conc. 1b v takovém množství, které bylo potřebné pro přípravu PCR směsi dle následující tab. 4:

**Tab. 4** Příprava mixu 1a + 1b

<b>počet vzorků</b>	<b>LC FastStart Enzyme 1a</b>	<b>LC FastStart Reaction Mix SYBR Green I, 10× conc. 1b</b>	<b>celkem mixu 1a+1b</b>
1	0,31 µl	1,69 µl	2 µl
3	0,93 µl	5,07 µl	6 µl
5	1,55 µl	8,45 µl	10 µl
6	1,86 µl	10,14 µl	12 µl
7	2,17 µl	11,83 µl	14 µl
8	2,48 µl	13,52 µl	16 µl
9	2,79 µl	15,21 µl	18 µl
10	3,10 µl	16,90 µl	20 µl
12	3,72 µl	20,28 µl	24 µl

## Zvolený teplotní profil:

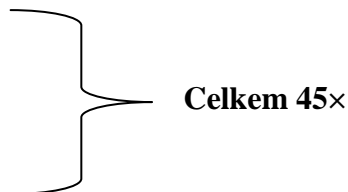
### 1. amplifikace

a) počáteční denaturace: 95 °C 10 min

b) denaturace: 95 °C 10 s

c) annealing: 67 °C 10 s

d) extenze: 72 °C 20 s



### 2. analýza teploty tání

95 °C 0 s; 65 °C 15 s; 95 °C 0 s s nastavením vzestupu teploty (Temperature Transition Rate) na 0,1 °C/s a s kontinuálním sběrem dat

40°C 20 s, teplotní rozsah analýzy teploty tání 65 – 95 °C

### b) rt PCR metoda s inhibiční kontrolou v jedné reakci

Pro detekci DNA patogenních leptospir byla použita metoda rt PCR (formát SYBREGreen). Specifické primery byly vybrány z oblasti genu *lipL32* a samotná amplifikace probíhala na přístroji LightCycler 1.5. Kontrola inhibice (IC z angl. Inhibition control) DNA polymerázy byla integrována do jedné reakce. Kompletní rozpis reagentů a jejich množství je uveden v tab. 5.

### Sekvence použitých primerů

**LipL32-270F (25 bp)** 5'CGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATT3'

**LipL32-692R (26 bp)** 5'CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTT3'

Pracovní koncentrace primerů pro IC 838 (0,02 μmol/l) byla naředěna na koncentraci primerů (10 pmol/ μl), tato koncentrace byla dále naředěna 2,5× na výslednou koncentraci 4 pmol/μl.

**Tab. 5** Rozpis amplifikačních směsí s IC („master mixu“)

6 $\mu$ l směsi + 0,2 $\mu$ l IC + 14 $\mu$ l templátové DNA (pozitivní kontroly nebo vody)		1 vzorek
<b>voda</b>		<b>0,2 <math>\mu</math>l</b>
<b>LC FastStart DNA Master SYBRGreen I (1a+1b) (10<math>\times</math>)</b>	1 $\times$	<b>2,0 <math>\mu</math>l</b>
<b>Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/l)</b>	3 mmol/l	<b>2,4 <math>\mu</math>l</b>
primer <b>Lepto F</b> (10 pmol/ $\mu$ l)	0,3 $\mu$ mol/l	<b>0,6 <math>\mu</math>l</b>
primer <b>Lepto R</b> (10 pmol/ $\mu$ l)	0,3 $\mu$ mol/l	<b>0,6 <math>\mu</math>l</b>
Primer IC-838 –1 ( <b>4 pmol/<math>\mu</math>l</b> )	0,02 $\mu$ mol/ l	<b>0,1 <math>\mu</math>l</b>
Primer IC-838 –2 ( <b>4 pmol/<math>\mu</math>l</b> )	0,02 $\mu$ mol/ l	<b>0,1 <math>\mu</math>l</b>

Pracovní koncentrace primerů pro IC 838 (0,02  $\mu$ mol/l) byla naředěna na koncentraci primerů (10 pmol/  $\mu$ l), tato koncentrace byla dále naředěna 2,5 $\times$  na výslednou koncentraci 4 pmol/ $\mu$ l.

#### **Alikvotace**

Dále byla rozmrazena při laboratorní teplotě 1 zkumavka LC FastStart Reaction Mix SYBRGreen I, 10 $\times$  conc. 1b, a poté bylo rozplněno 18  $\mu$ l do tří zkumavek. Dvě zkumavky byly zamrazeny a třetí byla použita pro přípravu mixu 1a+1b.

Mix 1a+1b byl připraven přidáním LC FastStart Enzyme 1a k LC FastStart Reaction Mix SYBRGreen I, 10 $\times$  conc. 1b v takovém množství, které bylo potřebné pro připravovanou PCR směs dle tab. 4 zmíněné výše.

Samotná amplifikace byla uskutečněna v termocykléru LightCycler 1.5 určeném pro rt PCR.

#### **Zvolený teplotní profil:**

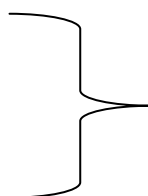
##### **1. amplifikace**

a) Počáteční denaturace: 95 °C      10 min

b) denaturace: 95 °C 10 s

c) annaeling: 67 °C 10 s

d) extenze: 72 °C 20 s



**Celkem 45 $\times$**

## 2. analýza teploty tání

95 °C 0 s; 65 °C 15 s; 95 °C 0 s s nastavením Temperature Transition Rate na 0,1 °C/s a s kontinuálním sběrem dat

40 °C 20 s, rozmezí teplot 65 – 95 °C

### 3.2.1.6 Detekce

Fluorescence byla zaznamenána na konci každého amplifikačního cyklu při reakční teplotě 72 °C. Intenzita fluorescence byla detekována při vlnové délce  $\lambda = 530$  nm s on-line záznamem na počítači. Nejprve bylo nutné provést analýzu teploty tání. Standardizace odečtu byla zajištěna navolením parametru Noise Band na 2. čárku nad 0,1.

### 3.2.1.7 Optimalizace rt PCR metody

#### Koncentrace $Mg^{2+}$ iontů

Jako počáteční poměr reakční směsi (MM z angl. Master mix): templátová DNA byl zvolen 18  $\mu$ l: 2  $\mu$ l, jenž byl následně použit pro optimalizaci koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů. Byly zvoleny následující koncentrace 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3mM, 2,5 mM, 2 mM a 1,5 mM. Podrobný postup je popsán v tab. 6.

**Tab. 6** Optimalizace koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů - příprava master mixu (V = 18  $\mu$ l)

Koncentrace $Mg^{2+}$ iontů	6 mM	5 mM	4 mM	3 mM	2,5 mM	2 mM	1,5 mM
LC FastStart SybrGreen	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
$Mg^{2+}$ (25 mM)	4,8 $\mu$ l	4 $\mu$ l	3,2 $\mu$ l	2,4 $\mu$ l	2 $\mu$ l	1,6 $\mu$ l	1,2 $\mu$ l
F primer (0,3 $\mu$ M)	0,6 $\mu$ l	0,6 $\mu$ l	0,6 $\mu$ l	0,6 $\mu$ l	0,6 $\mu$ l	0,6 $\mu$ l	0,6 $\mu$ l
R primer (0,9 $\mu$ M)	1,8 $\mu$ l	1,8 $\mu$ l	1,8 $\mu$ l	1,8 $\mu$ l	1,8 $\mu$ l	1,8 $\mu$ l	1,8 $\mu$ l
PCR voda	8,8 $\mu$ l	9,6 $\mu$ l	10,4 $\mu$ l	11,2 $\mu$ l	11,6 $\mu$ l	12,0 $\mu$ l	12,4 $\mu$ l
<b>Celkem MM</b>	<b>18 <math>\mu</math>l</b>	<b>18 <math>\mu</math>l</b>	<b>18 <math>\mu</math>l</b>	<b>18 <math>\mu</math>l</b>	<b>18 <math>\mu</math>l</b>	<b>18 <math>\mu</math>l</b>	<b>18 <math>\mu</math>l</b>

#### Koncentrace primerů

Pro optimalizaci byly použity následné koncentrace primerů: F 0,3  $\mu$ M : R 0,9  $\mu$ M, F 0,3  $\mu$ M : 0,3  $\mu$ M a F 0,9  $\mu$ M : R 0,9  $\mu$ M (viz tab. 7)

**Tab. 7** Optimalizace koncentrací primerů

Koncentrace primerů	F 0,3 $\mu$ M: R 0,9 $\mu$ M	F 0,3 $\mu$ M: 0,3 $\mu$ M	F 0,9 $\mu$ M: R 0,9 $\mu$ M
LC FastStart SybrGreen 10 $\times$	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
Mg <sup>2+</sup> (25 mM)	2,4 $\mu$ l	2,4 $\mu$ l	2,4 $\mu$ l
F primer	0,6 $\mu$ l	0,6 $\mu$ l	1,8 $\mu$ l
R primer	1,8 $\mu$ l	0,6 $\mu$ l	1,8 $\mu$ l
PCR voda	11,2 $\mu$ l	12,4 $\mu$ l	10 $\mu$ l
<b>Celkem MM</b>	<b>18 <math>\mu</math>l</b>	<b>18 <math>\mu</math>l</b>	<b>18 <math>\mu</math>l</b>

**Poměr Master Mix: množství templátové DNA**

Pro optimalizaci rt PCR metody byly použity následující poměry MM: množství templátové DNA : 18 : 2, 15: 5, 10 : 10 a 6 : 14 ( viz tab. 8)

**Tab. 8** Optimalizace poměru MM : množství templátové DNA

Poměr MM : DNA	18 : 2	15: 5	10 : 10	6: 14
LC FastStart SybrGreen 10 $\times$	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
Mg <sup>2+</sup> (25 mM)	2,4 $\mu$ l	2,4 $\mu$ l	2,4 $\mu$ l	2,4 $\mu$ l
F primer (0,3 $\mu$ M)	0,6 $\mu$ l	0,6 $\mu$ l	0,6 $\mu$ l	0,6 $\mu$ l
R primer (0,3 $\mu$ M)	0,6 $\mu$ l	0,6 $\mu$ l	0,6 $\mu$ l	0,6 $\mu$ l
PCR voda	12,4 $\mu$ l	9,4 $\mu$ l	4,4 $\mu$ l	0,4 $\mu$ l
<b>Celkem MM</b>	<b>18,0 <math>\mu</math>l</b>	<b>15 <math>\mu</math>l</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>	<b>6 <math>\mu</math>l</b>

**Volba inhibiční kontroly**

Pro provedení rt PCR metody detekce genu pro LipL32 a IC v jedné reakci, byly použity následující inhibiční kontroly: IC 309, HLADQ, IC 487 a IC 838.

**Množství inhibiční kontroly**

Byla provedena optimalizace množství IC použitím následujících objemů v reakci: 1  $\mu$ l, 0,5  $\mu$ l, 0,4  $\mu$ l a 0,2  $\mu$ l, dle výsledků rt PCR reakce bylo vyhodnoceno její optimální množství.



### **Koncentrace primerů inhibiční kontroly**

Pro optimalizaci koncentrace primerů IC byly použity následující hodnoty 0,1 mM, 0,05 mM, 0,025 mM a 0,01 mM.

#### **3.2.1.8 Stanovení analytických parametrů metody rt PCR Detekční práh**

Pro otestování meze detekce nově zavedené rt PCR byla připravena ředící řada pro patogenní kmen *L. icterohaemorrhagiae* Copenhageni Lebe, která obsahovala následující ředění:  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $10^2$ , 10, 5, 2, až 1 kopie DNA patogenních leptospir v 1 ml tekutého biologického materiálu. Pro všechna ředění laboratorního kmene byla duplicitně provedena rt PCR.

#### **Ředění laboratorního kmene leptospir:**

- 1) Do 12 zkumavek byl rozplněn pufrovaný fyziologický roztok v množství 9 ml.
- 2) Do první zkumavky bylo nakapáno několik kapek kultury laboratorního kmene leptospir kultivovaného při 28 °C po dobu tří týdnů v tekutém Korthoffově médiu, obsah zkumavky byl promíchán skleněnou pipetou za použití gumového balonku.
- 3) Leptospiry byly naředěny titrací (přenášením 1 ml).
- 4) Počítání leptospir bylo opakovaně (5×) provedeno v temném poli mikroskopu vždy v 5μl fyziologickém roztoku při celkovém zvětšení 100 – 200×.
- 5) Počet bakterií zjištěný v celém zorném poli s 5μl fyziologického roztoku byl vynásoben 200× a tím získán přibližný počet v 1 ml.
- 6) Počítání bakteriálních buněk bylo prováděno nejdříve ve zkumavce s nejvyšším ředěním.
- 7) Počty leptospir ve zkumavkách s nižším ředěním větší hustotou leptospir, kde nelze bakterie již počítat, byly dopočítány podle titrace (tj. vždy o řád vyšší).

## **Stanovení specifacity metody**

Specifacita primerů byla ověřena pomocí programu Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), jenž je dostupný na internetové adrese <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>. Reálná analytická pozitivní specifacita a negativita byla dále ověřena provedením rt PCR s 11 laboratorními kmeny patogenních leptospir (viz kapitola 3.1.1.1). Experimentálně byla ověřena rovněž analytická negativní specifacita se závěrem, že metoda nedetekuje podobné druhy mikroorganismů a nepatogenní leptospiry.

## **Reprodukovatelnost a mezilehlá přesnost**

Pro stanovení reprodukovatelnosti metody bylo provedeno 8 měření vzorku na 3 úrovních (1000 kopií genomu/ml, 10 kopií genomu/ml a směsná kontrola - 1000 kopií genomu/ml + 10 kopií genomu/ml). Výpočet průměru, směrodatné odchylky a variačního koeficientu (CV) byl proveden ze získaných Cycle of threshold hodnot (Ct).

Pro stanovení mezilehlé přesnosti metody bylo provedeno deset po sobě jdoucích měření směsné pozitivní kontroly. Výpočet průměru, směrodatné odchylky a CV byl opět realizován ze získaných Ct hodnot.

### **3.2.1.9 Kontrola kvality**

#### **Interní kontrola kvality**

Aby byl výsledek detekce rt PCR validní, byla do reakce zařazena pozitivní a negativní kontrola a IC.

#### **Pozitivní kontrola**

Pozitivní kontrola umožní kontrolovat řádný průběh amplifikační reakce (citlivost reakce), nezaručuje však správnost izolace.

#### **Negativní kontrola**

Negativní kontrola umožní zjistit, zda nedošlo ke kontaminaci templátu či amplifikační směsi PCR produktem. V případě většího počtu vzorků je vhodné použít dvě až tři negativní kontroly.

## **Inhibiční kontrola**

IC umožňuje odhalit, zda nedošlo k inhibici PCR (resp. DNA polymerázy), tj. zabraňuje vzniku falešně negativních výsledků. Kontrola inhibice DNA polymerázy byla nejprve zajišťována ve vedlejší reakci amplifikací lidského beta globinového genu metodou PCR s následnou elektroforetickou detekcí., poté byla integrována do jedné reakce při praktickém provedení rt PCR detekce.

### **3.2.1.10 Metodika pro zpracování vzorků ze zevního prostředí**

Při odběru vzorků ze zevního prostředí bylo celkem odebíráno  $5 \times 200$  ml z jednoho místa, vždy s odstupem cca 2 - 3 minut. Pokud to bylo možné, byly rovněž odebrány vzorky bahna z okrajů toku nebo nádrže do vzdálenosti jednoho metru v objemu 10 - 20 ml.

Kontrolní vzorky byly vytvořeny z různých vodních zdrojů a zeminy smíchané s vodou. Následně byly arteficiálně inokulovány dvěma laboratorními patogenními kmeny leptospir *L. copenhageni* Lebe a *L. grippotyphosa* P125 ve dvou koncentracích  $10^5$  CFU/ml a  $10^2$  CFU/ml. Uměle připravené vzorky vody byly nejprve přefiltrovány přes gázu, následně přes hrubý filtr a nakonec přes mikrofiltr. Vzorky získané přefiltrováním přes gázu – filtrace gáza (FG), supernatantu získaného volnou sedimentací filtrátu FG, filtrátu FG naředěného destilovanou vodou v poměru 1:1, eluátů z hrubého filtru, eluátů z mikrofiltru a filtrátu FG zamraženého při  $-70$  °C po dobu týdne byly rt PCR metodou analyzovány. Všechny vzorky byly před analýzou důkladně promíchány pomocí vortexu.

Všechny výše zmíněné materiály byly vyhodnoceny a způsob úpravy, u něhož bylo dosaženo nejvyšší výtěžnosti reakce (nejvyšší citlivost PCR detekce), byl použit pro následné zpracování vzorků povrchových vod a vzorků vlhkých substrátů.

Po odzkoušení rt PCR metody detekující gen pro LipL32 na arteficiálně připravených vzorcích ze zevního prostředí, byly zamražené vzorky určené k analýze postupně rozmrazeny, vzorky vod ze zevního prostředí byly nejprve přefiltrovány přes gázu, abychom odstranili hrubé částice, byla izolována DNA a duplicitně provedena rt PCR reakce.

Na základě výsledků rt analýzy pro arteficiálně inokulované vzorky vod patogenními leptospirami byla použita filtrace pouze přes hrubý filtr (viz tab. 11 v části výsledky).

Vzorky bahna byly nejprve naředěny destilovanou vodou, aby mohly být filtrovány přes hrubý filtr, filtrát byl odstředěn při 2000 rpm po dobu 10 min.

Vzorky vody získané přefiltrováním přes gázu FG a hrubé filtry byly zamrazeny a uchovávány do dalšího zpracování při teplotě -22 °C. Analyzované materiály byly postupně rozmrazeny, pomocí izolačních kolonek byla vyizolována DNA a provedena rt PCR reakce paralelně ve dvojicích.

### 3.2.2 MLST analýza

MLST analýza byla provedena podle metodiky navržené autory Ahmed a kol. (2006) [139]. Bylo vybráno 5 cílových genů: *adk* gen (amplifikační produkt o velikosti 531 bp), *idcA* gen (amplifikační produkt o velikosti 674 bp), *lipL41* gen (amplifikační produkt o velikosti 520 bp, *rrs2* gen (16S rRNA - amplifikační produkt o velikosti 541 bp) a *lipL32* gen (amplifikační produkt o velikosti 474 bp).

Sekvence pro geny *rrs2*, *lipL32* a *lipL41* jsou dostupné v Genové bance, na základě kterých byly navrženy amplifikační PCR primery pro tyto geny. PCR primery pro *adk*, *idcA* geny byly syntetizovány na základě sekvencí laboratorních kmenů Fiocruz L1-130 a Lai 56601. The Primer 3 software byl použit pro navržení PCR primerů pro amplifikaci vytipovaných lokusů [139].

#### 3.2.2.1 Sekvence použitých primerů

***adk* gen** (velikost genu 564 bp, velikost amplifikačního produktu 531 bp)

**F - 5'GGGCTGGAAAAGGTACACAA3'**

**R - 5'ACGCAAGCTCCTTTTGAATC3'**

***idcA* gen** (velikost genu 1197 bp, velikost amplifikačního produktu 674 bp)

**F – 5'GGGACGAGATGACCAGGAT3'**

**R – 5'TTTTTTGAGATCCGCAGCTTT3'**

***lipL41* gen** (velikost genu 1068 bp, velikost amplifikačního produktu 520 bp)

**F – 5'TAGGAAATTGCGCAGCTACA3'**

**R – 5'GCATCGAGAGGAATTAACATCA3'**

***rrs2* gen** (velikost genu 1512bp, velikost amplifikačního produktu 541 bp)

**F - 5'CATGCAAGTCAAGCGGAGTA3'**

**R – 5'AGTTGAGCCCGCAGTTTTC3'**

*lipL32* gen (velikost genu 819 bp, velikost amplifikačního produktu 474 bp)

**F – 5'ATCTCCGTTGCACTCTTTGC3'**

**R – 5'ACCATCATCATCATCGTCCA3' [139]**

### 3.2.2.2 PCR amplifikace

PCR amplifikace 5 rozličných cílových genů byla uskutečněna v 5 oddělených reakcích za použití následující reakční směsi (viz. tab. 9) na cykléru 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, USA):

**Tab. 9** Příprava PCR reakční směsi pro MLST analýzu

20 µl směsi + 5 µl templátové DNA		1 vzorek
Voda PCR - grade		7,8 µl
Pufr TAKARA 10 x	1×	2,5 µl
dNTPs 2,5 mM	0,2 mM	2,0 µl
Primer F (10 pmol/l)	0,5 µmol/l	1,25 µl
Primer R (10 pmol/l)	0,5 µmol/l	1,25 µl
HS TAKARA polymeráza 5 UI / µl	1 U	0,2 µl

### Zvolený teplotní profil:

- a) Počáteční denaturace: 95 °C
  - b) Denaturace: 94 °C 30 s
  - c) Annealing: 58 °C 30 s
  - d) Extenze: 72 °C 1 min
  - e) Konečná extenze: 72 °C 7 min
- } **Celkem 40×**

### 3.2.2.3 Detekce PCR amplikonu

#### Detekce na agarózovém gelu

Všechny PCR amplikony 5 detekovaných cílových genů byly odděleně identifikovány za použití gelové elektroforézy, jež byla provedena na agarózovém gelu (koncentrace agarózy 2 %) s integrovaným interkalačním fluorescenčním barvivem Ethidium bromid, který po excitaci UV světlem emitoval záření z viditelné části světelného spektra a umožňoval tedy vizuální detekci PCR amplikonů.

### 3.2.2.4 Přečištění PCR amplikonů

**InnuPREP PCRpure Kit** (Analytik Jena, Jena, Německo)

### **Postup samotného přečištění:**

1. Do sběrné zkumavky byl vložen filtr.
2. Dále bylo napipetováno 500  $\mu$ l vazebného pufru.
3. Následně bylo na kolonku přidáno 20  $\mu$ l PCR produktu (max. množství je 50  $\mu$ l) a vše bylo promícháno pipetou.
4. Byla uskutečněna centrifugace 2 min při 12 000 rpm.
5. Kolonka byla vložena do eluční zkumavky a bylo přidáno 15  $\mu$ l elučního pufru.
6. Poté byla provedena inkubace 4 min při pokojové teplotě.
7. Dále byla směs centrifugována 1 min při 8 000 rpm a uchovávána při chladničkové teplotě (4 - 8 °C) do zpracování. Do sekvenační PCR byly pipetovány 2  $\mu$ l reakční směsi.

### **3.2.2.5 Sekvenační reakce**

Přečištěné PCR produkty 5 detekovaných genů v reakčních zkumavkách byly nejprve osekvenovány Sangerovou enzymatickou metodou za použití specifických terminátorů PCR reakce – dideoxynukleotidů ve směru 5'  $\rightarrow$  3' F vlákna a poté i R vlákna DNA. Samotná sekvenační reakce byla realizována za použití kitu BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) na ABI 3130 DNA sekvenátoru (Applied Biosystems, Foster City, USA). Postupovalo se dle instrukcí uvedených v návodu tohoto diagnostického kitu [140].

### **Teplotní profil sekvenační reakce**

- a) počáteční denaturace – 96 °C 3 min
  - b) denaturace- 96 °C 10 s;
  - c) annealing – 50 °C 5 s
  - d) extenze – 60 °C 2 min
  - e) závěrečná extenze – 72 °C 7 min.
- 4 °C do vyhodnocení
- } **Celkem 30x**

### **3.2.2.6 Přečištění produktů sekvenační reakce**

**InnuPREP DYEpure Kit** (Analytik Jena, Jena, Německo)

### **Postup samotného přečištění:**

1. V PCR zkumavce o objemu 0,5 ml bylo smícháno 300  $\mu$ l DYE Removal Buffer a 20  $\mu$ l produktu po sekvenační PCR, vše bylo promícháno pomocí vortexu.
2. Směs byla přenesena pipetou na kolonku (filtr vložený v jímací tubě).
3. Byla provedena centrifugace 3 min při 12 000 rpm.
4. Kolonka byla následně vložena do eluční zkumavky a bylo přidáno 10  $\mu$ l vody (do středu filtru).
5. Byla uskutečněna inkubace 4 min při pokojové teplotě a centrifugace 1 min při 8 000 rpm.
6. Směs byla přepipetována do PCR zkumavek o objemu 0,2 ml.
8. Následně bylo přidáno 30  $\mu$ l HID1, těsně před použitím bylo vše promícháno na vortexu.
9. Denaturace byla realizována po dobu 5 min při 95 °C (v cykléru P-E 24 00).
10. Před sekvenací byla přečištěná směs uložena do chladničky (5 – 8 °C).

### **3.2.2.7 Detekce produktů sekvenační reakce**

K identifikaci povahy DNA sekvencí, tedy zda se jedná o sekvenci patogenních leptospir, byl použit program Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Pro určení konkrétního sérovaru patogenních leptospir byl použit program Clustal 2.0.12 multiple sequence alignment, který umožňuje porovnání DNA sekvencí neznámého sérovaru patogenních leptospir s referenčními laboratorními kmeny uloženými v knihovně DNA sekvencí.

### **3.2.2.8 Optimalizace reakčních komponent PCR detekce 5 cílových genů**

Všechny kroky k získání specifických DNA sekvencí byly provedeny dle publikace Ahmed a kol (2006) [139]. Bylo ověřeno, že výsledky tohoto postupu pro praktické provedení sekvenačních reakcí jsou dostatečně uspokojující. Pro následné zvýšení citlivosti sekvenačních reakcí, byla optimalizována volba reakčního pufru, množství MM: templátové DNA a počet reakčních cyklů PCR vyšetření.

#### **Volba reakčního pufru**

Pro provedení PCR amplifikace byl nejprve použit reakční pufr TAKARA, poté byla reakce provedena s reakčním pufrem MOLZYME. Výsledky optimalizačního procesu jsou uvedeny v části výsledky.

### **Množství MasterMix : množství templátové DNA**

Pro následnou optimalizaci množství MM : množství templátové DNA byly zvoleny následující poměry: 15 µl : 10 µl a 20 µl : 5 µl. Výsledky optimalizace jsou popsány v části výsledky.

### **Počet PCR cyklů**

Jako počáteční počet cyklů bylo zvoleno 35 cyklů doporučených v publikaci Ahmed a kol. (2006) [139]. Dále bylo provedeno 40 cyklů, jelikož jsme se domnívali, že tento krok bude mít kladný vliv na zvýšení citlivosti sekvenačních reakcí.

### **3.2.3 Epidemiologické šetření výskytu leptospirózy v Královéhradeckém, Pardubickém kraji a části kraje Vysocina**

Biologické materiály byly vyšetřovány dle požadavků klinických lékařů metodou MAT a PCR. Pro zpracování souboru byl jako počáteční zvolen rok 2002, protože v tomto roce byla zavedena PCR metoda detekce DNA patogenních leptospir za využití primerů B64I, II a G1, G2. V analyzovaném souboru byly spočítány všechny potvrzené případy leptospirózy diagnostikované jak pomocí MAT, tak PCR metodou či jejich kombinací. Informace byly dále doplněny o věkové rozmezí pacientů s leptospirózou, o incidenci leptospirózy a počet případů leptospirózy v jednotlivých letech.

### **3.2.4 Serion ELISA classic *Leptospira* IgM/IgG**

Pro detekci specifických protilátek proti patogenním leptospirám třídy IgM a IgG byl zkoušen diagnostický kit SERION ELISA *classic Leptospira* IgM/IgG (Serion, Würzburg, Německo). V ELISA testu jsou použity antigeny nepatogenní *L. biflexa*, a proto vyhledává rodově specifické protilátky.

#### **3.2.4.1 Stanovení IgM protilátek**

##### **Příprava krevních vzorků**

Vzorky krevních sér vyšetřovaných na přítomnost IgM protilátek byly nejprve upraveny absorbentem revmatoidního faktoru (Rf), který může odpovídat za falešně pozitivní výsledky, zejména ve třídě nespecifických protilátek IgM.



Před samotným provedením reakce, byl absorbent Rf (V1) naředěn čtyřmi díly ředícího pufru (V2) následujícím způsobem:  $V1 + V2 = 1 + 4$ . Při praktické aplikaci bylo 200  $\mu\text{l}$  Rf-absorbentu přidáno k 800  $\mu\text{l}$  ředícího pufru.

Vzorky krevních sér (V3) byly naředěny ředícím pufrům (V4) v následujícím poměru :  $V3 + V4 = 1 + 100$  (prakticky bylo k 10  $\mu\text{l}$  krevního séra přidáno 1000  $\mu\text{l}$  Rf ředícího pufru).

Před samotnou aplikací naředěných vzorků krevních sér do jamek mikrotitrační destičky byly krevní vzorky důkladně promíchány pomocí vortexu.

#### **3.2.4.2 Stanovení IgG protilátek**

##### **Příprava vzorků krevních sér**

Před vlastním provedením imunoenzymatické metody, byly vyšetřované vzorky krevních sér (V1) naředěny ředícím pufrům (V2) v poměru  $V1 + V2 = 1 + 100$  (10  $\mu\text{l}$  vzorku séra k 1000  $\mu\text{l}$  ředícího pufru).

Před samotnou aplikací naředěných vzorků krevních sér do jamek mikrotitrační destičky byly krevní vzorky opět důkladně promíchány vortexem.

##### **Uchování krevních vzorků**

Takto připravené a pečlivě uzavřené vzorky analyzovaných krevních sér byly uchovávány při teplotě 2 – 8 °C v chladničce po dobu 7 dnů. Dlouhodobě byly tyto vzorky uchovávány v mrazničce při teplotě -20 °C.

#### **3.2.4.3 Provedení imunoenzymatické metody**

Naředěné vzorky krevních sér byly v množství 100  $\mu\text{l}$  pipetovány do mikrotitrační destičky, stejným způsobem bylo aplikováno 100  $\mu\text{l}$  kontrolního a standardního krevního séra. Destička byla vložena do igelitového sáčku a umístěna do termostatu nastaveného na teplotu 37 °C po dobu 60 min. Po uplynutí inkubační doby byla mikrotitrační destička 4× promyta 300  $\mu\text{l}$  promývacího roztoku v pracovním ředění. Na závěr byl obsah mikrotitrační destičky vyklepnut do připravené buničité vaty.

Do každé jamky destičky bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  konjugátu – specifické protilátky značené alkalickou fosfatázou. Destička byla inkubována v termostatu nastaveném při 37 °C po dobu 60 min a následně opět 4× promyta 300  $\mu\text{l}$  promývacího roztoku v pracovním ředění. Na závěr byl obsah mikrotitrační destičky vyklepnut do připravené buničité vaty.

Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo napipetováno 100 µl roztoku substrátu a byla provedena inkubace při 37 °C v délce 30 min.

Po uplynutí stanovené doby bylo do každé jamky mikrotitrační destičky napipetováno 100 µl zastavovacího roztoku (STOP). Nakonec byla do 60 min po zastavení reakce odečtena extinkce vzorků, pozitivní a negativní kontroly při vlnové délce 405 nm a zvolené referenční vlnové délce 650 nm na ELISA readeru MRX 3200 (Dynatech Laboratories, St. Louis, USA).

#### 3.2.4.4 Výpočet koncentrace IgM a IgG

Pro vyhodnocení testu byla konstruována standardní křivka a vyhodnocovací tabulka, aby bylo možné naměřené hodnoty extinkce přepočítat na odpovídající koncentraci specifických Ab proti leptospirám.

##### Stanovení cut-off hodnot pro IgG

Nejprve byla vynásobena průměrná hodnota naměřené standardní extinkce MW(STD) s číselnými údaji z osvědčení o kontrole kvality.

Ehh = 0,631 × MW (STD) ..... Horní hranice normálních hodnot IgG

Edh = 0,406 × MW (STD) ..... Dolní hranice normálních hodnot IgG

##### Vzorec pro výpočet odpovídající koncentrace (c) IgG protilátek

$$c \exp \left[ C - \frac{\ln \left( \frac{D}{MW(VZ) * \frac{RF(STD)}{MV(STD)} + A} - 1 \right)}{B} \right]$$

A, B, C, D ... parametry standardní křivky

A = 0,004, B = 0,984, C = 3,064, D = 1,721

RF (STD) referenční hodnota standardu

MW (VZ) průměrná hodnota extinkce vzorku

MW (STD) průměrná hodnota extinkce standardu

##### Vyhodnocení výsledků

Za pozitivní výsledek vyšetření specifických IgG protilátek proti leptospirám byly považovány koncentrace vyšší než 9 IU/ml, za mezní 5 - 9 IU/ml a za negativní nižší než 5 IU/ml.

##### Stanovení cut-off hodnot pro IgM

Průměrné hodnoty naměřené standardní extinkce MW (STD) byly vynásobeny s číselnými údaji z osvědčení o kontrole kvality.

Ehh = 1,252 × MW (STD) ... horní hranice normálních hodnot IgM

Edh = 1,026 × MW (STD) ... dolní hranice normálních hodnot IgM

### Vzorec pro výpočet odpovídající koncentrace (c) IgM protilátek

$$c \exp \left[ C - \frac{\ln \left( \frac{D}{MW(VZ) * \frac{RF(STD)}{MW(STD)} + A} - 1 \right)}{B} \right]$$

A, B, C, D ... parametry standardní křivky

A = 0,023, B = 0,838, C = 4,578, D = 5,100

RF (STD) referenční hodnota standardu

MW (VZ) průměrná hodnota extinkce vzorku

MW (STD) průměrná hodnota extinkce standardu

### Vyhodnocení výsledků

Za pozitivní výsledek vyšetření specifických IgM protilátek proti leptospirám byly považovány koncentrace vyšší než 20 IU/ml, za mezní 15 - 20 IU/ml a za negativní nižší než 15 IU/ml.

### 3.2.5 MAT

MAT byl proveden standardně používanou metodikou, která je doporučována Světovou zdravotnickou organizací (WHO) [141]. Pro praktické provedení mikroaglutinační reakce bylo použito 11 laboratorních kmenů patogenních leptospir, jež byly izolovány na území ČR (viz 3.1.1.1).

#### 3.2.5.2 Screeningové vyšetření

##### Ředění krevního séra

Vyšetřovaná krevní séra byla naředěna v poměru 1:50, tj. přibližně 20 µl séra a 1 ml fosfátového pufru (PBS) v připraveném plastickém panelu.

##### Pracovní postup – Screeningové vyšetření

Testování bylo prováděno v box-biohazard bez nucené cirkulace vzduchu. Screeningová mikroaglutinační reakce byla testována v mikrotitračních destičkách. Do první řady byla napipetována negativní kontrola kmene, tj. do jamek byla nakapáno 50 µl PBS místo naředěného séra. Do všech ostatních jamek mikrotitrační destičky bylo přidáno 50 µl séra naředěného v plastickém panelu nebo ve zkumavkách 1:50 (tzn. 20 µl krevního séra + 1000 µl PBS). Krevní séra byla aplikována do vodorovných řad; vždy krevní sérum od jednoho pacienta do 11 jamek. Svisle, ve sloupcích bylo do každé jamky mikrotitrační

destičky napipetováno 50  $\mu$ l příslušného antigenu. Destička byla poté inkubována 1 h při 37 °C v termostatu nebo 2 h při laboratorní teplotě.

#### **Hodnocení screeningového vyšetření:**

Pomocí poloautomatické osmikanálové mikrotitrační pipety byly po inkubaci nanášeny 10  $\mu$ l kapky krevních sér smíšených s příslušným antigením kmenem na sterilní podložní sklíčko. Na horní polovinu podložního sklíčka bylo nanášeno celkem 8 kapek, na dolní polovinu zbývající 3 kapky reakční směsi. Mikroaglutinační reakce byla odečítána technikou mikroskopie v zástinu při zvětšení 100 - 400 $\times$ . Za pozitivní výsledek mikroaglutinačního screeningového testu byla považována mikroaglutinace anebo lýza více než 30 % živých laboratorních kmenů patogenních leptospir.

#### **3.2.5.3 Titrace krevního séra**

Krevní séra, která byla pozitivní ve screeningovém základním ředění v titru 1:50, byla dále vyšetřena titrační reakcí geometrickou řadou (1:100, 1:200, až 1:51 200) se všemi laboratorními kmeny patogenních leptospir, u nichž byla prokázána pozitivní reakce popř. i s dalšími sérovary téže sérologické skupiny až do konečného titru.

#### **Ředění krevních sér**

Bylo připraveno nové ředění krevního séra 1:50, dále bylo provedeno ředění geometrickou řadou (0,5 ml ředěného krevního séra + 0,5 ml PBS) v plastickém panelu

#### **Provedení mikroaglutinační reakce**

Bylo připraveno nové ředění krevního séra 1:50 a dále bylo ředěno geometrickou řadou (0,5 ml ředěného krevního séra + 0,5 ml PBS) v plastickém panelu. Vyšetřovaná krevní séra byla titrována ve vodorovných řadách v příslušných ředěních (1:50 - 1:51 200) v množství 50  $\mu$ l. K vytitrovanému krevnímu séru ve vodorovné řadě byl aplikován jeden živý laboratorní kmen vždy v množství 50  $\mu$ l. Inkubace byla realizována za stejných podmínek jako u předchozího screeningového vyšetření.

#### **Hodnocení**

Absence aglutinace byla vyhodnocena jako negativní reakce. Reakce, v níž byla naprostá většina leptospir aglutinována, a případně i lyzována, byla vyhodnocena na +++, v reakci, kde přibližně asi 30 % leptospir bylo aglutinováno na ++, a reakce, kde bylo přítomno jen malé množství aglutinací na +. Za pozitivní byla považována aglutinace na ++. Za konečný titr bylo označeno to ředění, ve které byla přítomna reakce na ++. Za pozitivní výsledek mikroaglutinačního testu byl považován titr 1:400 a více, za hraniční titr 1:200.

## 4. VÝSLEDKY

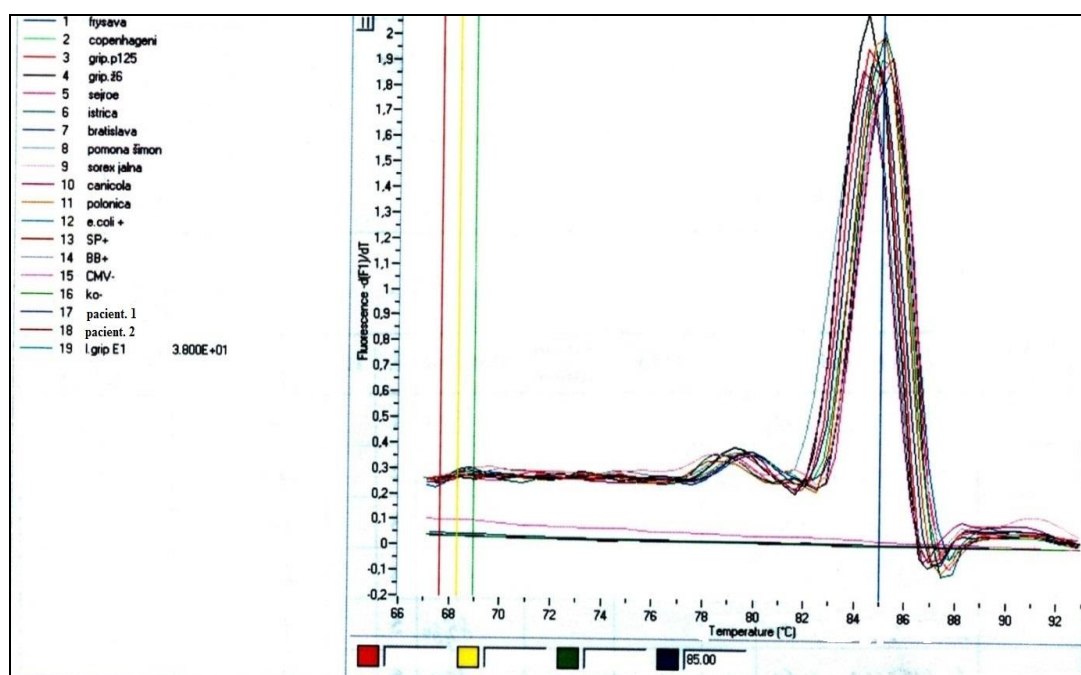
### 4.1 Rt PCR metoda detekce genu kódujícího lipoprotein LipL32

#### 4.1.1 Ověření pozitivní analytické specifity

U všech 11 laboratorních kmenů patogenních leptospir izolovaných na území ČR (*L. icterohaemorrhagiae* Fryšava, *L. copenhageni* Lebe, *L. grippotyphosa* P125, *L. grippotyphosa* Ž6, *L. sejroe* M84, *L. isticra* J20, *L. bratislava* Jež Bratislava, *L. Pomona* Šimon, *L. canicola* Hond Utrecht IV, *L. polonica* Poland, *L. sorex jalna* Sorexjalna) vykazovaly výsledky rt PCR metody dobrou pozitivní analytickou specifitu. U všech laboratorních kmenů byl detekován gen *lipl32* (viz obr. 31).

#### 4.1.2 Ověření negativní analytické specifity

Při stanovení negativní analytické specifity u laboratorních kmenů *E. coli* referenční kmen ATCC 11775, *Str. pneumonie* referenční kmen ATCC 49619, *B. burgdorferi* (klinický izolát), CMV (klinický izolát) a *L. biflexa* strain Patoc Patoc I byl výsledek rt PCR vyšetření vždy negativní, tj. u žádného z nich nebyl detekován gen *lipl32* (viz obr. 31)

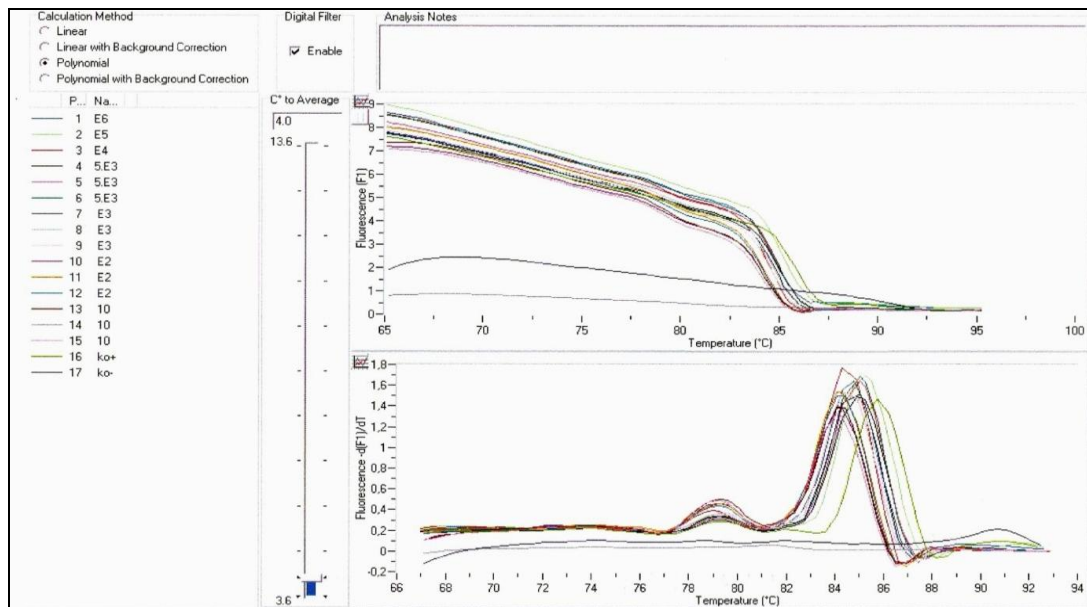


Obr. 31 Ověření pozitivní a negativní analytické specifity

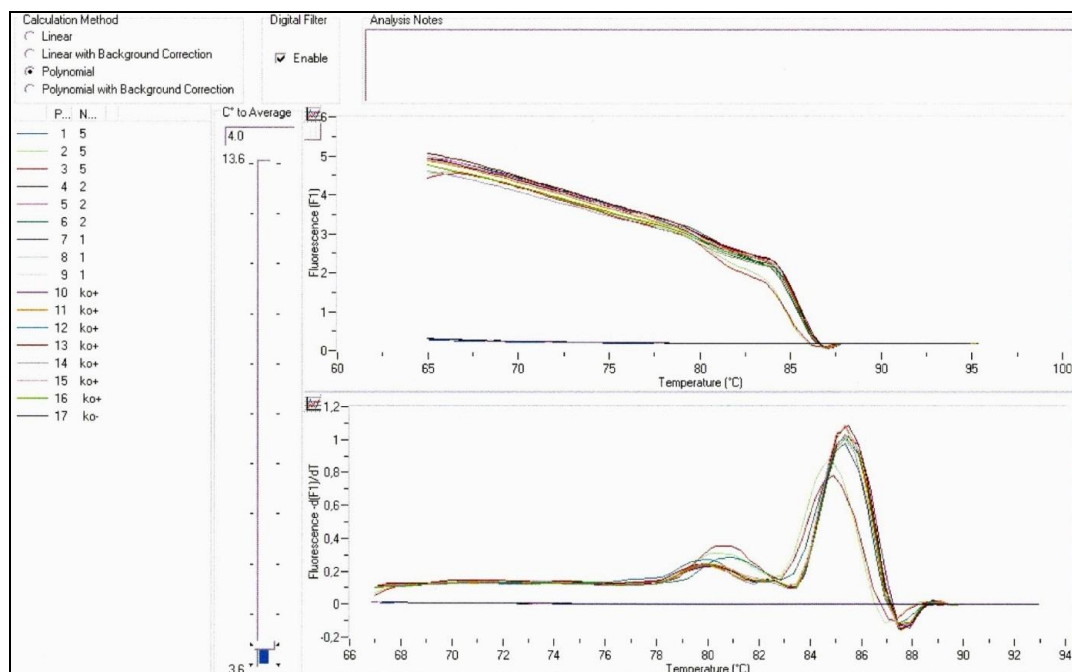
#### 4.1.3 Ověření detekčního limitu

Detekční limit zavedené rt PCR metody byl stanoven na 1 - 5 kopií genomu patogenních leptospir v ml tekutého biologického materiálu. U ředění 2 kopií genomu/ml

byl výsledek vyšetření ještě pozitivní a u ředění 1 kopie genomu/ml byl výsledek hraniční. Záznamy jsou uvedeny na obr. 32 a 33.



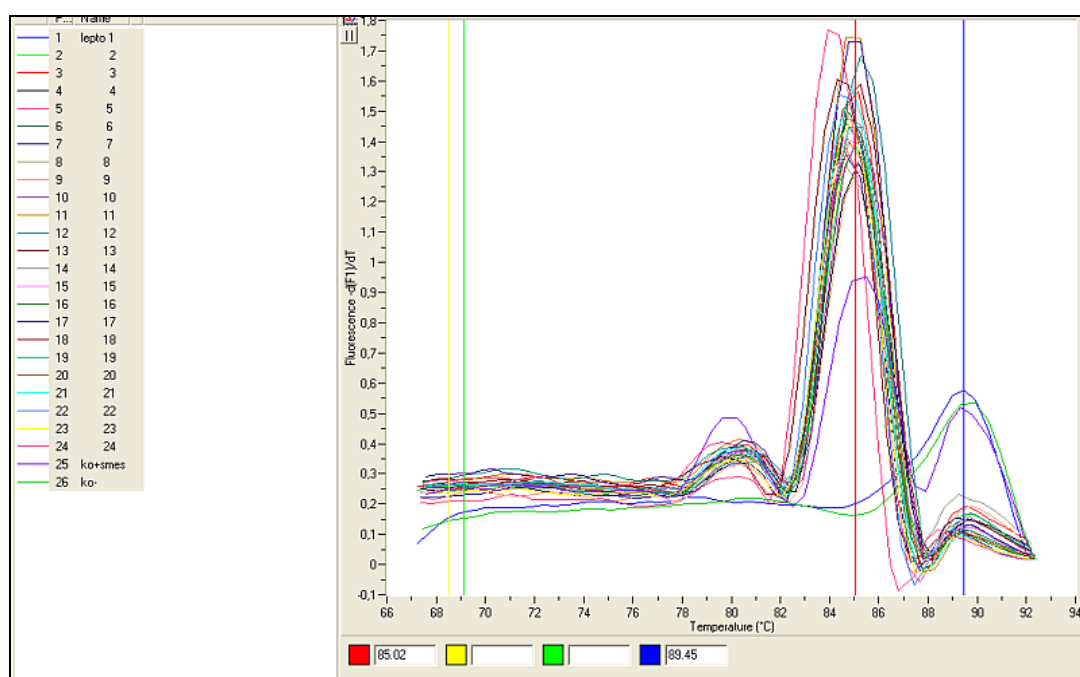
**Obr. 32** Testování meze detekce rt PCR metody pro jednotlivá ředění laboratorního kmene *L. icterohaemorrhagiae* Copenhageni (ředění  $10^6 - 10^1$  kopií genomu/ml tekutého biologického materiálu



**Obr. 33** Testování meze detekce rt PCR metody pro jednotlivá ředění laboratorního kmene *L. icterohaemorrhagiae* Copenhageni (ředění 5 – 1 kopií genomu/ml tekutého biologického materiálu

#### 4.1.4 Výsledky rt PCR detekce genu pro LipL32 u 230 sbírkových kmenů leptospir

Výsledky vyšetření u 230 laboratorních kmenů získaných z Royal Tropical Institute v Holandsku byly následující: u 218 (94,8 %) laboratorních kmenů patogenních leptospir byl výsledek rt PCR vyšetření vždy pozitivní, u 7 (3,0 %) nepatogenních vždy negativní. U leptospir, u nichž není genom-species determinován ( $n = 5$ ; 2,2 %), bylo zjištěno následující: u *L. serogroup Australis Soterpolitana* R 93, *L. serogroup Icterohaemorrhagiae Hongchon* 18 R, *L. serogroup Icterohaemorrhagiae Yeonchon* HM a *L. serogroup Tarrasovi Banna* A 31 byl výsledek vyšetření pozitivní, u *L. serogroup Pyrogenes Nigeria Vom* negativní. Ukázka rt PCR záznamu 24 laboratorních kmenů leptospir je uvedena na obr. 34.

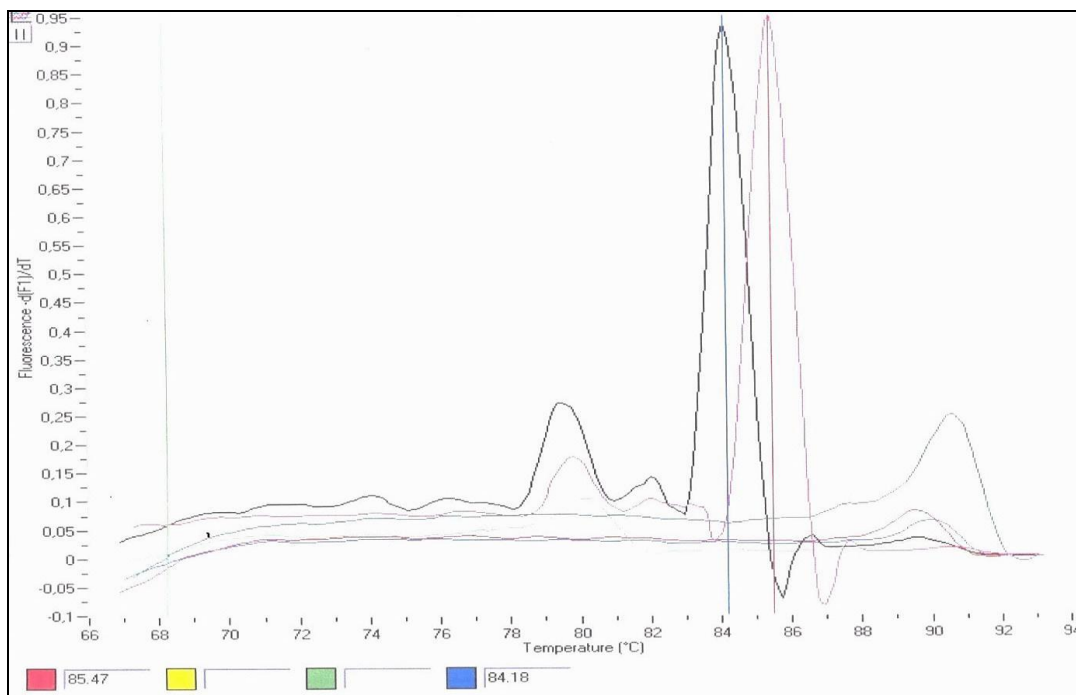


**Obr. 34** Vyhodnocení procesu analýzy teploty tání u prvních 24 sbírkových laboratorních kmenů leptospir + pozitivní a negativní kontrola

#### 4.1.5 Výsledky rt PCR vyšetření u pacientů suspektních na leptospirózu

Z 295 pacientů se suspektní leptospirózou bylo 9 osob (3,1 %) LipL32 pozitivní, od nichž pocházelo 15 (3,3 %) pozitivních biologických materiálů (10× moč, 4× krevní plazma, 1× likvor). Veškeré výsledky rt PCR detekce s confirmací MAT metodou jsou uvedeny v tab. 10.

Jak bylo ověřeno u klinických pracovníků, všechny rt PCR pozitivní biologické materiály byly odebrány v prvním týdnu onemocnění a před zahájením antibiotické terapie. Záznam rt PCR detekce moče LipL32 pozitivního pacienta je uveden na obr. 35



- Pozitivní pacient moč      — Negativní pacient moč      — Negativní pacient moč
- Pozitivní kontrola      — Negativní kontrola      — Negativní pacient krev

**Obr. 35** Výsledky rt PCR vyšetření u pacientů suspektních na leptospirózu



**Tab. 10** Výsledky vyšetření rt PCR a MAT metody u PCR pozitivních pacientů

Výsledky vyšetření	1.vyšetření	2.vyšetření	3.vyšetření	4.vyšetření	5.vyšetření
Pacient č.1	<b>PCR 21.6.2010</b> krev – <b>poz</b> , moč – <b>poz</b>	-	-	-	-
Pacient č.2	<b>MAT 29.6.2010</b> <i>L. sorex-jalna</i> 1:50	<b>PCR 29.6.2010</b> krev – <b>poz</b> , moč – <b>poz</b>	<b>MAT 7.7.2010</b> <i>L. grippotyphosa</i> Ž6 1:200	-	-
Pacient č.3	<b>MAT 28.7.2010</b> <i>L. bratislava</i> Jež Bratislava 1:200	<b>PCR 28.7.2010</b> krev – <b>poz</b> , moč – <b>poz</b>	<b>PCR 11.8.2010</b> moč – neg	-	-
Pacient č.4	<b>PCR 4.8.2010</b> krev – <b>poz</b> , moč– <b>poz</b> ,likvor – neg.	<b>MAT 5.8.2010</b> neg	-	-	-
Pacient č.5	<b>MAT 23.8. 2010</b> <i>L. icterohaemorrhagiae</i> Fryšava 1:50	<b>PCR 23.8.2010</b> krev – neg, moč – <b>poz</b> sputum – neg	-	-	-
Pacient č.6	<b>PCR 25.8.2010</b> krev – <b>poz</b> , moč - <b>hraniční</b>	<b>MAT 26.8.2010</b> <i>L. copenhageni</i> Lebe 1:50 <i>L. sorex-jalna</i> 1:50	<b>PCR 1.9.2010</b> moč – neg.	<b>MAT 3. 9. 2010</b> <i>L. grippotyphosa</i> P Ž6 1:400 <i>L. grippotyphosa</i> P125 1:200	<b>MAT 1.10. 2010</b> <i>L. grippotyphosa</i> P Ž6 1:800 <i>L. grippotyphosa</i> P125 1:400
Pacient č.7	<b>PCR 25.11.2010</b> krev – <b>poz</b> , moč – <b>poz</b>	<b>MAT 14.1.2011</b> <i>L. grippotyphosa</i> P125 1:200	-	-	-

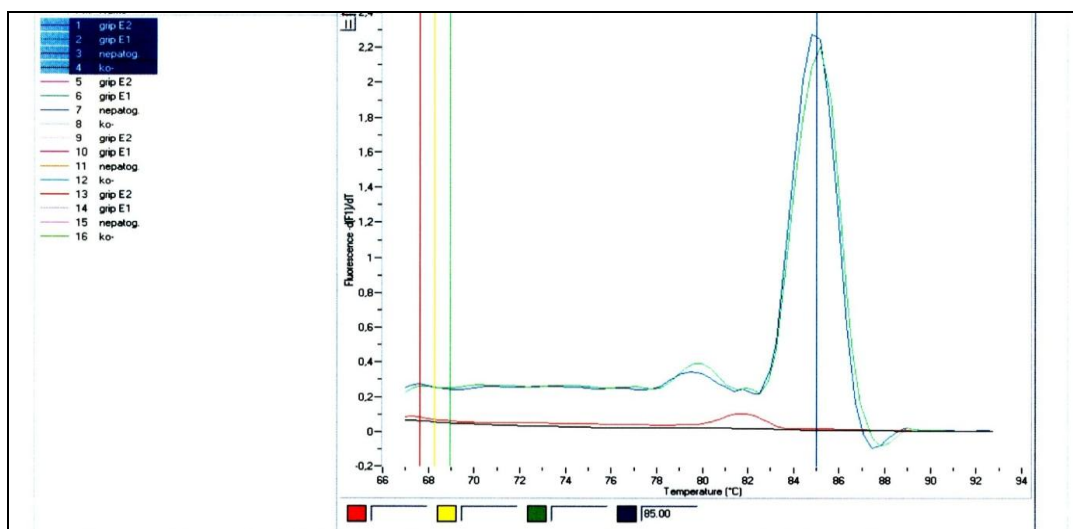
Výsledky vyšetření	1.vyšetření	2.vyšetření	3.vyšetření	4.vyšetření	5.vyšetření
Pacient č.8	PCR 12.9. 2011 krev - neg, moč– poz	MAT 12.9.2011 <i>L. grippotyphosa</i> P Ž6 1:50 <i>L. grippotyphosa</i> P125 1:50 <i>L. sejroae</i> M64 1:50	-	-	-
Pacient č.9	PCR 21.9. 2012 krev- neg, moč poz	MAT 3.10.2012 <i>L. grippotyphosa</i> Ž6 1:200			
Pacient č.10	PCR 9.9.2010 krev - neg, moč - neg	MAT 29.9.2010 <i>L. copenhageni</i> Lebe 1:400 <i>L. grippotyphosa</i> Z6 1:100 <i>L. sejroae</i> M 64 1:100	-	-	-
Pacient č.11	PCR 23.9.2011 krev - neg, moč - neg	MAT 21.10.2011 <i>L. sejroae</i> M64 1:800 <i>L. istrice</i> J20 1:1600 <i>L. polonica</i> Poland 1:6400	-	-	-

**Legenda:** poz – pozitivní výsledek vyšetření, neg- negativní výsledek vyšetření

## 4.1.6 Optimalizace rt PCR metody

### 4.1.6.1 Koncentrace $Mg^{2+}$ iontů

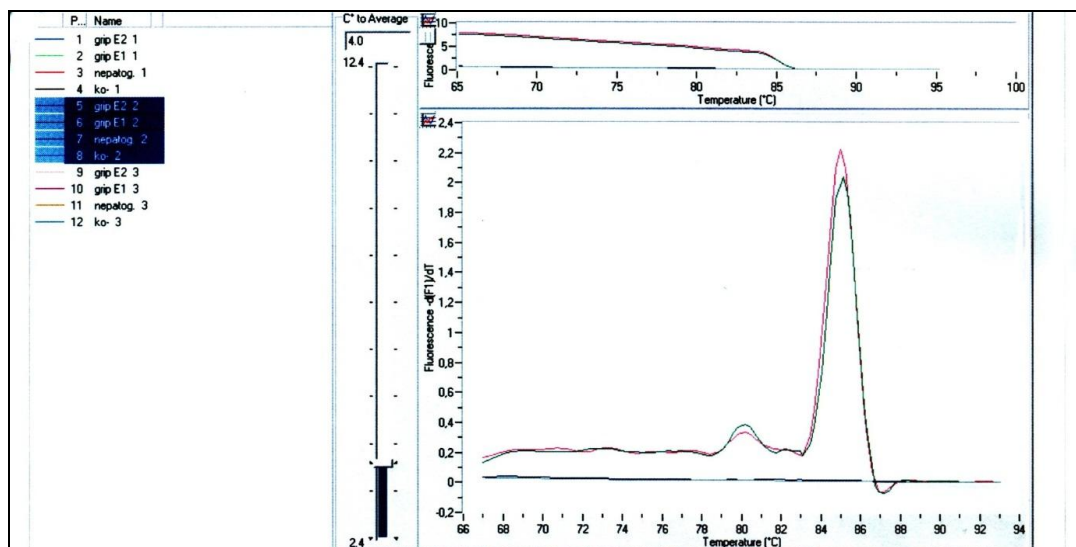
Jako optimální koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů byla díky získaným výsledkům optimalizačního procesu zvolena hodnota 3 mM (viz obr. 36). Při této koncentraci  $Mg^{2+}$  iontů byly zaznamenávány nejmenší nespecifity při provedení analýzy teploty tání. Výsledky optimalizace jsou zaznamenány v přílohách (příl.) 1 - 4.



Obr. 36 Koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů 3 mM

### 4.1.6.2 Koncentrace primerů

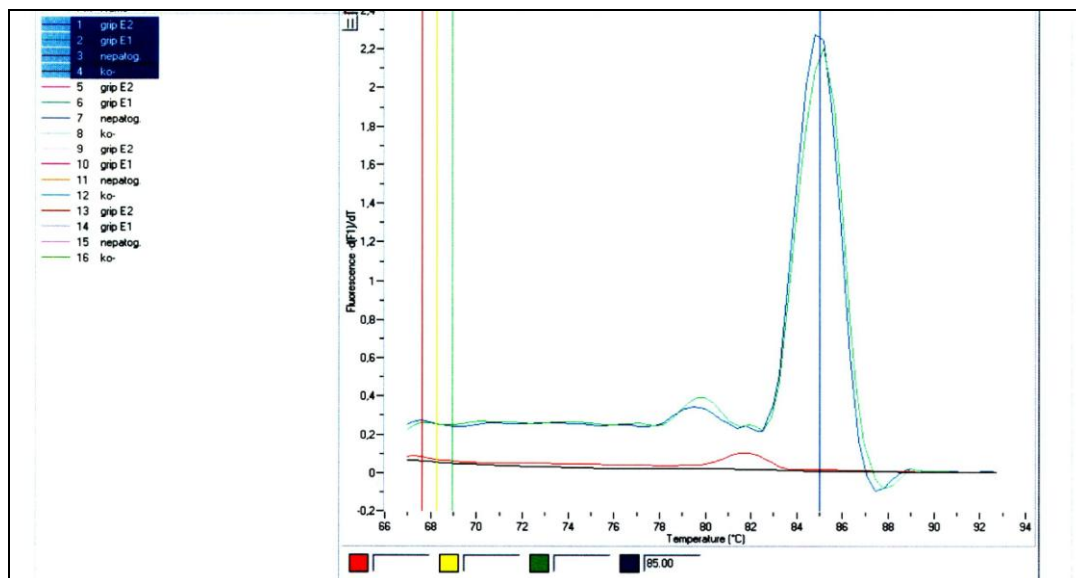
Pro praktické provedení rt PCR analýzy byla zvolena koncentrace primerů 0,3 mM F primeru a 0,3 mM R primeru (viz obr. 37), při této ekvimolární koncentraci F a R primerů bylo dosaženo nejvyšší hodnoty meze detekce rt PCR analýzy. Záznamy pro další koncentrace jsou uvedeny v příl. 5 a 6.



Obr. 37 Koncentrace primerů 0,3  $\mu$ M F primer a 0,3  $\mu$ M R primer

### 4.1.6.3 Poměru MasterMix : templátová DNA

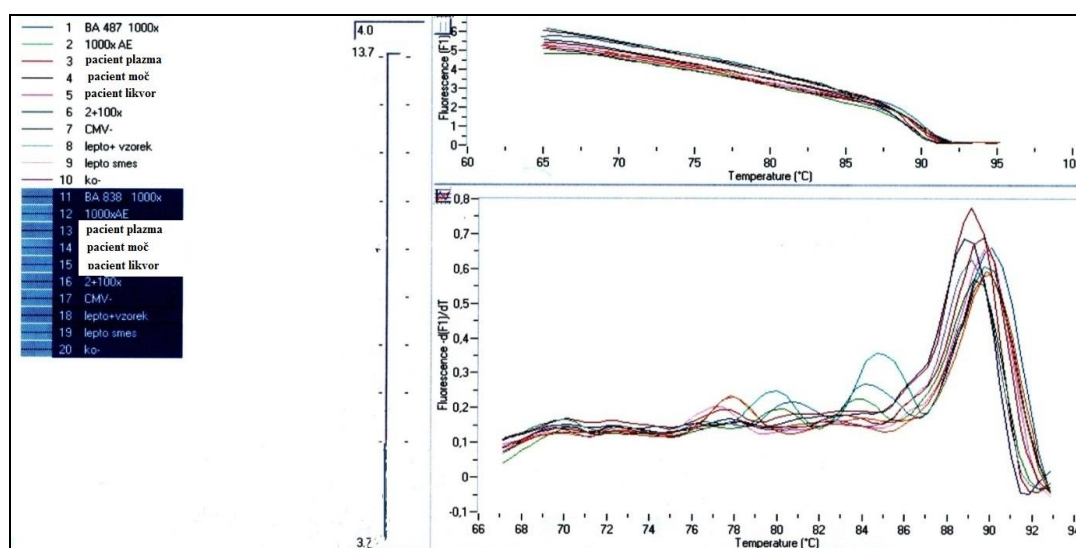
Jako nevhodnější poměr MM : templátová DNA byl zvolen 4 : 16, s nímž byly získány velmi dobré výsledky citlivosti rt PCR metody (záznam analýzy je na obr. 38). Výsledky optimalizace jsou uvedeny v příl. 7, 8.



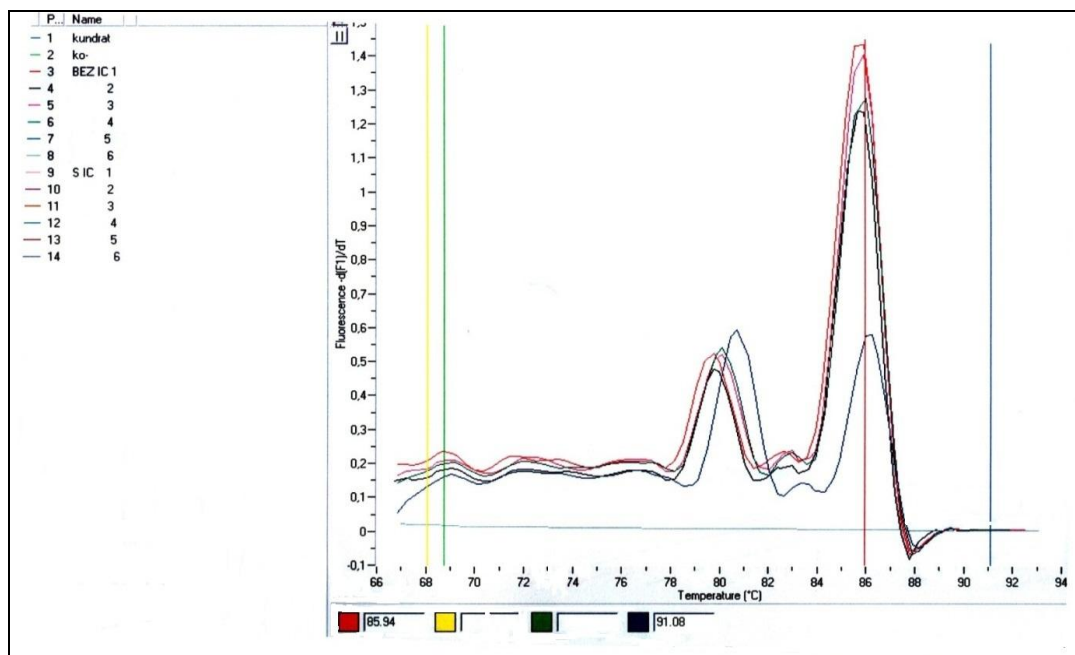
Obr. 38 Optimalizace množství MM : templátová DNA 4  $\mu$ l : 16  $\mu$ l

### 4.1.6.4 Volba inhibiční kontroly

Jako optimální IC byla zvolena IC 838, jejíž pík při provedení analýzy teploty tání neinterferoval se získaným píkem teploty tání pro DNA patogenních leptospir a při jejímž použití nebyla ovlivněna citlivost rt PCR analýzy (viz obr. 39). Záznamy dalších rt PCR detekcí jsou uvedeny v přílohách příl. 9 - 11. Začlenění IC do jedné reakce nemělo zásadní vliv na citlivost rt PCR detekce (viz. obr. 40)



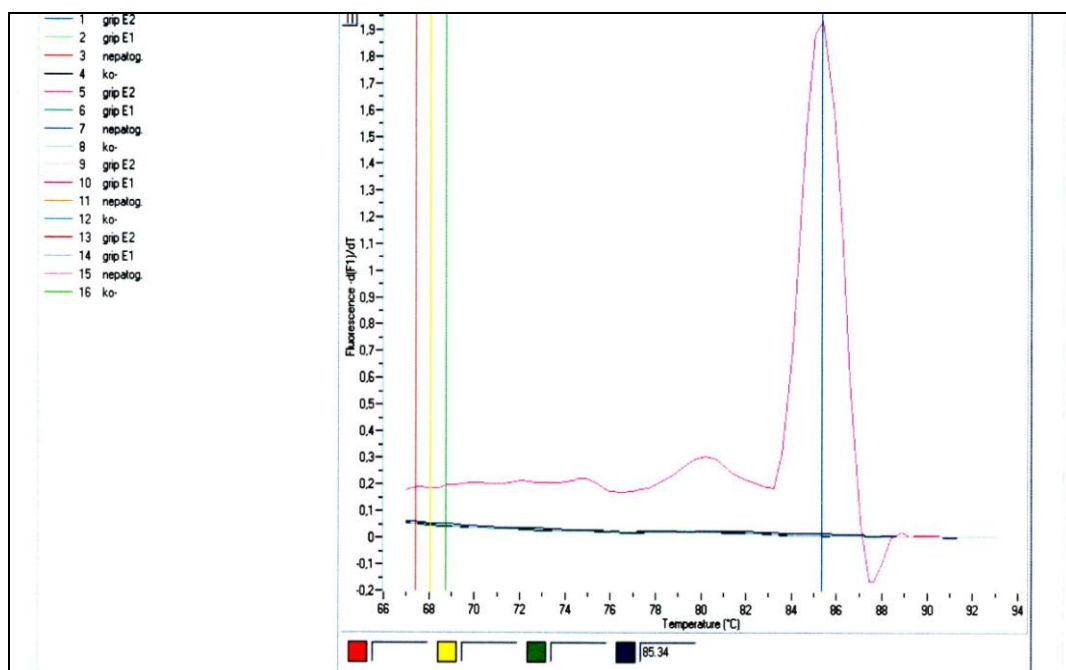
Obr. 39 Inhibiční kontrola IC 838



**Obr. 40** Citlivost rt PCR detekce bez IC a s IC

#### 4.1.6.5 Množství inhibiční kontroly

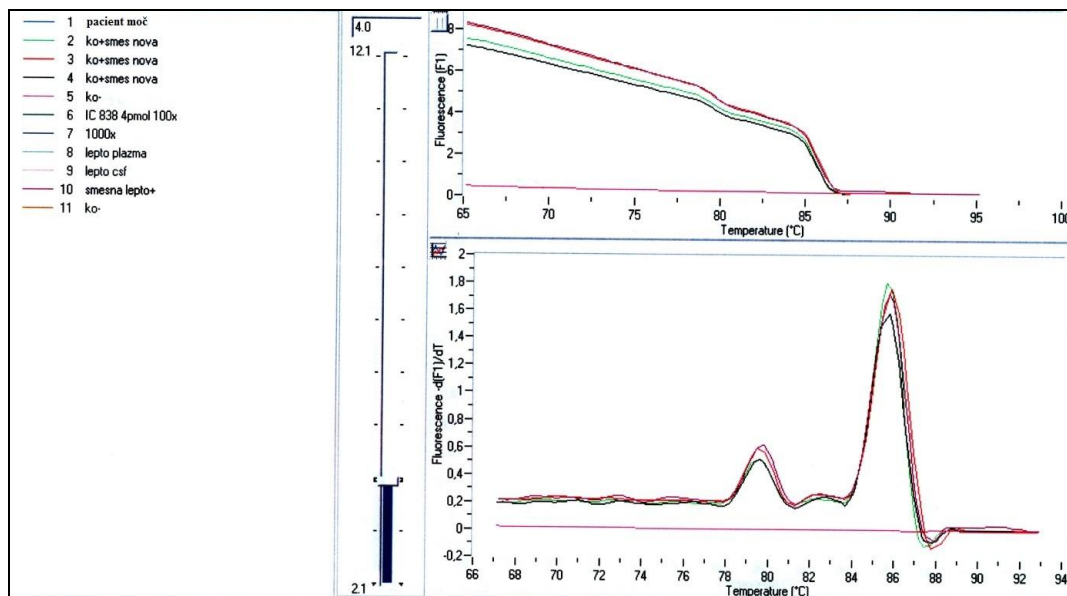
Z testovaných množství IC byly nejlepší výsledky získány při použití objemu 0,2  $\mu$ l (viz obr. 41). U objemu 0,4  $\mu$ l byla přítomna vysoká nespecificita, byl amplifikován pík o  $T_m = 78$  °C. (viz příl. 12)



**Obr. 41** Objem inhibiční kontroly 0,2  $\mu$ l

#### 4.1.6.6 Koncentrace primerů inhibiční kontroly

Po optimalizaci koncentrace použitých primerů pro IC 838 byla jako nejlepší zvolena pracovní koncentrace 0,02  $\mu\text{M}$  (viz obr. 42), při této koncentraci nebyla ovlivněna citlivost rt PCR analýzy. Pro koncentraci 0,05  $\mu\text{M}$  byl získán příliš vysoký pik IC 838. Z tohoto důvodu byla následně snížena koncentrace použitých primerů.



Obr. 42 Koncentrace primerů IC 0,02  $\mu\text{M}$

#### 4.1.7 Validace rt PCR metody

Výsledky pozitivní a negativní analytické specifity a meze detekce zavedené rt PCR metody jsou uvedeny v oddíle 4.1.1, 4.1.2 a 4.1.3.

##### 4.1.7.1 Reprodukovatelnost a mezilehlá přesnost

###### Reprodukovatelnost

Pro stanovení reprodukovatelnosti metody bylo provedeno 8 měření vzorku na 3 úrovních (1000 kopií/ml, 10 kopií/ml a směsná kontrola). U vzorku 1000 kopií/ml byl stanoven CV 0,3 %, u vzorku 10 kopií/ml CV 3,3 % a u směsné pozitivní kontroly CV 0,6 %. Výpočet průměru, směrodatné odchylky a následně CV byl proveden ze získaných Ct hodnot.

###### Mezilehlá přesnost

Pro stanovení mezilehlé přesnosti metody bylo provedeno 10 po sobě jdoucích měření směsné pozitivní kontroly s výsledkem CV 0,5 %. Výpočet průměru, směrodatné odchylky a následně CV byl proveden ze získaných Ct hodnot.

#### 4.1.8 Výsledky rt PCR vyšetření vzorků získaných ze zevního prostředí

##### 4.1.8.1 Volba vhodného materiálu pro rt PCR vyšetření

Výsledky rt vyšetření vzorků získaných pouhým přefiltrováním přes gázu (FG), supernatantu získaného volnou sedimentací filtrátu FG, filtrátu FG naředěného destilovanou vodou v poměru 1:1, eluátů z hrubého filtru, eluátů z mikrofiltru, filtrátu FG zamraženého při teplotě  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  byly vyhodnoceny a jako optimální materiál pro následnou rt PCR analýzu vzorků povrchových vod a vlhkých substrátů byl vyhodnocen eluát získaný z hrubého filtru. Výsledky jsou uvedeny v tab. 11.

**Tab. 11** Volba optimálního materiálu pro rt PCR vyšetření pro následnou detekci DNA patogenních leptospir ve vzorcích povrchových a vlhkých substrátů

Arteficiálně inokulované vzorky vod	FG	FG - supernatant volná sedimentace	FG ředěná v poměru 1:1	Hrubý filtr	Mikrofiltr	FG $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vortex
	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct
Lepto č.1	29,93	neg	neg	26,41	28,35	33,34
Lepto č.2	neg	neg	neg	30,53	35,68	35,04
Lepto č.3	31,59	neg	neg	24,85	30,77	34,71
Lepto č.4	27,29	neg	neg	26,60	neg	30,63
Lepto č.5	27,02	neg	neg	26,48	28,99	neg
Lepto č.6	29,97	neg	neg	31,14	33,05	35,29
Lepto č.7	neg	30,3	neg	28,74	30,08	neg
Lepto č.8	39,41	neg	neg	neg	35,04	35,92
Lepto č.9	27,73	29,62	28,62	28,72	26,77	neg
Lepto č.10	26,99	28,26	26,64	28,60	neg	neg

##### 4.1.8.2 Výsledky rt PCR vyšetření pro povrchové vody a vlhké substráty

Z celkového počtu 680 provedených vyšetření bylo 5 (0,7 %) reakcí hraničních. Výsledky rt PCR vyšetření těchto vzorků ze zevního prostředí byly dále potvrzovány na pracovišti ÚKBD LF a FN HK s negativním výsledkem. Poté byla provedena sekvenční analýza pro konečné dourčení výsledků vyšetření. V sekvenční analýze byl opakovaně prokázán výsledek „nekultivovatelné bakterie“. Všechny vzorky byly tedy vyhodnoceny jako negativní.

## 4.2 MLST analýza

### 4.2.1 MLST analýza u 11 laboratorních kmenů patogenních leptospir vyskytujících se na území ČR

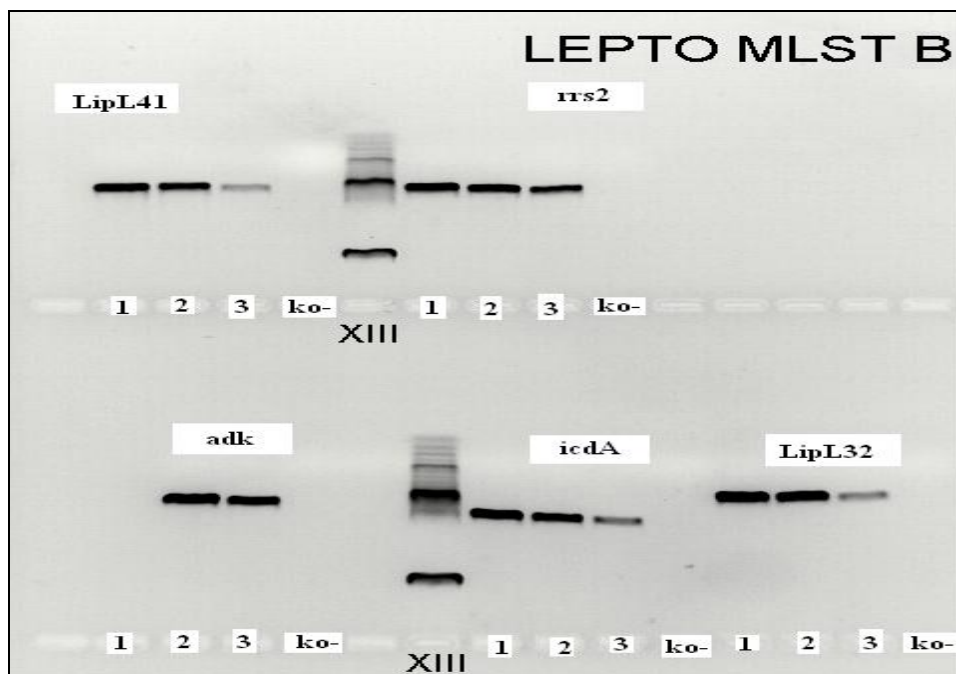
Pro přesnou identifikaci 11 laboratorních kmenů patogenních leptospir vyskytujících se na území ČR náležejících do 3 genomospecií (*L. interrogans*, *L. kirschneri* a *L. borgpetersenii*) byla použita metoda MLST.

Nejprve byla u všech 11 kmenů provedena izolace DNA a rt PCR reakce detekce genu pro LipL32 spolu s inhibiční kontrolou. Žádný z izolátů DNA nevykazoval známku přítomnosti inhibitorů DNA polymerázy a všechny laboratorní kmeny byly vyhodnoceny jako LipL32 pozitivní.

Při provedení MLST analýzy byly detekovány následující geny: *adk*, *icdA*, *lipl41*, *rrs2* (16S ribosomal RNA) a *lipl32* gen.

Výsledky sekvenční analýzy byly poté analyzovány pomocí různých internetových programů (BLAST, Clustal 2.0.12) pro bližší identifikaci leptospir a možné určení sérovaru patogenních leptospir.

Elektroforetický záznam PCR amplikonů genů *lipl41*, *rrs2*, *adk*, *icdA* a *lipl32* získaných při provedení MLST analýzy na agarózovém gelu je uveden na následujícím obr. 43.



**Obr. 43** Ukázka elektroforetického záznamu PCR reakcí v rámci MLST



Dále byla zjištěna skutečnost, že gen *adk* umožňuje detekci DNA pouze *L. interrogans*, gen *icdA* detekci *L. interrogans* a *L. kirschneri*, zbývající tři geny (*lipL41*, *rrs2* a *lipL32*) umožňují detekci všech 3 genomospecies přítomných v ČR (viz tab. 12)

**Tab. 12** Výsledky MLST 11 patogenních kmenů leptospir vyskytujících se v ČR

Laboratorní kmen leptospir	Genomospecies	PCR výsledky pro jednotlivé geny				
		<i>adk</i>	<i>icdA</i>	<i>lipL41</i>	<i>rrs2</i>	<i>lipL32</i>
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> Fryšava	<i>L. interrogans</i>	+	+	+	+	+
<i>L. copenhageni</i> Lebe	<i>L. interrogans</i>	+	+	+	+	+
<i>L. canicola</i> S392	<i>L. interrogans</i>	+	+	+	+	+
<i>L. bratislava</i> Jež Bratislava	<i>L. interrogans</i>	+	+	+	+	+
<i>L. pomona</i> Šimon	<i>L. interrogans</i>	+	+	+	+	+
<i>L. grippityphosa</i> P125	<i>L. kirschneri</i>	-	+	+	+	+
<i>L. grippityphosa</i> Ž6	<i>L. kirschneri</i>	-	+	+	+	+
<i>L. sejroe</i> M84	<i>L. borgpetersenii</i>	-	-	+	+	+
<i>L. istriica</i> J20	<i>L. borgpetersenii</i>	-	-	+	+	+
<i>L. sorex-jalna</i> Sorexjalna	<i>L. borgpetersenii</i>	-	-	+	+	+
<i>L. polonica</i> Poland	<i>L. borgpetersenii</i>	-	-	+	+	+

Pozn.: + pozitivní výsledek, - negativní výsledek

Následně byla u všech kmenů provedena PCR reakce v rámci MLST. Ukázka záznamu sekvenace jednoho laboratorního kmene leptospir pro geny *lipL41* a *rrs2* je uvedena v příl. 13 a 14.

#### 4.2.2 Vyhodnocení sekvenace DNA patogenních leptospir a určení infikujícího sérovaru u pacienta s potvrzenou leptospirózou

DNA sekvenace neznámého sérovaru leptospir získaná z krve pacienta byla porovnána se záznamy DNA referenčních sekvencí všech laboratorních kmenů patogenních leptospir vyskytujících se na území ČR. Na příl. 15 je naznačeno určení neznámého sérovaru leptospir, dle porovnání získaných DNA sekvencí se sekvencemi referenčními. Z tohoto obrázku je patrné, že červeně přeškrtnuté názvy leptospir mají sekvenace, které se liší alespoň v jedné bázi od zjištěné sekvenace patientského vzorku. Výsledkem je tedy přítomnost DNA genomospecies *L. kirschneri*, laboratorního kmene *L. grippityphosa* Ž6 nebo P125, neboť

jejich sekvence se s patientskou plně shoduje. Leptospiry ostatních genomospecies (*L. interrogans* a *L. borgpetersenii*) se liší alespoň v jedné bázi.

Ve studii se oproti původnímu cíli, určení specifické sekvence DNA patogenních leptospir, jež by byla charakteristická pro Weilovu chorobu a tímto způsobem bychom ji mohli rychle a jednoznačně odlišit od jiných druhů leptospiroz, se nám toto specifické pořadí nukleotidů nepodařilo odhalit.

#### **4.2.3 Optimalizace reakčních komponent MLST analýzy**

##### **4.2.3.1 Volba reakčního pufu**

Optimální výsledky PCR byly získány za použití reakčního pufu TAKARA především s ohledem na citlivost detekce PCR, při použití pufu MOLZYME došlo k výraznému snížení senzitivity detekce DNA patogenních leptospir. Výsledky PCR detekce ampliconů jsou uvedeny v příl. 16 a 17.

##### **4.2.3.2 Optimalizace množství MasterMix : množství templátové DNA**

Poměr množství MM : množství templátové DNA byl zvolen 20  $\mu$ l : 5  $\mu$ l, poměr 15  $\mu$ l : 10  $\mu$ l měl za následek snížení citlivosti reakce.

##### **4.2.3.3 Volba počtu reakčních cyklů PCR amplifikace**

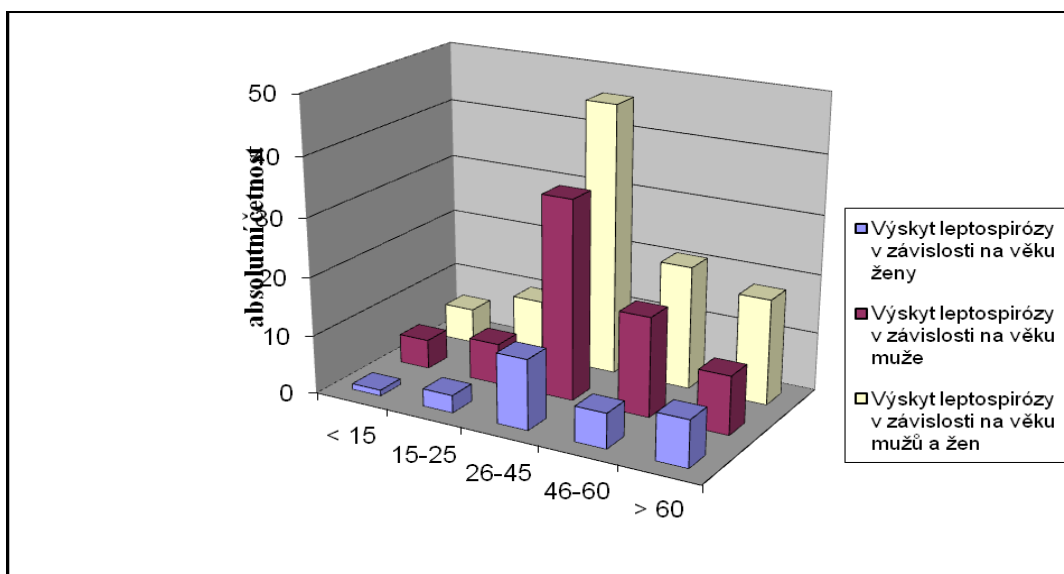
Nejprve byl testován počet 35 cyklů, jenž je doporučován ve zdrojové publikaci (Ahmed a kol. 2006) [139]. Navýšením počtu reakčních cyklů na 40 se zvýšila citlivost MLST analýzy.

### **4.3 Vyhodnocení výskytu leptospirózy v Pardubickém, Královéhradeckém kraji a části kraje Vysočina**

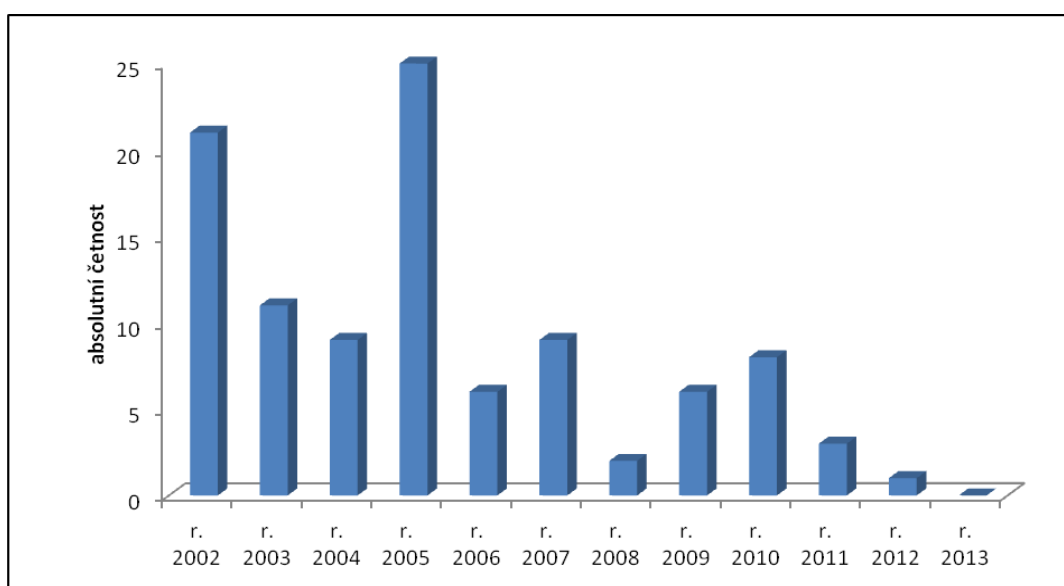
Z uvedeného počtu 5840 pacientů suspektních na leptospirózu bylo jako pozitivní vyhodnoceno 101 osob (1,7 %). Onemocnění bylo diagnostikováno u 71 mužů (70,3 %) a 30 žen (29,7 %), průměrný věk u mužů  $42,6 \pm 18,45$  a u žen  $46,5 \pm 18,12$ , průměrný věk muži + ženy  $44,6 \pm 18,3$ , věkové rozmezí 3 - 78 let. Celkem 53 (52,5 %) pozitivních pacientů bylo vyšetřeno pouze sérologicky, 44 (43,5 %) pozitivních pacientů bylo diagnostikováno kombinací PCR a MAT vyšetření a 4 pacienti (4,0 %) pouze PCR metodou. Jak je patrné z grafu 2, nejvíce pozitivních pacientů - mužů ( $n = 34$ ; 47,9 %) bylo ve věkovém rozmezí 26 - 45 let, u žen ( $n = 12$ ; 40,0 %) se dostáváme k obdobným závěrům. Z grafu 3 je zřejmé, že nejvíce leptospira-pozitivních osob jsme zaznamenali v roce 2002 ( $n = 21$ ; 20,8 %) a 2005 ( $n = 25$ ; 24,8 %), incidence leptospirózy v těchto letech činila 1,83 a 2,17/100 000 obyvatel (viz

tab. 13). V roce 2002 zasáhly území celé ČR rozsáhlé povodně a pro rok 2005 jsme si dotazem v Českém hydrometeorologickém ústavu ověřili, že v Pardubickém a Královéhradeckém kraji byly popisovány lokální povodně. Největší počet pozitivních pacientů byl zaznamenán v listopadu (n = 20; 19,8 %, viz graf 4).

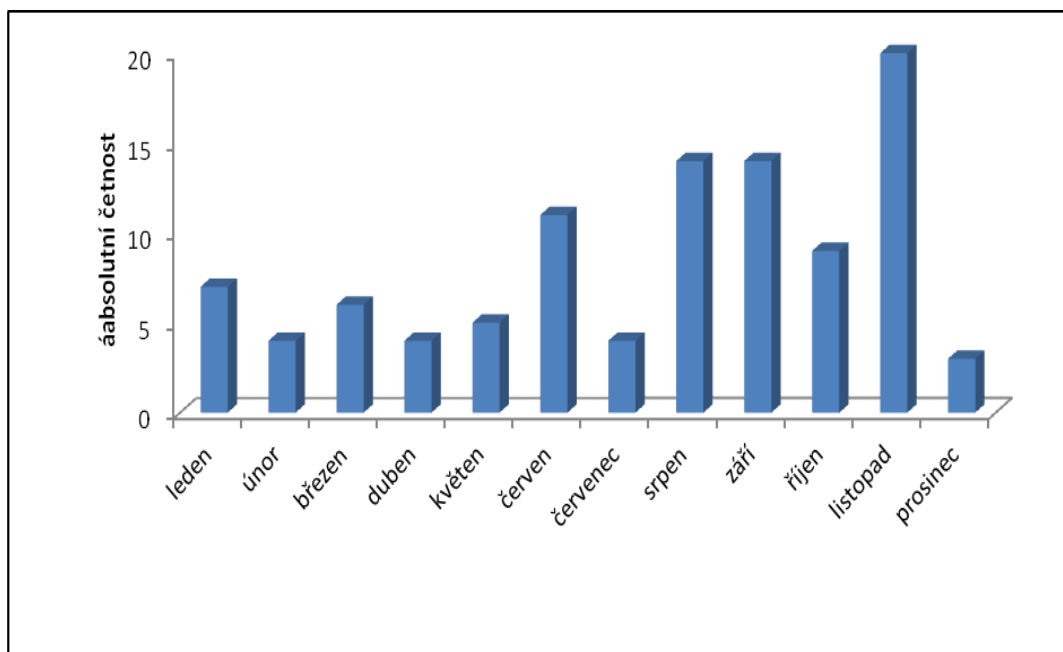
Nejfrekventovanějším infikujícím typem byl v naší studii sérovar *L. grippotyphosa* (n = 41, 42,3 %), následuje *L. icterohaemorrhagiae* nebo *L. copenhageni* (n = 27; 27,8 %), *L. istrica* (n = 14; 14,4 %), *L. sejroe* (n = 10; 10,3 %), *L. bratislava* (n = 3; 3,1 %) a *L. pomona* (n = 2; 2,1 %).



**Graf 2** Výskyt leptospirózy v závislosti na věku (ženy, muži, ženy + muži) – absolutní četnost



**Graf 3** Výskyt leptospirózy v jednotlivých letech 2002–2013 - absolutní četnost



**Graf 4** Výskyt leptospirózy v jednotlivých měsících 2002–2013 – absolutní četnost

**Tab. 13** Počet vyšetřených pacientů a incidence leptospirózy v letech 2002-2013

Rok	Počet vyšetřených pacientů	Počet pozitivních pacientů	Incidence (počet případů na 100 000 obyvatel)
2002	1 012	21	<b>1,83</b>
2003	773	11	0,96
2004	681	9	0,78
2005	763	25	<b>2,17</b>
2006	523	6	0,52
2007	408	9	0,78
2008	285	2	0,17
2009	368	6	0,52
2010	326	8	0,70
2011	298	3	0,26
2012	314	1	0,09
2013	89	0	0,00
<b>celkem</b>	<b>5840</b>	<b>101</b>	<b>-</b>

## 4.4 Serion ELISA classic *Leptospira* IgM/IgG

### 4.4.1 Výsledky ELISA vyšetření krevních sér příslušníků AČR na přítomnost specifických IgM/IgG protilátek proti leptospirám

V rámci studie byla otestována ELISA souprava firmy Serion pro detekci protilátek proti patogenním leptospirám a výsledky byly následně porovnány s metodou MAT, která je považována za zlatý standard sérologických vyšetření leptospirózy.

Celkem bylo ELISA metodou vyšetřeno 1553 krevních sér příslušníků AČR na přítomnost specifických protilátek proti leptospirám. Rozpis vyšetřovaných krevních sér je uveden v kapitole 3.1.5.1. Výsledky sérologického vyšetření jsou uvedeny následujících tab. 14 - 17. Při detekci IgM protilátek bylo jako pozitivní určeno 292 (18,8 %) a jako hraniční 148 (9,5 %) krevních sér, u třídy IgG se setkáváme s 396 (25,5 %) pozitivní a 392 (25,2 %) hraničními reakcemi.

**Tab. 14** Výsledky vyšetření krevních sér příslušníků AČR ze sérové banky AČR na přítomnost IgM protilátek proti patogenním leptospirám metodou ELISA

Vyšetření IgM protilátek	Výjezd na zahraniční misi		Návrat ze zahraniční mise	
	Počet krevních sér	%	Počet krevních sér	%
<b>IgM pozitivní</b>	88	31,5	88	31,5
<b>IgM hraniční</b>	46	16,5	42	15,1
<b>IgM negativní</b>	145	52,0	149	53,4
<b>Celkem</b>	<b>279</b>	<b>100,0</b>	<b>279</b>	<b>100,0</b>

**Tab. 15** Výsledky vyšetření krevních sér příslušníků AČR ze sérové banky AČR na přítomnost IgG protilátek proti patogenním leptospirám metodou ELISA

Vyšetření IgG protilátek	Výjezd na zahraniční misi		Návrat ze zahraniční mise	
	Počet krevních sér	%	Počet krevních sér	%
<b>IgG pozitivní</b>	73	26,2	58	20,8
<b>IgG hraniční</b>	55	19,7	67	24,0
<b>IgG negativní</b>	151	54,1	154	55,2
<b>Celkem</b>	<b>279</b>	<b>100,0</b>	<b>279</b>	<b>100,0</b>

**Tab. 16** Výsledky vyšetření krevních sér příslušníků AČR, kteří se v nedávné době vrátili ze zahraniční mise na přítomnost IgM a IgG protilátek proti patogenním leptospirám metodou ELISA

Nedávný návrat příslušníků ze zahraniční mise	IgM		IgG	
	Počet krevních sér	%	Počet krevních sér	%
<b>Pozitivní</b>	116	11,7	265	26,6
<b>Hraniční</b>	60	6,0	270	27,1
<b>Negativní</b>	819	82,3	460	42,3
<b>Celkem</b>	<b>995</b>	<b>100,0</b>	<b>995</b>	<b>100,0</b>

**Tab. 17** Souhrnné výsledky vyšetření krevních sér na přítomnost IgM a IgG protilátek proti patogenním leptospirám metodou ELISA

Souhrnné výsledky vyšetření	IgM		IgG	
	Počet krevních sér	%	Počet krevních sér	%
<b>Pozitivní</b>	292	18,8	396	25,5
<b>Hraniční</b>	148	9,5	392	25,2
<b>Negativní</b>	1113	71,7	765	49,3
<b>Celkem</b>	<b>1153</b>	<b>100,0</b>	<b>1153</b>	<b>100,0</b>

Všechna pozitivní krevní séra od příslušníků AČR byla konfirmačně vyšetřena s 11 laboratorními kmeny patogenních leptospir používanými v ČR (*L. icterohaemorrhagiae* Fryšava, *L. copenhageni* Lebe, *L. grippotyphosa* P125, *L. grippotyphosa* Ž6, *L. sejroe* M84, *L. pomona*, *L. sorex-jalna*, *L. bratislava* Jez Bratislava, *L. canicola* S 392, *L. polonica*, *L. isticica*) a rovněž nepatogenní *L. biflexa*, protože dotazem u výrobce byla ověřena skutečnost, že souprava je založena na detekci rodově specifických protilátek proti nepatogenní *L. biflexa*.

Dle údajů uvedených v dotaznicích příslušníků AČR, kteří souhlasili s odběrem krve pro testování protilátek proti patogenním leptospirám, k infekci uvedenými patogeny u těchto osob nedošlo.

Naprostá většina krevních sér potvrzených výše uvedenými laboratorními kmeny leptospir byla vyhodnocena metodou MAT jako negativní, včetně nepatogenní *L. biflexa*. U 26

(1,7 %) krevních sér byla zaznamenána slabá reakce v titrech 1:50 – 1:200 s laboratorními kmeny *L. grippotyphosa* P125 (n = 8; 30,8 %), *L. grippotyphosa* Ž6 (n = 7; 26,9 %), *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava (n = 3; 11,5 %), *L. sorex – jalna* Sorexjalna (n = 3; 11,5 %). *L. copenhageni* Lebe (n = 2; 7,6 %) *L. isticra* J20 (n = 1; 3,9 %), *L. bratislava* Jež Bratislava (n = 1; 3,9 %), *L. canicola* S392 (n = 1; 3,9 %).

Vzhledem ke skutečnosti, že ELISA souprava vykazovala nedostatečnou diagnostickou specificitu, bylo provedeno její další testování na souboru sérologicky a klinicky potvrzených sér pacientů.

#### **4.4.2 Stanovení diagnostické senzitivity a specificity soupravy Serion ELISA classic leptospira IgM/IgG**

Jak je uvedeno v tab. 18, u devíti z deseti pozitivních leptospirových sér byl prokázán pozitivní výsledek mikroaglutinačního testu, u jednoho pacienta byl stanoven hraniční titer.

U pacientů s prokázanou leptospirozou se titer protilátek stanovený metodou MAT pohyboval v rozmezí 1:400 - 1:51 200. U všech pacientů, u kterých nebyla prokázána infekce patogenními leptospirami a rovněž klinické hodnocení bylo „leptospiroza neprokázána“, byl výsledek mikroaglutinačního testu negativní.

U všech 10 krevních sér pozitivních na přítomnost protilátek proti leptospirám byl prokázán pozitivní výsledek testu při vyšetření IgM specifických imunoglobulinů metodou ELISA. Diagnostická senzitivita této soupravy činí 100,0 %. Při vyšetření zbývajících 35 sér metodou ELISA detekující IgM protilátky proti patogenním leptospirám byly odhaleny celkem 4 falešně pozitivní reakce (tab. 18). Diagnostická specificita ELISA soupravy byla stanovena 88,6%, pozitivní prediktivní hodnota (PPV) 71,4% a negativní prediktivní hodnota (NPV) 100%. U diagnostické soupravy pro detekci IgG specifických protilátek byla prokázána podstatně nižší specificita. U všech pozitivních leptospirových sér byl sice touto soupravou prokázán pozitivní výsledek testu, diagnostická senzitivita je rovna 100,0 %, ale ze zbývajících 35 krevních sér negativních na přítomnost protilátek proti patogenním leptospirám byly nalezeny falešně pozitivní výsledky testu u 16 (17,8 %) analyzovaných krevních sér. Nejčastěji byly prokázány falešně pozitivní reakce u krevních sér pozitivních na přítomnost protilátek proti boréliím (viz. tab. 18). Diagnostická specificita tohoto ELISA kitu detekujícího IgG protilátky proti patogenním leptospirám byla vyhodnocena pouze 54,3%, PPV 38,5% a NPV 100%.

**Tab. 18** Výsledky vyšetření krevních ser metodou ELISA a MAT

Číslo pacienta v souboru	Pohlaví	Věk	Výsledky klinické a sérologické konfirmace	Další sérologicky prokázané infekce	Výsledek MAT patogenní leptospiry	Výsledek MAT <i>L. biflexa</i> Patoc	Výsledek ELISA IgM	Výsledek ELISA IgG
1.	♂	40	<i>Leptospira</i> +	-	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní
2.	♂	28	<i>Leptospira</i> +	-	Pozitivní	Hraniční	Pozitivní	Pozitivní
3.	♂	62	<i>Leptospira</i> +	-	Pozitivní	Hraniční	Pozitivní	Pozitivní
4.	♂	66	<i>Leptospira</i> +	-	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní
5.	♂	48	<i>Leptospira</i> +	-	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní
6.	♂	50	<i>Leptospira</i> +	CMV +	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní
7.	♂	60	<i>Leptospira</i> +	HBS AB +	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní
8.	♂	25	<i>Leptospira</i> +	-	Pozitivní	Hraniční	Pozitivní	Pozitivní
9.	♂	53	<i>Leptospira</i> +	-	Hraniční	Hraniční	Pozitivní	Pozitivní
10.	♂	32	<i>Leptospira</i> +	-	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní	Pozitivní
11.	♂	56	<i>Leptospira</i> -	-	Negativní	Negativní	Negativní	Pozitivní
12.	♂	22	<i>Leptospira</i> -	-	Negativní	Nd	Negativní	Negativní
13.	♂	21	<i>Leptospira</i> -	CMV +	Negativní	Nd	Negativní	Negativní
14.	♂	37	<i>Leptospira</i> -	-	Negativní	Nd	Negativní	Negativní
15.	♂	43	<i>Leptospira</i> -	-	Negativní	Nd	Negativní	Negativní
16.	♀	35	<i>Leptospira</i> -	-	Negativní	Negativní	Negativní	Pozitivní
17.	♀	19	<i>Leptospira</i> -	-	Negativní	Negativní	Negativní	Pozitivní



Číslo pacienta v souboru	Pohlaví	Věk	Výsledky klinické a sérologické konfirmace	Další sérologicky prokázané infekce	Výsledek MAT patogenní leptospiry	Výsledek MAT <i>L. biflexa</i> Patoc	Výsledek ELISA IgM	Výsledek ELISA IgG
18.	♂	75	<i>Leptospira</i> -	-	Negativní	Negativní	Negativní	<b>Pozitivní</b>
19.	♀	50	<i>Leptospira</i> -	-	Negativní	Nd	Negativní	Negativní
20.	♀	54	<i>Leptospira</i> -	-	Negativní	Negativní	<b>Pozitivní</b>	Negativní
21	♂	25	<i>Tr. pallidum</i> +	-	Negativní	Negativní	Negativní	<b>Pozitivní</b>
22.	♂	28	<i>Tr. pallidum</i> +	-	Negativní	<b>Hraniční</b>	Negativní	<b>Pozitivní</b>
23	♂	45	<i>Tr. pallidum</i> +	-	Negativní	Nd	Negativní	Negativní
24.	♂	32	<i>Tr. pallidum</i> +	-	Negativní	Negativní	Negativní	<b>Pozitivní</b>
25.	♂	36	<i>Tr. pallidum</i> +	-	Negativní	Nd	Negativní	Negativní
26.	♂	82	<i>Borellia</i> +	-	Negativní	Negativní	Negativní	<b>Pozitivní</b>
27.	♂	45	<i>Borellia</i> +	-	Negativní	Negativní	Negativní	<b>Pozitivní</b>
28.	♀	40	<i>Borellia</i> +	-	Negativní	Negativní	Negativní	<b>Pozitivní</b>
29.	♂	66	<i>Borellia</i> +		Negativní	Negativní	Negativní	<b>Pozitivní</b>
30.	♂	48	<i>Borellia</i> +	KEG +	Negativní	Nd	Negativní	Negativní
31.	♀	41	<i>Borellia</i> +	-	Negativní	Nd	Negativní	Negativní
32.	♀	50	<i>Borellia</i> +	-	Negativní	Nd	Negativní	Negativní
33.	♂	44	<i>Borellia</i> +	-	Negativní	Hraniční	Negativní	<b>Pozitivní</b>
34.	♀	50	<i>Borellia</i> +	HAVG	Negativní	Negativní	Negativní	<b>Pozitivní</b>
35.	♀	66	<i>Borellia</i> +	-	Negativní	Negativní	Negativní	<b>Pozitivní</b>
36.	♂	61	CMV +, HSV +	VCAG, VZVG	Negativní	Nd	Negativní	Negativní

Číslo pacientav souboru	Pohlaví	Věk	Výsledky klinické a sérologické confirmace	Další sérologicky prokázané infekce	Výsledek MAT patogenní leptospiry	Výsledek MAT <i>L. biflexa</i> Patoc	Výsledek ELISA IgM	Výsledek ELISA IgG
37.	♀	59	RS +	-	Negativní	Nd	Negativní	Negativní
38.	♂	44	CMV +	Chlamydia +	Negativní	Nd	Negativní	Negativní
39.	♀	42	RS +	-	Negativní	<b>1 : 100</b>	<b>Pozitivní</b>	Negativní
40.	♀	35	CMV +	HSVg	Negativní	Nd	<b>Pozitivní</b>	Negativní
41.	♂	21	HSV+,	VZV+	Negativní	Nd	Negativní	Negativní
42.	♂	28	<i>Chlamydia</i> +	VCAG	Negativní	Nd	Negativní	Negativní
43.	♀	18	CMV +	VCAG	Negativní	Negativní	<b>Pozitivní</b>	Negativní
44.	♀	59	<i>Chlamydia</i> +	BBG	Negativní	Negativní	Negativní	<b>Pozitivní</b>
45.	♀	50	<i>Chlamydia</i> +	BBG	Negativní	Negativní	Negativní	<b>Pozitivní</b>

**Vysvětlivky:**

**BBG** - IgG protilátky proti borreliím

**CMV** - cytomegalovirus

**HAVG** - IgG protilátky proti viru hepatitidy A

**HBS Ab** - protilátky proti australskému antigenu

**HSVg** - IgG protilátky proti herpes simplex viru

**KEG** - IgG protilátky proti viru klíšťové encefalidity

**RS** - roztroušená skleróza

**VCAG**- IgG protilátky proti viru varicelly

**VZVG**- IgG protilátky proti varicella zoster viru

**Nd** - nevyšetřeno

## 5. DISKUZE

Leptospiroza je typická zoonóza s celosvětovou distribucí a stále se zvyšující incidencí jak v rozvojových, tak v průmyslově rozvinutých zemích. Každoročně je popisováno více než 500 000 případů těžké formy leptospirózy s více než 10% mortalitou. V odborných publikacích je uváděno, že na území ČR se incidence leptospirózy pohybuje v rozmezí 0,3 – 0,4/100 000 obyvatel, infekce na našem území je nejčastěji spojována s povodňovými stavy, volnočasovými aktivitami či méně často s profesionální nákazou.

V České republice se pro laboratorní diagnostiku leptospirózy standardně používá pouze metoda MAT. Toto vyšetření má od druhého týdne onemocnění, kdy již dochází k produkci specifických protilátek, vysokou diagnostickou senzitivitu a specificitu. Omezení metody můžeme spatřovat v náročnosti provedení a požadavku odečtu výsledků vyšetření zkušeným laboratorním pracovníkem. Největší nevýhodou této sérologické metody je skutečnost, že v prvním týdnu onemocnění nemůže být použita pro laboratorní diagnostiku leptospirózy.

Pro zamezení těžkých komplikací leptospirózy je důležité, aby infekční agens bylo determinováno co nejdříve a následně mohla být zahájena efektivní antibiotická terapie. Z tohoto důvodu je zapotřebí zabývat se rozvojem laboratorních diagnostických metod, které jsou schopné patogenní leptospiry detekovat již v akutní fázi onemocnění. Metoda PCR vykazuje v prvním týdnu vysokou specificitu a citlivost detekce, což důležité především na počátku infekčního procesu, kdy počet kopií genomu leptospir nemusí být v makroorganismu ještě vysoký. Během řešení dizertační práce se do rutinního klinického provozu laboratorní diagnostiky leptospirózy podařilo zavést rt PCR metodu detekce genu *lipL32*, která se stala důležitým diagnostickým prostředkem pro laboratorní diagnostiku akutní formy leptospirózy.

### **Rt PCR metoda detekující gen kódující povrchový lipoprotein LipL32**

V rámci zavádění rt PCR do klinického provozu jsme se zaměřili na stanovení základních charakteristik metody. Vypracovaná rt PCR metoda detekující gen kódující povrchový lipoprotein LipL32 je spolehlivá a rychlá metoda detekce přítomnosti DNA patogenních leptospir. Metoda se vyznačuje vysokou analytickou specificitou jak pozitivní (ověřena u 11 laboratorních kmenů patogenních leptospir vyskytujících se na území ČR), tak negativní (ověřena u *E. coli*, *Str. pneumoniae*, *B. burgdorferi*, CMV, *L. biflexa* Patoc Patoc I).

Stanovený detekční limit 1 – 5 kopií genomu/ml tekutého biologického materiálu svědčí o vysoké citlivosti metody, která je důležitá v klinickém využití při diagnostice akutní formy leptospirózy, kdy na začátku onemocnění nemusí být vzhledem k relativně dlouhé generační době leptospir ještě počet přítomných kopií DNA vysoký.

Všechny laboratorní kmeny získané z Royal Tropical Institute v Holandsku patogenních leptospir (n = 218; 94,8 %) byly určeny jako LipL32 pozitivní, nepatogenní (n = 7; 30,4 %) jako LipL32 negativní. Uvedená skutečnost svědčí o vysoké pozitivní a negativní analytické specifitě zavedené rt PCR metody, tedy o spolehlivosti detekce DNA patogenních leptospir.

Ve studii Bourhyho a kol. (2011) [31] byly testovány parametry čtyř kvantitativních rt PCR metod, jež detekovaly 3 různé cílové geny *lfb1*, *secY* a *lipL32* gen. Ve shodě s naší studií byly nejlepší výsledky detekce DNA patogenních leptospir získány při detekci genu *lipL32*. Obdobně jako v naší práci byl limit detekce stanoven na 1 kopii genomu/ml. Stejně jako v naší studii autoři u všech testovaných patogenních genomospecies (*L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. kmetyi*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. alexanderi* a *L. alstoni*) prokázali gen pro LipL32, u bakterií *B. burgdorferi*, *B. hermesii*, *E. coli*, *Treponema (T.) denticola*, *Plesiomonas shigelloides* jeho přítomnost prokázána nebyla.

Levett a kol. (2005) [139] ve studii stanovili obdobně jako my limit detekce rt PCR metody detekující gen *lipL32* pro krevní plazmu na 3 kopie genomu/ml, na rozdíl od naší práce byl limit detekce pro moč 10 kopií genomu/ml. Negativní analytická specifita byla ověřena pro *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bifidobacterium longum*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *B. burgdorferi*, *Brucella melitensis*, *Burkholderia cepacia*, *Campylobacter jejuni* (2 kmeny), *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis* (4 kmeny), *Enterococcus faecium* (3 kmeny), *E. coli*, *Helicobacter pylori* (2 kmeny), *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus plantarum*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria canis*, *Pasteurella multocida*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *St. aureus*, *Str. pneumoniae*, *Str. pyogenes*, *Str. sanguis*, *Candida albicans* (2 kmeny), *Candida dubliniensis* (2 kmeny), *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *T. denticola*, *T. pallidum* Nichols kmen, *T. phagedenis* a *T. refringens*. Negativní a pozitivní analytická specifita je stejně jako v naší práci rovna 100,0 %.

V odborné studii autorů Stoddard a kol. (2009) [87] byla mez PCR detekce stanovena u moči obdobně jako u nás na 1 kopii genomu/ml a u krve se však oproti naší studii

setkáváme s 10 kopiemi genomu/ml. Negativní analytická specificita byla determinována pro *Actinomyces naeslundii*, *Bartonella henselae*, *B. burgdorferi*, *Brucella melitensis*, *Burkholderia pseudomallei*, *Chaetomiumglobozum*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chromobacterium violaceum*, *Coxiella burnetii*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Francisella tularensis*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Rickettsia felis*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Salmonella enterica* sérovar Typhi, *T. pallidum*, *Yersinia pestis*, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Giardia lamblia*, *Leishmania donovani*, *Plasmodium vivax*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* a virus hepatitidy B a pozitivní analytická specificita pro všechny genomospecies patogenních leptospir. V obou případech byla souhlasně s naším výzkumem stanovena specificita rovná 100,0 %.

Z 295 pacientů suspektních na leptospirózu bylo jako LipL32 pozitivní vyhodnoceno 9 osob (3,1 %), od nichž pocházelo 15 pozitivních biologických materiálů (10× moč, 4× krevní plazma, 1× likvor). Všechny rt PCR pozitivní biologické materiály byly odebrány v prvním týdnu onemocnění, tedy v době, kdy ještě není vytvořen dostatečný titr specifických protilátek proti infekčnímu agens, a před zahájením účinné antibiotické terapie (chloramfenikol, tetracykliny, penicilinové preparáty) či maximálně do 24 h po její iniciaci. Leptospiry totiž rychle vytvoří s přítomnými protilátkami, pokud jsou v dostatečném titru, komplex antigen-protilátka, který je posléze degradován imunitním systémem. Ke stejné skutečnosti dochází účinkem antibiotického preparátu, leptospiry jsou jeho působením rychle degradovány a rovněž se stávají snadným terčem pro imunitní systém. V obou případech tak může být výsledek rt PCR falešně negativní.

Nově zavedená metoda má oproti předešlé PCR metodě (využívající B I, II a G1 a G2 primery) hned několik výhod, které spočívají hlavně v její rychlosti (výsledek vyšetření je dispozici již za 5 h), finanční náklady jsou podstatně nižší než u předešlé PCR metody (je používán pouze jeden set primerů a poloviční množství reagentů v porovnání s předchozí PCR metodou) a stanovený detekční limit 1 – 5 kopií genomu/ml tekutého biologického materiálu svědčí o vysoké citlivosti zavedené metody. Potencionální nevýhodou rt PCR metody je skutečnost, že výsledek vyšetření je pouze DNA patogenních leptospir ano-ne bez upřesňující informace o infikujícím genomospecies. Tento nedostatek však lze odstranit sekvenační reakcí.

Protože námi vypracovaná metoda rt PCR splňuje kritéria pro včasnou laboratorní diagnostiku akutní formy leptospirózy, použili jsme ji k porovnání výsledků vyšetření všech

pacientů s pozitivním PCR vyšetřením s osobami s kombinací MAT pozitivního a PCR negativního výsledku vyšetření. Podrobný rozbor 11 pacientů a biologických materiálů splňujících výše zmíněná kritéria je uveden v následujících odstavcích (viz. tab. 10).

Biologické materiály od pacientů č. 2, 3, 4, 5, 6 a 8 byly odebrány pro PCR vyšetření a MAT vyšetření ve stejný den či v intervalu maximálně 24 h. Tato skutečnost podporuje význam PCR metody pro laboratorní diagnostiku akutní formy leptospirózy, jelikož detekce protilátek u pacientů s pozitivním výsledkem vyšetření byla při použití MAT metodiky ve stejný čas negativní u 3 pacientů a hraniční také u stejného počtu osob. Sérologické laboratorní metody nemohly v daném okamžiku odhalit probíhající akutní formu leptospirózy u žádného z uvedených 6 pacientů.

U pacienta č. 7, u kterého byla prokázána PCR pozitivita v krevní plazmě a moči, byly biologické materiály odeslány na klinické pracoviště na MAT vyšetření po více než 2 měsících později. Výsledek MAT vyšetření byl hraniční, byl prokázán titr 1:200.

Abychom mohli zhodnotit přínos PCR metody pro diagnostiku akutní formy leptospirózy, byly také, jak je uvedeno v následujících odstavcích, posuzovány biologické materiály od pacientů s negativním výsledkem PCR detekce a sérologickou pozitivitou.

Příkladem falešně negativní PCR reakce vlivem antibiotické terapie je negativní výsledek vyšetření krevní plazmy a moče od pacienta č. 10. Po méně než 3 týdnech byl zaznamenán pozitivní výsledek MAT vyšetření – 1:400. U ošetřujícího lékaře byla ověřena skutečnost, že 2 dny před odebráním biologických materiálů pro PCR vyšetření, byla zahájena antibiotická terapie. Tento fakt může vysvětlovat negativní výsledek PCR vyšetření.

Biologické materiály od pacienta č. 11 (krevní plazma a moč) byly vyhodnoceny PCR metodou jako LipL32 negativní. Po méně než měsíci byl zaznamenán pozitivní výsledek MAT vyšetření u 3 laboratorních kmenů patogenních leptospir (nejvyšší titr 1:6400). Podle ošetřujícího lékaře nebyla u tohoto pacienta zahájena antibiotická terapie v době před odebráním biologických materiálů pro PCR vyšetření. Z tohoto důvodu jsme uvažovali o příčině negativního výsledku. Předpokládáme, že v krvi pacienta již byla dostatečná hladina protilátek, jež lyzovaly leptospiry a bakterie tedy nemohly být v krvi detekovány. Kolonizace renálních tubulů se začíná objevovat zpravidla po prvním týdnu klinických symptomů, tudíž lze v tomto období očekávat PCR pozitivitu moče. Negativní výsledek PCR vyšetření moče nás vedl k dalšímu pátrání na klinickém pracovišti a bylo odhaleno, že moč odebraná 23. září byla zpracována až 26. září.

Při zavádění a validaci rt PCR jsme zkoumali nepříznivý vliv délky a teploty skladování popř. transportu na výsledek vyšetření, aby bylo zamezeno degradaci DNA v nevhodném tekutém materiálu a následnému snížení sensitivity PCR. Vzorky moče zdravé osoby byly arteficiálně inokulovány 250 živými leptospirami/ml biologického materiálu a následně byla provedena PCR reakce. Vzorky byly uchovávány při chladničkové teplotě a opakovaně testovány každých 24 h. V moči uchovávané 24 a 48 h byla DNA patogenních leptospir prokázána, ve vzorku skladovaném více než 72 h byl výsledek detekce opakovaně negativní. PCR negativní moč pacienta č. 10 byla zpracována za více než 72 h, a proto lze předpokládat, že DNA patogenních leptospir byla v tomto agresivním prostředí, velmi často kontaminovaném dalšími bakteriemi, pravděpodobně již degradována.

Včasná diagnostika infekce způsobené patogenními leptospirami je důležitá především ze dvou důvodů: pro iniciaci efektivní antibiotické terapie a prevenci rozvoje těžkých komplikací leptospirózy – hepatorenálního, srdečního a respiračního selhání, aseptické meningitidy či hemoragické diatézy. V odborné literatuře je celosvětově popisován stále se zvyšující počet případů těžké formy leptospirózy – Weilovy choroby, s mortalitou převyšující 10 %.

Detekce přítomnosti DNA patogenních leptospir v krevní plazmě by u suspektních pacientů měla být realizována v prvním týdnu infekce, kdy v krvi pacienta ještě nejsou přítomny specifické protilátky, jež by mohly lyzovat leptospiry.

Od druhého týdne klinických symptomů je možné využít pro detekci DNA moč, avšak za podmínek, které zajišťují její rychlé zpracování a případně alespoň izolaci DNA. V případě meningeálních symptomů je vyšetřován likvor, protože leptospiry mají také vysokou afinitu k nervové tkáni.

S ohledem na dodržování standardů správné laboratorní praxe v preanalytické fázi vyšetření a prevence falešně negativních výsledků vyšetření by biologické materiály měly být odebrány před zahájením antibiotické terapie či maximálně do 24 h po její iniciaci. Leptospiry jsou citlivé k většině antibiotik, jsou rychle degradovány a likvidovány imunitním systémem. Výsledek vyšetření může být falešně negativní i v případě, že se u pacienta klinické příznaky leptospirózy stále rozvíjí.

Rt PCR metoda bylo využita pouze pro laboratorní diagnostiku akutní formy leptospirózy u suspektních pacientů, byla odzkoušena i při detekci DNA patogenních leptospir v povrchových vodách a vlhkých substrátech. Z celkového počtu 680 odebraných vzorků ze zevního prostředí (povrchové vody, vlhké substráty, ČOV) bylo 5 (0,7 %) reakcí vyhodnoceno jako hraniční, výsledek sekvenační analýzy byl opakovaně „nekultivovatelné

bakterie“. Všechny vzorky byly tedy vyhodnoceny jako negativní. Z uvedené skutečnosti je zcela zřejmé, že metoda není vhodná pro testování takto náročných materiálů – vzorky vod a zeminy obsahují patrně velké množství DNA rozličných druhů mikroorganismů ze zevního prostředí, a pokud byly patogenní leptospiry přítomné pouze v limitním množství, patrně je nebylo možné detekovat.

### **MLST analýza**

Pro přesnou identifikaci 11 laboratorních kmenů patogenních leptospir vyskytujících se na území ČR, jež jsou řazeny do 3 genomospecies (*L. interrogans*, *L. kirschneri* a *L. borgpetersenii*), byla použita metoda MLST dle autorů Ahmed a kol. (2011). Princip této MLST analýzy spočíval v prvotní izolaci DNA a následné detekci 5 genů: *adk*, *icdA*, *rrs2*, *lipl41* a *lipl32*. Bylo zjištěno, že gen *adk* umožňuje pouze detekci DNA genomospecies *L. interrogans*, gen *icdA* detekci *L. interrogans* a *L. kirschneri*, zbývající tři geny (*lipl41*, *rrs2* a *lipl32*) umožňují detekci všech 3 genomospecies v ČR (viz tab. 12)

Produkty PCR 11 laboratorních kmenů byly po purifikaci následně podrobeny sekvenačním reakcím. Po přečištění sekvenačních produktů byla provedena kapilární elektroforéza za účelem získání specifického elektroforegramu k identifikaci pořadí nukleotidů v DNA patogenních leptospir. Výsledkem je vytvoření knihovny referenčních sekvencí pro určení neznámého sérovaru (kmene) patogenních leptospir vyskytujících se v ČR.

V naší studii se nepodařilo odhalit sekvenci nukleotidů specifickou pro Weilovu chorobu a tímto ji jednoznačně odlišit od jiných druhů leptospiroz (polní horečka, nemoc pasáků vepřů, horečka rýžových polí). Jedním z důvodů může být volba nevhodných cílových genů. V dalším období bychom se chtěli zaměřit na detekci a sekvenaci genů *pntA*, *sucA*, *pfkB*, *tpiA*, *mreA*, *glmU* and *fadD*, jež jsou popsány v odborné publikaci autorů Thaipadungpanit a kol. (2007) [142]. Domníváme se, že vyšší počet cílových genů zvýší možnost odhalení požadované sekvence DNA patogenních leptospir typické pro Weilovu chorobu.

### **Výskyt leptospirozy na části území ČR v letech 2002 – 2013**

Z celkového počtu 5840 pacientů suspektních na leptospirozu bylo pozitivních 101 osob (1,7 %), onemocnění převažovalo u mužů (70,3 %), průměrný věk obojího pohlaví se významně nelišil. Ve shodě s většinou odborných publikací zaměřených na epidemiologickou charakteristiku souboru pacientů s leptospirozou jsme došli k závěru, že



infekce patogenními leptospirami se vyskytuje častěji u mužů než u žen - 71 mužů (70,3 %) a 30 žen (29,7 %). V pracích autorů Nardone a kol. (2004) [15], Covič a kol.(2003) [8], Perič a kol. (2005) [2] a Esen a kol. (2004) [92] tvořili analyzovaný soubor pacientů s leptospirózou muži v 93,0 %, 91,4 %, 85,0 %, resp. v 81,9 %. V literatuře je tento fenomén vysvětlován tím, že muži jsou při výkonu povolání a vzhledem k jeho druhu vystaveni vyššími riziku expozice patogenním leptospirám než ženy.

V naší studii jsme zjistili skutečnost, že nejvíce pacientů (jak mužů, tak žen) s laboratorně potvrzenou diagnózou leptospiróza bylo ve věku mezi 26 - 45 lety. Tento jev si vysvětlujeme tím, že tato věková skupina lidí je nejvíce fyzicky aktivní a přichází do kontaktu s rizikovými faktory.

V roce 2002 (n = 21, ;20,8 %) a 2005 (n = 25; 24,8 %) jsme zaznamenali nejvíce leptospira-pozitivních osob. Roku 2002 zasáhly území celé ČR rozsáhlé povodně, v roce 2005 byly popisovány lokální povodně v Pardubickém a Královéhradeckém kraji.

Nejvyšší počet pozitivních pacientů byl zaznamenán v listopadu. V ČR je popisována výrazná sezónnost leptospirózy s nejvyšším počtem případů v období od června do října a maximem výskytu v srpnu [16]. V předkládané studii byl zaznamenán nejvyšší počet pozitivních osob v měsíci listopadu, kdy obvykle kulminuje počet hlodavců. Domníváme se, že člověk přichází do kontaktu s patogenními leptospirami nejen v přírodě a ve vodě, ale také např. při podzimním úklidu sklepů, při práci v zemědělství, kdy lze předpokládat kontaminaci vlhkých substrátů močí hlodavců. Tomu odpovídají naše zjištění. Např. v anamnestických údajích 2 pacientů byl uveden úklid sklepa a úklid po lokálních povodních. Ve 28 případech jsme dotazováním zjistili časově delší kontakt s přírodní vodou (vodácký kurz, lovení ryb v Norsku, pobyt na Balkáně, pád do řeky, pád do lesní tůně, pití vody ze studánky, jeden pacient uváděl, že se při práci v potoce poranil o hřebík a současně viděl v potoce potkany) apod. Častým anamnestickým údajem byl rovněž pobyt v přírodě bez přímého kontaktu s vodou, část dotazovaných uváděla také kontakt s hlodavci a jinými zvířaty při práci v zemědělství, úklidu po lokálních záplavách a podobně.

Jak je patrné z tab. 13, incidence leptospirózy v Pardubickém a Královéhradeckém kraji v letech 2002 - 2013 (kromě roku 2008, 2011, 2012 a 2013) každoročně převyšuje všeobecně uváděnou hodnotu 0,4/100 000 obyvatel, v roce 2005 více než pětinašobně. Uvedenou skutečnost si vysvětlujeme tím, že mezi infektionisty v uvedených krajích panuje velmi dobré povědomí o výskytu leptospirózy, a proto toto infekční onemocnění často

zahrnují do primární diferenciální diagnostiky. Nemalou částí k těmto výsledkům přispívá i fakt, že zavedená metodika průkazu DNA patogenních leptospir odhalí původce infekce již v prvním týdnu onemocnění, kdy by ještě výsledek sérologického vyšetření mohl být negativní.

V práci jsme prokázali, že mezi nejčastěji detekované sérovary patogenních leptospir v Pardubickém a Královéhradeckém kraji patří *L. grippotyphosa* (n = 41; 42,3 %), *L. icterohaemorrhagiae* nebo *L. copenhageni copenhageni* (n = 27; 27,8 %). Ve studii Esena a kol. (2004) autoři zjistili, že v Turecku nejčastěji byl u 43 pacientů s laboratorně potvrzenou leptospirózou diagnostikován sérovar *L. icterohaemorrhagiae* (n = 13; 30,2 %), *L. grippotyphosa* (n = 5; 11,6 %) a *L. bratislava* (n = 5; 11,6 %). Chorvatští autoři Perič a kol. (2005) popisují v retrospektivní studii v letech 1969 – 2003 ve východním Chorvatsku, že mezi nejčastěji detekované sérovary patogenních leptospir patřily *L. sejroe*, *L. pomona*, *L. autumnalis* a *L. icterohaemorrhagiae*. Ve sdělení Levett a kol. (2003) autoři u 105 pacientů s potvrzenou leptospirózou na Barbadosu diagnostikovali nejčastěji séroskupinu Australis (n = 43 pacientů; 41,0 %), *Icterohaemorrhagiae* (n = 26; 24,8 %) a Ballum (n = 14; 13,3 %).

Definitivní určení infikujícího sérovaru je důležité nejen z hlediska klinického, ale také z hlediska epidemiologického. Hygienická služba může na základě laboratorních výsledků provést účinná opatření k ochraně obyvatelstva, aby se zamezilo dalšímu šíření infekce. Mezi uvedená opatření patří deratizace či užívání protektivních pomůcek při práci v rizikových oblastech.

### **MAT a ELISA - konfirmace výsledků PCR analýzy**

V ČR se při sérologickém průkazu infekce patogenními leptospirami používá metoda MAT detekující v krvi pacienta protilátky proti jednotlivým 11 laboratorním kmenům patogenních leptospir. V naší studii jsme se zaměřili na otestování diagnostické senzitivity a specifity metody MAT a ELISA, abychom si ověřili skutečnost, že uvedené laboratorní metody budeme pomoci použít ke konfirmaci výsledků rt PCR vyšetření.

Jak bylo prokázáno, MAT má 100,0% diagnostickou senzitivitu i specifitu. Limitem tohoto sérologického vyšetření je však skutečnost, že protilátky proti patogenním leptospirám jsou v krvi pacienta detekovatelné až od druhého týdne onemocnění. Do této doby může být výsledek vyšetření falešně negativní, a proto se doporučuje provést vyšetření

mikroaglutinačním testem znovu s časovým odstupem dvou týdnů, kdy by již měly být specifické protilátky v krvi pacienta prokazatelné. Nutné je však přihlížet, zda mezitím nebyla zahájena ATB terapie.

Analyzované diagnostické soupravy SERION ELISA *classic Leptospira* IgM/IgG vykazovaly diagnostickou senzitivitu 100,0 %. Diagnostická specificita soupravy pro detekci IgM protilátek činila 88,6 % a soupravy pro detekci IgG protilátek 54,3 %. Vzhledem ke skutečnosti, že u souprav SERION ELISA *classic Leptospira* IgM byly zaznamenány celkem 4 falešně pozitivní reakce a u soupravy SERION ELISA *Leptospira classic* IgG falešně pozitivních reakcí celkem 16, nelze považovat tyto diagnostické kity za vhodné a především za spolehlivé pro rutinní diagnostiku leptospirózy zejména ve třídě IgG. Diagnostická specificity soupravy vhodné pro použití v rutinním provozu by měla převyšovat hodnotu 95,0 %. Z uvedených skutečností vyplývá, že diagnostická specificita je nedostatečná. ELISA soupravu považujeme z tohoto hlediska za nevhodnou pro diagnostiku akutní formy leptospirózy, ani jako konfirmační metodu výsledků zavedené rt PCR metody detekující gen pro povrchový lipoprotein LipL32.

Diagnostická senzitivita soupravy SERION ELISA *classic Leptospira* IgM vychází ve shodě s námi ve studii Honarmanda a kol (2010) [19] a Panwala a kol. (2011) [100] 100,0 % resp. 96,2 %. Effler a kol. (2002) [143] však zaznamenali diagnostickou senzitivitou pouhých 43,0 %. Naproti tomu Panwala a kol (2011) [100] souhlasně s námi došli k téměř identické hodnotě diagnostické specificity výše uvedené soupravy 88,1 %. Vzhledem ke skutečnosti, že většina autorů se zabývala detekcí specifických IgM protilátek, existuje pouze limitovaný počet publikací, ve kterých byly určeny hodnoty diagnostické senzitivity a specificity soupravy SERION ELISA *classic Leptospira* IgG. Ve studii Honarmanda a kol. (2010) byla diagnostická senzitivita a specificita soupravy detekující IgG rovna 84,0 % resp. 77,0 % (v naší studii 100,0 % resp. 54,3 %). Na druhou stranu, jak je patrné z tab. 19, testovaná ELISA souprava vykazovala vysokou NPV, kromě studie Efflera a kol. se pohybovala v rozmezí 94,0 – 100,0 % [143]. Zmíněný fakt je z diagnostického hlediska velice důležitý pro vyloučení infekce způsobené patogenními leptospirami. Konfirmace našich výsledků s ostatními autory je uvedena v tab. 19.

**Tab. 19** Porovnání výsledků diagnostické senzitivity, specifity, PPV, NPV soupravy SERION ELISA classic IgM/IgG s dalšími studii

Výsledky	Kučerová a kol. (2011) [99]		Honarmand a kol. (2010) [19]		Panwala a kol. (2011) [100]	Effler a kol. (2002) [143]
	IgM (%)	IgG (%)	IgM (%)	IgG (%)	IgM (%)	IgM (%)
<b>Senzitivita</b>	100,0	100,0	100	84,0	96,2	43,0
<b>Specifita</b>	88,6	54,3	43,0	77,0	88,1	98,0
<b>PPV</b>	71,4	38,5	37,0	55,0	88,4	86,0
<b>NPV</b>	100,0	100,0	100,0	94,0	96,7	85,0

V těchto čtyřech studiích byly použity rozdílné sady leptospirových antigenů. Ve všech sděleních byly testovány sérovary *L. canicola*, *L. grippityphosa* a *L. icterohaemorrhagiae*. V našem odborném sdělení (2011) [99] jsme jak ve třídě IgM, tak v IgG prokázali diagnostickou senzitivitu 100,0 %, dále byly ve studii použity sérovary *L. copenhageni*, *L. sejroae*, *L. istrice*, *L. bratislava*, *L. pomona*, *L. polonica* a *L. sorex - jalna*. V práci Efflera a kol (2002) [143] byla ve třídě IgM diagnostikována pouze 43,0% diagnostická senzitivita a dále byly vyšetřeny i sérovary *L. ballum*, *L. bataviae*, *L. pyogenes*, *L. autumnalis*, *L. pomona*, *L. wolfii*, *L. australis* a *L. minigeorgia*. Zajímavou skutečností je fakt, že při použití stejného spektra antigenů tito autoři publikovali nejvyšší hodnotu diagnostické specifity (98,0 %) ze všech čtyřech studií. Nejnižší hodnoty diagnostické specifity (43,0 %) bylo dosaženo ve sdělení Honarmanda a kol (2010) [19], ve kterém byly použity i sérovary *L. austrais*, *L. autumnalis*, *L. castellanis*, *L. bataviae*, *L. cynopteri*, *L. hebdomadis*, *L. copenhageni*, *L. javaniica*, *L. pomona*, *L. hardjo*, *L. sejroae*, *L. wolfii* a *L. tarrasovi*. Z této skutečnosti vyplývá, že spektrum a kvantita použitých antigenů mohou významně ovlivnit výslednou hodnotu diagnostické senzitivity a specifity.

Je zapotřebí také respektovat skutečnost, že soupravy SERION ELISA classic *Leptospira* IgM/IgG jsou dle sdělení výrobce založeny na průkazu rodově specifických protilátek proti celobuněčnému antigenu nepatogenní *L. biflexa*, neboť při velkém množství sérovarů patogenních leptospir je obtížné připravit soupravy zahrnující široké spektrum antigenů [38,100,144]. Nepatogenní *L. biflexa* je podle našich předchozích zkušeností s testováním studniční vody patrně na území ČR dosti rozšířená a lze předpokládat, že část populace má protilátky i proti tomuto sérovaru. Ve studii Čermákové a kol (2004) [145] byla

testována séra od 90 pacientů s klinicky potvrzenou boreliózou a byla ověřena přítomnost četných falešně pozitivních reakcí u osob s diagnózou RS, CMV, Epstein-Barr viru, herpetických virů, revmatické artritidy a dalšími. Zkřížené reakce mezi spirochétami jsou v sérologických testech obecně známé, stejně tak výše uvedené falešně pozitivní reakce. Otázkou je, jestli může být takto postavená souprava přínosem pro laboratorní diagnostiku.

Detekce specifických protilátek proti patogenním leptospirám metodou MAT je zlatým standardem diagnostiky onemocnění, který se používá ve většině specializovaných klinických pracovišt'. Je zapotřebí zdůraznit skutečnost, že v celosvětovém měřítku dochází k nárůstu počtu případů těžké formy leptospirózy, v mnoha případech s velmi rychlou progresí onemocnění [33]. Abychom zabránili rozvoji těžkých komplikací tohoto infekčního onemocnění je nezbytné, aby antibiotická terapie byla zahájena co nejdříve [52,146]. Vzhledem ke skutečnosti, že protilátky proti patogenním leptospirám jsou ve většině případů detekovatelné metodou MAT od druhého týdne onemocnění, můžeme polemizovat o tom, zda-li je sérologická diagnostika vhodnou metodou pro průkaz akutní formy leptospirózy [25,52]. Přikláníme se k názoru většiny autorů, kteří považují za nejlepší metodu diagnostiky leptospirózy v prvním týdnu onemocnění identifikaci DNA PCR [24,25,29,147]. Musí být samozřejmě dodržena doporučená pravidla pro odběr biologického materiálu. Detekce přítomnosti DNA patogenních leptospir by měla být provedena v prvním týdnu onemocnění, kdy ještě nedochází k tvorbě specifických protilátek. Je nezbytné, aby biologický materiál byl odebrán před zahájením účinné antibiotické terapie (peniciliny, tetracykliny, chloramfenikol a další). Leptospiry jsou k antibiotikům vysoce citlivé, rychle se rozpadají a jsou následně likvidovány imunitním systémem. Výsledek průkazu DNA metodou PCR může být po 24 - 48 h od započetí účinné antibiotické terapie negativní a z klinického hlediska tedy falešně negativní.

## 6. ZÁVĚR

V ČR je v laboratorní diagnostice leptospirózy používána pouze sérologická metoda mikroaglutinačního testu, která má však v prvním týdnu onemocnění nízkou diagnostickou senzitivitu. Z tohoto důvodu jsme se v předkládané dizertační práci zaměřili na zavedení molekulárně biologických metod do klinického provozu, abychom byli schopni diagnostikovat infekci vyvolanou patogenními leptospirami již v akutní fázi onemocnění. V současné době jsme v ČR jediným pracovištěm, které k diagnostice leptospirózy používá rt PCR metodu. Dále jsme se zaměřili na stanovení vhodné metody pro confirmaci výsledků PCR vyšetření, kromě metody MAT byla testována i ELISA souprava pro detekci protilátek proti leptospirám, jež žádné pracoviště v ČR v laboratorní diagnostice této infekce nepoužívá. V neposlední řadě jsme se pokusili o vyhodnocení rizikovosti několika okresů ČR s ohledem na možnou infekci patogenní leptospirami především z důvodu, že dlouhodobě nejsou k dispozici aktuální informace o incidenci leptospirózy. V následujících odstavcích jsou zmíněny výsledky všech stanovených cílů této dizertační práce.

### **a) Zavést do klinického provozu vhodnou PCR metodu pro laboratorní diagnostiku akutní formy leptospirózy.**

Byla navržena a vypracována rt PCR metoda detekce genu kódujícího povrchový lipoprotein LipL32, který je typický pro patogenní leptospiry. Metoda vyniká vysokou pozitivní i negativní analytickou specificitou, obě hodnoty jsou rovny 100,0 %. Metoda byla ověřena na 230 laboratorních kmenech leptospir, jež byly získány z Royal Tropical Institute v Holandsku. Mez detekce byla stanovena na 1 – 5 kopií genomu/ml tekutého biologického materiálu. Jednou z největších výhod je skutečnost, že výsledek vyšetření je k dispozici do 5 h, což může mít zásadní vliv za další vývoj infekce způsobené patogenními leptospirami. Z 295 pacientů suspektních na leptospirózu vyšetřených o období duben 2010 – duben 2013 bylo jako LipL32 pozitivní vyhodnoceno 9 (3,1 %) osob, od nichž pocházelo 15 pozitivních biologických materiálů. Pro laboratorní diagnostiku akutní formy leptospirózy je esenciální, aby byly biologické materiály odebrány v prvním týdnu onemocnění a před zahájením antibiotické terapie.

### **b) Určit vhodnou metodiku pro sekvenaci DNA patogenních leptospir a pokusit se vyhledat sekvenci typickou pro Weilovu chorobu a tímto ji odlišit od jiných typů leptospirózy**

Byla navržena metodika MLST analýzy detekující 5 genů ( *adk*, *icdA*, *rrs2*, *lipI41* a *lipI32* gen) pro vytvoření knihovny DNA sekvencí 11 laboratorních kmenů patogenních leptospir izolovaných na území ČR. Amplifikované cílové geny byly následně podrobeny sekvenační analýze. Pomocí této knihovny mohlo být následně určeno, o jaký sérovar patogenních leptospir se jednalo u suspektního pacienta. Touto MLST analýzou jsme však nebyli schopni determinovat sekvenci DNA typickou pro Weilovu chorobu, pravděpodobně z důvodu volby nevhodných cílových genů.

### **c) Modifikace PCR metodiky pro detekci patogenních leptospir ve vzorcích ze zevního prostředí**

Z celkového počtu 680 provedených vyšetření bylo 5 (0,7 %) reakcí vyhodnoceno jako hraniční, výsledek sekvenační analýzy byl opakovaně „nekultivovatelné bakterie“. Všechny vzorky byly vyhodnoceny jako negativní. Z uvedené skutečnosti je zcela zřejmé, že metoda není vhodná pro testování takto náročných materiálů – vzorky vod a zeminy obsahují patrně velké množství DNA rozličných druhů mikroorganismů ze zevního prostředí, a pokud byly patogenní leptospiry přítomné pouze v limitním množství, patrně je nebylo možné detekovat.

### **d) Epidemiologické šetření výskytu leptospirózy v Královéhradeckém, Pardubickém kraji a části kraje Vysočina v letech 2002 - 2013**

Z celkového počtu 5840 pacientů suspektních na leptospirózu bylo jako pozitivní vyhodnoceno 101 (1,7 %). Onemocnění bylo diagnostikováno u 71 mužů (70,3 %) a 30 žen (29,7 %). Nejvíce pozitivních pacientů - mužů (n = 34; 47,9 %) bylo ve věkovém rozmezí 26 - 45 let, u žen (n = 12; 40,0 %) se dostáváme k obdobným závěrům. Největší počet leptospira-pozitivních osob byl zaznamenán v roce 2002 (n = 21; 20,8 %) a 2005 (n = 25; 24,8 %), incidence leptospirózy v těchto letech činila 1,83 a 2,17/100 000 obyvatel. V roce 2002 zasáhly území celé ČR rozsáhlé povodně, v roce 2005 jsme si dotazem v Českém hydrometeorologickém ústavu ověřili, že v Pardubickém a Královéhradeckém byly popisovány lokální povodně. Nejvyšší počet pozitivních pacientů byl zaznamenán v listopadu (n = 20; 19,8 %). Nejfrekventovanějším infikujícím typem byl v naší studii sérovar *L. grippityphosa* (n = 41; 42,3 %).

### **e) Stanovení diagnostické specificity a senzitivity MAT a Serion ELISA classic *Leptospira* IgM/IgG - confirmace výsledků pCR vyšetření**

Z celkového množství 1553 příslušníků AČR vyšetřených ELISA metodou na přítomnost protilátek proti leptospirám bylo jako IgM pozitivní určeno 292 (18,8 %) osob, jako IgG pozitivní 392 (25,5 %) příslušníků AČR. Všechna pozitivní krevní séra od příslušníků AČR byla konfirmačně vyšetřena s 11 laboratorními kmeny patogenních leptospir používanými v ČR při metodě MAT a nepatogenní *L. biflexa*. Naprostá většina krevních sér confirmovaných výše uvedenými laboratorními kmeny leptospir byla vyhodnocena metodou MAT jako negativní, včetně nepatogenní *L. biflexa*. U 26 krevních sér byla zaznamenána slabá reakce v titrech 1:50 – 1:200 s laboratorními kmeny *L. grippotyphosa* P125 (n = 8; 30,8 %), *L. grippotyphosa* Ž6 (n = 7; 26,9 %), *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava (n = 3; 11,5 %), *L. sorex – jalna* Sorexjalna (n = 3; 11,5 %), *L. copenhageni* Lebe (n = 2; 7,6 %) *L. istriica* J20 (n = 1; 3,9 %), *L. bratislava* Jež Bratislava (n = 1; 3,9 %), *L. canicola* S392 (n = 1; 3,9 %).

V naší studii bylo prokázáno, že metoda MAT má 100,0% diagnostickou senzitivitu i specificitu. Analyzované diagnostické soupravy SERION ELISA classic *Leptospira* IgM/IgG vykazovaly shodně diagnostickou senzitivitu 100,0 %. Diagnostická specificita soupravy pro detekci IgM protilátek činila 88,6 % a soupravy pro detekci IgG protilátek 54,3 %. Diagnostická senzitivita soupravy vhodné pro použití v rutinním provozu by měla převyšovat hodnotu 95,0 %. Z tohoto důvodu jednoznačně doporučujeme ke confirmaci výsledků rt PCR vyšetření MAT metodu.



## 7. LITERATURA

1. Abgueguen, P., Delbos, V., Blanvillain, J., Chennebault, J.M., Cottin, J., Fanello, S. a kol. Clinical Aspects and Prognostic Factors of Leptospirosis in Adults. Retrospective Study in France. *The Journal of Infection*, 2008, vol. 57, no. 3, s. 171 - 178.
2. Perić, L., Simasek, D., Barbić, J., Perić, N. Prus, V., Sisljagić, V. a kol. Human Leptospirosis in Eastern Croatia, 1969-2003: Epidemiological, Clinical, and Serological Features. *Scandinavian Journal of Infection Diseases*, 2005, vol. 37, no. 10, s. 738 - 741.
3. Koizumi, N., Muto, M., Yamamoto, S., Baba, J., Kudo, M., Tamae, Y. a kol. Investigation of Reservoir Animals of *Leptospira* in the Northern Part of Miyazaki Prefecture. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2008, vol. 61, no. 6, s. 465 – 468.
4. Ganoza, C.A., Matthias, M.A., Collins-Richard, D., Brouwer, K.C., Cunningham, C.B., Segura, E.R. a kol. Determining Risk for Severe Leptospirosis by Molecular Analysis of Environmental Surface Waters for Pathogenic *Leptospira*. *Public Library of Science Medicine*, 2006, vol. 3, no. 8, s. e308.
5. Pappas, G., Papadimitriou, P., Siozopoulou, V., Christou, L., Akritidis, N. The Globalization of Leptospirosis: Worldwide Incidence Trends. *International Journal of Infectious Diseases*, 2008, vol. 12, no. 4, s. 351 - 357.
6. Adler, B., de la Peña Moctezuma, A. *Leptospira* and Leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 2010, vol. 140, no. 3 - 4, s. 287 - 296.
7. Bharti, A.R., Nally, J.E., Ricaldi, J.N., Matthias, M.A., Diaz, M.M., Lovett, M.A. a kol. Leptospirosis: a Zoonotic Disease of Global Importance. *The Lancet Infectious Diseases*, 2003, vol. 3, no. 12, s. 757 – 771.
8. Covic, A., Goldsmith, D.J., Gusbeth-Tatomir, P., Seica, A., Covic, M. A Retrospective 5-year Study in Moldova of Acute Renal Failure Due to Leptospirosis: 58 Cases and a Review of the Literature. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 2003, vol. 18, no. 6, s. 1128 – 1134.
9. Croda, J., Ramos, J.G., Matsunaga, J., Queiroz, A., Homma, A., Riley, L.W. a kol. *Leptospira* Immunoglobulin-Like Proteins as a Serodiagnostic Marker for Acute Leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, vol. 45, no. 5, s. 1528 – 1534.

10. Evangelista, K.V., Coburn, J. *Leptospira* as an Emerging Pathogen: A Review of its Biology, Pathogenesis and Host Immune Responses. *Future Microbiology*, 2010, vol. 5, no. 9, s. 1413 – 1425.
11. Vital-Brazil, J.M., Balassiano, I.T., Oliveira, F.S., Costa, A.D., Hillen, L., Pereira, M.M. Multiplex PCR-based Detection of *Leptospira* in Environmental Water Samples Obtained from a Slum Settlement. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2010, vol.105, no.3 , s.353 - 355.
12. Dey, S., Mohan, C.M., Ramadass, P., Nachimuthu, K. Diagnosis of Leptospirosis by Recombinant Antigen Based Single Serum Dilution ELISA. *The Indian Journal of Medical Research*, 2008, vol. 128, no. 2, s. 172 - 177.
13. Medeiros, Fda., R., Spichler, A., Athanazio, D.A. Leptospirosis-associated disturbances of blood vessels, lungs and hemostasis. *Acta Tropica*, 2010, vol. 115, no. 1 -2, s. 155 – 162.
14. Roczek, A., Forster, C., Raschel, H., Hörmansdorfer, S., Bogner, K.H., Hafner-Marx, A., Lepper, H. a kol. Severe course of rat bite-associated Weil's disease in a patient diagnosed with a new *Leptospira*-specific real-time quantitative LUX-PCR. *Journal of Medical Microbiology*, 2008, vol. 57, no. Pt5, s. 658 – 663.
15. Nardone, A., Capek, I., Baranton, G., Campése, C., Postic, D., Vaillant, V. a kol. Risk Factors for Leptospirosis in Metropolitan France: Results of a National Case-Control Study, 1999–2000. *Clinical Infectious Diseases*, 2004, vol. 39, no. 5, s. 751 – 753.
16. Smetana, J., Čermáková, Z., Boščíková, V., Kučerová, P., Prášil, P., Pavliš, O. a kol. Leptospiróza v České republice a možnosti laboratorní diagnostiky. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie*, 2010, vol. 59, no. 4, s. 159 – 167.
17. Plank, R., Dean, D. Overview of the Epidemiology, Microbiology, and Pathogenesis of *Leptospira* spp.in Humans. *Microbes and Infection*, 2000, vol. 2, no. 10, s. 1265 - 1276.
18. Bhardwaj, R. Leptospirosis - a Reemerging Disease? *The Indian Journal of Medical Research*, 2004, vol. 120, no. 3, s. 136 - 138.
19. Honarmand, H.R., Abdollahpour, G., Eshraghi, S.S. Comparison of Two ELISA Methods for the Laboratory Diagnosis of Acute Leptospirosis. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 2010, vol. 35, no. 2, s. 116 - 121.

20. Levett, P.N. Leptospirosis: A Forgotten Zoonosis? *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 2004, vol. 4, no .6, s. 435 – 448.
21. Gaynor, K., Katz, A.R., Park, S.Y., Nakata, M., Clark, T.A., Effler, P.V. Leptospirosis on Oahu: an Outbreak Associated with Flooding of a University campus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2007, vol. 76, no. 5, s. 882 – 885.
22. Sambasiva, R.R., Naveen, G., Bhalla, P., Agerwal, S.K. Leptospirosis in India and the Rest of the World. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2003, vol. 7, no. 3, s. 178 - 193.
23. Méndez-Vilas A. a kol. Leptospirosis: an Important Zoonotic Disease. In: *Current Research, Technology, and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, vol. 2. 2010. Badajoz : Formatex Research Center. ISBN (13): 978-84-614-6195-0.
24. Nizamuddin, M., Tuteja, U., Shukla, J., Nair, L., Sudarsana, J. Early Diagnosis of Human Leptospirosis by Antigen Detection in Blood. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2006, vol. 24, no. 4, s. 342 - 345.
25. Sugathan, S., Varghese, T.P. Multiplex PCR on Leptospiral Isolates from Kolenchery, Kerala, India. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2005, vol. 23, no. 2, s. 114 – 116.
26. Ahmed, A., Engelberts, M.F., Boer, K.R., Ahmed, N., Hartskeerl, R.A. Development and Validation of a Real-Time PCR for Detection of Pathogenic *Leptospira* Species in Clinical Materials. *Public Library of Science ONE*, 2009, Vol. 4, no. 9, s. e7093.
27. Kositanont, U., Rugsasuk, S., Leelaporn, A., Phulsuksombati, D., Tantitanawat, S., Naigowit, P. Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2007, vol. 57, no. 2, s. 117 – 122.
28. Shekatkar, S.B., Harish, B.N., Menezes, G.A., Parija, S.C. Clinical and serological evaluation of leptospirosis in Puducherry, India. *Journal of infection in developing countries*, 2010, vol. 4, no. 3, s. 139 – 143.
29. Vasconcellos, F.A., Coutinho, M.L., da Silva, E.F., Fernandes, C.P., Monte, L.G., Seyffert, N. a kol. Testing different antigen capture ELISA formats for detection of

*Leptospira* spp. in human blood serum. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2010, vol. 104, no. 4, s. 259 – 264.

30. Vijayachari, P., Sehgal S.C. Recent advances in the laboratory diagnosis of leptospirosis and characterisation of leptospire. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2006, vol. 24, no. 4, s. 320 - 322.

31. Bourhy, P., Bremont, S., Zinini, F., Giry, C., Picardeau, M. Comparison of Real-Time PCR Assays for Detection of Pathogenic *Leptospira* spp. in Blood and Identification of Variations in Target Sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, vol. 49, no. 6, s. 2154 – 2160.

32. Flannery, B., Costa, D., Carvalho, F.P., Guerreiro, H., Matsunaga, J, Da Silva, E.D. a kol. Evaluation of Recombinant *Leptospira* Antigen-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Serodiagnosis of Leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, vol. 39, no. 9, s. 3303 – 3310.

33. Xue, F., Yan, J., Picardeau, M. Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: Lessons Learned from Genomes. *Microbes and Infection.*, 2009, vol. 11, no. 10, s. 328 - 333.

34. Croda, J., Figueira, C.P., Wunder, E.A. Jr., Santos, C.S., Reis, M.G., Ko, A.I. a kol. Targeted Mutagenesis in Pathogenic *Leptospira* Species: Disruption of the LigB Gene Does Not Affect Virulence in Animal Models of Leptospirosis. *Infection and Immunity*, 2008, vol. 76, no. 12, s. 5826 – 5833.

35. Topic, M.B. , Habus, J., Milas, Z., Tosev, E.C., Stritof, Z., Turk, N. Human leptospirosis in Croatia: current status of epidemiology and clinical characteristics. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2010, vol. 104, no. 3, s. 202 – 206.

36. Levett, P.N. Leptospirosis. *Clinical microbiology reviews*, 2001, vol. 14, no. 2, s. 296 - 326.

37. Adler, B., Faine, S. The Genus *Leptospira*. *Prokaryotes*, 2006, vol. 7, s. 294 – 317.

38. Vinetz, J.M. Leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2001, vol. 14, s. 527 – 538.

39. Cinco, M., Perticarari, S., Esani, G., Obrina, A., Louit, F. Biological activity of a peptidoglycan extracted from *Leptospira interrogans* : *in vitro* studies. *Journal of General Microbiology* , 1993, vol. 139, s. 2959 - 2964.
40. Cinco, M., Vecile, E., Murgia, R., Dobrima, P., Dobrina, A. *Leptospira interrogans* and *Leptospira* peptidoglycans induce the release of tumor necrosis factor a from human monocytes. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, vol. 138, no. 2 - 3, s. 211 – 214.
41. Brenot, A., Trott, D., Saint Girons, I., Zuerner, R. Penicillin-binding proteins in *Leptospira interrogans*. *Antimicrobials and Agents Chemotherapeutics*. 2001, vol. 45, no. 3, s. 870 – 877.
42. Picardeau, M., Brenot, A., SaintGirons, I. First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* flaB results in non-motile mutants deficient in endoflagella. *Molecular Microbiology* , 2001, vol. 40, no. 1, s. 189 – 199.
43. Lin, M., Surujballi, O., Nielsen, K., Nadin-Davis, S., Randall, G. Identification of a 35-Kilodalton Serovar-Cross-Reactive Flagellar Protein, FlaB, from *Leptospira interrogans* by N-Terminal Sequencing, Gene Cloning, and Sequence Analysis. *Infection and Immunity*, 1997, vol. 65, no. 10, s. 4355 – 4359.
44. Cerqueira, G.M., Picardeau M. A Century of *Leptospira* Strain Typing .*Infection, Genetics and Evolution*, 2009, vol. 9, no. 5, s. 760 - 768.
45. Faine, S. B. a kol. *Leptospira* and Leptospirosis. 1<sup>st</sup> printing, 1999. Melbourne, Australia: MediScist. ISBN 0849369940.
46. Brenner, D.J., Kaufmann, A.F., Sulzer, K.R., Steigerwalt, A.G., Rogers, F.C., Weyant, F.C. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, vol. 49, s. 839 - 858.
47. Victoria, B., Ahmed, A., Zurner, R.L., Ahmed, N., Bulach, D.M., Quinteiro, J. a kol. Conservation of the S10-spc- $\alpha$  locus within otherwise highly plastic genomes provides phylogenetic insight into the genus *Leptospira*. *Public Library of Science One*, 2008, vol. 3, s. e2752.
48. Iwamoto, E., Wada, Y., Fujisaki, Y., Umeki, S., Jones, M.Y., Mizuno T.a kol. Nationwide Survey of *Leptospira* Antibodies in Dogs in Japan: Results from Microscopic Agglutination

Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2009, vol. 71, no. 9, s. 1191 – 1199.

49. Prescott, J. Canine leptospirosis in Canada: a veterinarian's perspective. *Canadian Medical Association journal*, 2008, vol. 178, no. 4, s. 397 – 398.

50. Alton, G.D., Berke, O., Reid-Smith, R., Ojkic, D., Prescott, J.F. Increase in seroprevalence of canine leptospirosis and its risk factors, Ontario 1998–2006. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 2009, vol. 73, no. 3, s. 167 – 175.

51. Lewis, F.I., Gunn, G.J, McKendrick, I.J., Murray, F.M. Bayesian inference for within-herd prevalence of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo using bulk milk antibody testing. *Biostatistics*, 2009, vol. 10, no. 4, s. 719 –728.

52. Brown, P.D., Gravekamp, C., Carrington, C.D., van de Kemp, H., Hartskeerls, R.A., Edwards, C.N. a kol. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of Medical Microbiology*, 1995, vol. 43, s. 110 – 114.

53. Silva, E.F., Brod, C.S., Cerqueira, G.M., Bourscheidt, D., Seyffert, N., Queiroz, A. a kol. Isolation of *Leptospira noguchii* from sheep. *Veterinary Microbiology*, 2007, vol. 121, no. 1 - 2, s. 144–149.

54. Boqvist, B., Ho Thi, V.T., Magnusson, U. Annual Variation in *Leptospira* Seroprevalence among Sows in Southern Vietnam. *Tropical animal health and production*, 2005, vol. 37, no. 6, s. 443 – 449.

55. Dolhnikoff, M., Mauad, T., Bethlem, E.P., Carvalho, C.R. Pathology and Pathophysiology of Pulmonary Manifestations in Leptospirosis. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2007, vol. 11, no. 1, s. 142 - 148.

56. Jansen, A., Nöckler, K., Schönberg, A., Luge, E., Ehlert, D., Schneider, T. Wild boars as possible source of hemorrhagic leptospirosis in Berlin, Germany. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 2006, vol. 25, no. 8, s. 544 – 546.

57. Woo, T.H., Smythe, L.D., Symonds, M.L., Norris, M.A., Dohnt, M.F., Patel, B.K. Rapid distinction between *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* by PCR amplification of 23S ribosomal DNA. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, vol. 150, s. 9 – 18.

58. Sasaki, F., Kano, R., Nakamura, Y., Tsujimoto, H., Yamamoto, S., Hasegawa, A. Phylogenetic analysis of *Leptospira* strains of pathogenic serovars using 23S rDNA gene sequences. *Microbiology Research*, 1999, vol. 154, s. 167 – 172.
59. Atzingen, M.V., Barbosa, A.S., De Brito, T., Vasconcellos, S.A., de Morais, Z.M., Lima, D.M. a kol. Lsa21, a novel leptospiral protein binding adhesive matrix molecules and present during human infection. *BMC Microbiology*, 2008, vol. 8, s. 70.
60. Pol, S.S., Dhakephalkar, P.K., Bharadwaj, R.S. Characterisation of Leptospire Using V3 Region of 16 rDNA by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: a Case Study. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2009, vol. 27, no. 4, s. 357 – 357.
61. Gressler, L.T., Da Silva, A.S., Tonin, A.A., Azevedo, M.I., Badke, M.R.T., Monteiro, S.G. New serovars of *Leptospira interrogans* in cavy (*Cavia aperea*). *Comparative Clinical Pathology*, 2010, vol. 19, no. 1, s. 119 – 120.
62. Lin, M., Li, Y. PCR Genome Walking Identifies a Genetic Locus Comprising Two Heat Shock Genes (*hslV* and *hslU*) from *Leptospira borgpetersenii* Serovar Hardjjobovis. *Current Microbiology*, 2001, vol. 43, no. 6, s. 452 – 456.
63. McBride, A.J., Santos, B.L., Queiroz, A., Santos, A.C., Hartskeerl, R.A., Reis, M.G., Ko, A.I. Evaluation of Four Whole-Cell *Leptospira*-Based Serological Tests for Diagnosis of Urban Leptospirosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007, vol. 14, no. 9, s. 1245 – 1248.
64. Zítek K. Leptospirózy – zdravotní riziko po povodních. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2002, vol. 11, no. 8, s. 336 – 337.
65. Faltusová, B. Laboratorní metody v diagnostice patogenních leptospir. Pardubice, 2010.
- 63 s. Diplomová práce na Fakultě chemicko – technologická Univerzity Pardubice na Katedře biologických a biochemických věd. Vedoucí diplomové práce Mgr. Markéta Vydržalová, Ph.D.
66. Ferguson, I.R. Leptospirosis update. *BMJ*, 1991, vol. 302, no. 6774, s. 471 -472.
67. Tung, J.Y., Yang, C.W., Chou, S.W., Lin, C.C., Sun, Y.J. Calcium Binds to LipL32, a Lipoprotein from Pathogenic *Leptospira*, and Modulates Fibronectin Binding. *Journal of Chemical Biology*, 2009, vol. 285, no. 5, s. 3245 – 3252.

68. Dong, H., Hu, Y., Xue, F., Sun, D., Ojcius, D.M., Mao, Y. a kol. Characterization of the *ompL1* gene of pathogenic *Leptospira species* in China and cross-immunogenicity of the OmpL1 protein. *BMC Microbiology*, 2008, vol. 8, s. 223.
69. Lottersberger, J., Guerrero, S.A., Tonarelli, G.G., Frank, R., Tarabla, H., Vanasco, N.B. Epitope Mapping of Pathogenic *Leptospira* LipL32. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, vol. 49, no. 5, s. 641 - 645.
70. Murray, G.L., Srikrum, A., Hoke, D.E., Wunder, E.A. Jr, Henry, R., Lo, M. a kol. Major Surface Protein LipL32 is not Required for Either Acute or Chronic Infection with *Leptospira interrogans*. *Infection and Immunity*, 2009, vol. 77, no. 3, s. 952 - 958.
71. Amutha, R., Chaudhury, P., Garg, A.P., Vasan, P., Cheema, P.S., Srivastava, S.K. Cloning and Sequence Analysis of the Gene Encoding LipL32 of *Leptospira interrogans* Serovar Sejroe. *Veterinary research communications*, 2007, vol. 31, no. 5, s. 513 – 519.
72. Habarta, A., Abreu, P.A., Olivera, N., Hauk, P., Ce'dola, M.T., Ferrer, M.F. a kol. Increased Immunogenicity to LipL32 of *Leptospira interrogans* when Expressed as a Fusion Protein with the Cholera Toxin B Subunit. *Current Microbiology*, 2011, vol. 62, no. 2, s. 526 – 531.
73. Matsunaga, J., Medeiros, M.A., Sanchez, Y., Werneid, K.F., Ko, A.I. Osmotic regulation of expression of two extracellular matrix-binding proteins and a haemolysin of *Leptospira interrogans*: differential effects on LigA and Sph2 extracellular release. *Microbiology*, 2007, vol. 153, no. Pt 10, s. 3390–3398.
74. Lin, X., Sun, A., Ruan, P., Zhang, Z., Yan, J. Characterization of Conserved Combined T and B Cell Epitopes in *Leptospira interrogans* Major Outer Membrane Proteins OmpL1 and LipL4. *BMC Microbiology*, 2011, vol. 11, no. 1, s. 21.
75. Longhi, M.T., Oliveira, T.R., Romero, E.C., Goncales, A.P., de Moraes, Z.D., Vasconcellos, S.A a kol. A newly identified protein of *Leptospira interrogans* mediates binding to laminin. *Journal of Medical Microbiology*, 2009, vol. 58, no. Pt 10, s. 1275 – 1282.
76. Vieira, M.L., de Moraes, Z.M., Goncales, A.P., Romero, E.C., Vasconcellos, S.A., Nascimento, A.L. Lsa63, a newly identified surface protein of *Leptospira interrogans* binds laminin and collagen IV. *Journal of Infection*, 2010, vol. 60, no. 1, s. 52 – 64.



77. Adler, B., Lo, M., Seemann, T., Murray, G.L. Pathogenesis of Leptospirosis: The Influence of Genomics. *Veterinary Microbiology*, 2011, vol. 153, no.1 - 2, s. 73 – 81.
78. Cinco, M. New Insights into the Pathogenicity of Leptospire: Evasion of Host Defences. *The New Microbiologica*, 2010, vol. 33, no. 4, s. 283 - 292.
79. Lin, Y., Greenwood, A., Yan, W., Nicholson, L.K., Sharma, Y., McDonough, S.P. a kol. novel fibronectin type III module binding motif identified on C terminus of *Leptospira* immunoglobulin-like protein, LigB. *Biochemical and Biophysical Research*. 2009, vol. 389, no. 1, s. 57 – 62.
80. Bughio, N.I., Lin, M., Surujballi, O.P. Use of Recombinant Flagellin Protein as a Tracer Antigen in a Fluorescence Polarization Assay for Diagnosis of Leptospirosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1999, vol. 6, no. 4, s. 599 – 605.
81. Wang, Z., Jin, L., Węgrzyn A. Leptospirosis Vaccines. *Microbial Cell Factories*, 2007, vol. 6, s. 39.
82. Natarajaseenivasan, K., Vijayachari, P., Sharma, S., Sugunan, A.P., Selvin, J., Sehgal, S.C. Serodiagnosis of Severe Leptospirosis: Evaluation of ELISA Based on the Recombinant OmpL1 or LipL41 Antigens of *Leptospira interrogans* Serovar Autumnalis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 2008, vol. 102, no. 8, s. 699 - 708.
83. Ren, S.X., Fu, G., Jiang, X.G., Zeng, R., Miao, Y.G., Yu, H. a kol. Unique Physiological and Pathogenic Features of *Leptospira interrogans* Revealed by Whole-Genome Sequencing. *Nature*, 2003, vol. 422, no. 6934, s. 888 - 893.
86. Dutta, T.K., Christopher, M. Leptospirosis – An Overview. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 2005, vol. 53, s. 545 – 551.
87. Stoddard, R.A., Gee, J.E., Wilkins, P.P., McCaustland, K., Hoffmaster, A.R. Detection of Pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan Polymerase Chain Reaction Targeting the LipL32 Gene. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 2009, vol. 64, no. 3, s. 247 – 255.
88. Myint, K.S., Murray, C.K., Scott, R.M., Shrestha, M.P., Mammen Jr, M.P., Shrestha, S.K. a kol. Incidence of leptospirosis in a select population in Nepal. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* , 2010, vol. 104, no. 8, s. 551 – 555.

89. Lucchesi, P.M., Arroyo, G.H., Etcheverría, A.I., Parma, A.E., Seijo, A.C. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2004, vol. 37, no. 2, s. 131 – 134.
90. Cermakova, Z., Kucerova, P., Valenta, Z., Pliskova, L., Bolehovska, R., Prasil, P. a kol. Leptospirosis: Possibilities of Early Laboratory and Clinical Diagnosis. *Central European Journal of Medicine*, 2013, vol. 8, no. 1, s. 84 - 89.
91. Mansour-Ghanaei, F., Sarshad, A., Fallah, M.S., Pourhabibi, A., Pourhabibi, K., Yousefi-Mashhoor, M. Leptospirosis in Guilan, a Northern Province of Iran: Assessment of the Clinical Presentation of 74 Cases. *Medical Science Monitor*, 2005, vol. 11, no. 5, CR219 - 223.
92. Esen, S., Sunbul, M., Leblebicioglu, H., Eroglu, C., Turan, D. Impact of Clinical and Laboratory Findings on Prognosis in Leptospirosis. *Swiss medical weekly*, 2004, vol. 134, no. 23 - 24, s. 347 - 352.
93. Katz, A.R., Ansdell, V.E., Effler, P.V., Middleton, C.R., Sasaki, D.M. Assessment of the Clinical Presentation and Treatment of 353 Cases of Laboratory-confirmed Leptospirosis in Hawaii, 1974-1998. *Clinical Infectious Diseases*, 2001, vol. 33, no. 11, s. 1834 - 1841.
94. da Rocha Medeiros, F., Spichler, A., Athanazio, D.A. Leptospirosis-associated disturbances of blood vessels, lungs and hemostasis. *Acta Tropica*, 2010, vol. 115, s. 155 – 162.
95. Rathinam, S.R. Ocular Manifestation of Leptospirosis. *Journal of Postgraduate Medicine*, 2005, vol. 51, no. 3, s. 189 - 194.
96. Mancel, E., Merien, F., Pesenti, L., Salino, D., Angibaud, G., Perolat, P. Clinical aspects of ocular leptospirosis in New Caledonia (South Pacific). *Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology*, 1999, vol. 27, no. 6, s. 380 – 386.
97. Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Limmathurotsakul, D., Smythe, L.D., Symonds, M.L., Dohnt, M.F. a kol. Optimization of Culture of *Leptospira* from Humans with Leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, vol. 45, no. 4, s. 1363 – 1365.

98. Matsuo', K., Isogai, E., Araki, Y. Control of Immunologically Crossreactive Leptospiral Infection by Administration of Lipopolysaccharides from a Nonpathogenic Strain of *Leptospira biflexa*. *Microbiology and Immunology*, 2000, vol. 44, no. 11, s. 887 - 890.
99. Kucerova, P., Cermakova, Z., Pliskova, L., Valenta, Z., Pavlis, O., Kubickova, P. Comparison of Results of Two Serological Methods for Diagnosing Leptospirosis - Microagglutination Test and ELISA. *Klinická Mikrobiologie a Infekční Lékařství*, 2011, vol. 17, no. 5, s. 173 - 178.
100. Panwala, T., Mulla, S., Patel, P. Seroprevalence of Leptospirosis in South Gujarat Region by Evaluating the Two Rapid Commercial Diagnostic Kits against the MAT Test for Detection of Antibodies to *Leptospira interrogans*. *National Journal of Community Medicine*, 2011, vol. 2, no. 1, s. 64 - 70.
101. Dounghawee, G., Kositanont, U., Niwetpathomwat, A., Inwisai, T., Sagarasaeranee, P., Haake, D.A. Early Diagnosis of Leptospirosis by Immunoglobulin M Immunoblot Testing. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2008, vol. 15, no. 3, s. 492 – 498.
102. Lin, P., Chi, C., Ho, M., Chen, C., Ho, C., Wang, J. Demographic and clinical features of leptospirosis: three-year experience in central Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infections*. 2008, vol. 41, s. 145 – 150.
103. Chalayon, P., Chanket, P., Boonchawalit, T., Chattanadee, S., Srimanote, P., Kalambaheti, T. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* , 2011, vol. 105, no. 5, s. 289 – 297.
104. Sun, A., Wang, Y., Du, P., Wu, S., Yan, J. A Sensitive and Specific IgM ELISA for the Serological Diagnosis of Human Leptospirosis Using a rLipL32/1LipL21OmpL1/2 Fusion Protein. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2011, vol. 24, no. 11, s. 291 - 299.
105. Dey, S., Mohan, C.M., Ramadass, P., Nachimuthu, K. Recombinant Antigen-based Latex Agglutination Test for Rapid Serodiagnosis of Leptospirosis. *Veterinary Research Communications*, 2007, vol. 31, s. 9 – 15.

106. Effler, P.V., Bogard, A.K., Domen, H.Y., Katz, A.R., Higa, H.Y., David M. Sasaki, D.M. Evaluation of Eight Rapid Screening Tests for Acute Leptospirosis in Hawaii. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, vol. 40, no. 4, s. 1464 – 1469.
107. Tevfik Dorak, Michael. *Real – time PCR*. 1st printing, 2006. Abingdon : Taylor and Francis Group ; New York : Taylor and Francis Group. 333 s. ISBN 0-203-96731- 3.
108. Pabinow, Paul. *Making PCR – a story of biotechnology*. 1st printing, 1996. Chicago : University of Chicago Press, Ltd. ; London : University of Chicago Press, Ltd. 190 s. ISBN 0 226 – 70147.
109. Praktická cvičení z molekulární genetiky. Hradec Králové : Generi Biotech, 2006. 40 s.
110. Janochová, J. *Izolace DNA: výtěžnost a kvalita*. Brno, 2009. 48 s. Bakalářská práce na Lékařské fakultě Masarykovy Univerzity na Ústavu biochemie. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Omar Šerý, Ph.D.
111. Schuller, E a kol. *PCR for clinical mikrobiology: an Australian and international perspective*. 1st printing, 2010. Dordrecht : Springer science + business media; Heidelberg : Springer science + business media; London : Springer science + business media; New York : Springer science + business media. 438 s. ISBN 977 – 90 – 481 – 9038 – 6.
112. Prausová, P. *Molekulárně biologický průkaz patogenních leptospir metodou PCR v klinických vzorcích*. Hradec Králové, 2003. 65 s. Diplomová práce na Farmaceutická fakultě Univerzity Karlova v Praze na Katedře biologických a lékařských věd. Vedoucí práce PharmDr. Lenka Plíšková.
113. Lo, Y.M.D a kol. *Clinical application of PCR*. 2nd printing, 2006. New Jersey: Humana Press Inc. Totowa. 353 s. ISBN 1064 3745.
114. McPherson a kol. *PCR*. 2nd printing, 2006. Abingdon : Taylor and Francis Group ; New York : Taylor and Francis Group. 292 s. ISBN 0 – 4153 – 5547 – 8.
115. Steve, G. *Real Time PCR Protocol Development for Rapid and Low Cost Quantification of Baculovirus and for Monitoring Progression of Infection*. Ontario, 2010. 110 s. Diplomová práce na Univerzitě Waterloo, Ústav chemického inženýrství. Vedoucí diplomové práce. Dr. Marc Aucoin.

116. Mackay, I.M. *Real – Time PCR in microbiology : from diagnosis to characterisation*. 1st printing, 2007. Norfolk : Caister Academic Press. ISBN 978 – 1- 904455- 18 – 9.
117. Real-Time PCR Applications Guide. : Bio-Rad Laboratories, Inc. 2006, 100 s.
118. Molekulární biologické techniky promikrobiologickou diagnostiku - část 5. Praha : Roche, 2004, 4 s.
119. Moreno, N., Agudelo-Flórez, P. Aplicación de las Pruebas de PCR Convencional Simple y Múltiple para la Identificación de Aislamientos de *Leptospira spp.* en Colombia. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 2010, vol. 27, no. 4, s. 548 - 556.
120. Aviat, F., Blanchard, B., Michel, V, Blanchet, B., Branger, C., Hars J. a kol. *Leptospira* Exposure in the Human Environment in France: A Survey in Feral Rodents and in Fresh Water. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2009, vol. 32, no. 6, s. 463 – 476.
121. Vein, J., Perrin, A., Berny, P.J., Benoit, E., Leblond, A., Kodjo, A. Adaptation of a real-time PCR method for the detection and quantification of pathogenic leptospires in environmental water. *Canadian Journal of Microbiology*. 2012, vol. 58, no. 7, s. 828 – 835.
122. Chagas-Junior, A.D., da Silva, C.L.R., Soares, L.M., Santos, C.S., Silva M.C.D.C. a kol. Detection and Quantification of *Leptospira interrogans* in Hamster and Rat Kidney Samples: Immunofluorescent Imprints versus Real-time PCR. *Public Libraray of Science ONE*, 2012, vol. 7, no. 2, s. e32712.
123. Fornazari, F., da Silva, R.C., Richini-Pereira, V.B., Beserra, H.E., Luvizotto, M.C., Langoni, H. Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect *Leptospira spp.* in kidney and liver samples from naturally infected sheep from Brazil. *Journal of Microbiological Methods*, 2012, vol. 90, no. 3, s. 321 – 326.
124. Zhang, X.Y., YU, Y., HE, P., Zhang ,Y.X., HU, B.Y., YANG, Y. a kol. Expression and Comparative Analysis of Genes Encoding Outer Membrane Proteins LipL21, LipL32 and OmpL1 in Epidemic Leptospires. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2005, vol. 37, no. 10, s. 649 – 656.

125. Subharat, S., Wilson, P.R., Heuer, C., Collins-Emerson, J.M., Smythe, L.D., Dohnt, M.F. a kol. Serosurvey of leptospirosis and investigation of a possible novel serovar Arborea in farmed deer in New Zealand. *New Zealand veterinary journal*, 2011, vol. 59, no. 3, s. 139 - 142.
126. Carrillo-Casas, E.M., Hernández-Castro, R., Suárez-Güemes, F., de la Peña-Moctezuma, A. Selection of the Internal Control Gene for Real-Time Quantitative RT-PCR Assays in Temperature Treated *Leptospira*. *Current Microbiology*, 2008, vol. 56, no. 6, s. 539 – 546.
127. Bedir, O., Kilic, A., Atabek, E., Kuscuku A.M., Tarhan V., Basustaoglu A.C. Simultaneous Detection and Differentiation of Pathogenic and Non – pathogenic *Leptospira* spp. By Multiplex Real – Time PCR (TaqMan) Assay. *Polish journal of Microbiology*. 2010, vol. 59, no. 3, s. 157 – 163.
128. Nassi, F., Kömmling Seixas, F., Jouglard, S.D.D., Simionatto, S., Silva, E.F., Seyffert, N. Leptospirosis Diagnosis using Nested -PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2003, vol. 34, no. 1, s. 90 – 92.
129. Kývalová, M. *Sekvenační metody nové generace : jejich principy a potencionální využití v genetice člověka, etické aspekty*. Brno, 2011. 39 s. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy Univerzity na Ústavu experimentální biologie, Oddělení genetiky a molekulární biologie. Vedoucí bakalářské práce Mgr. Romana Zaoralová.
130. Přistoupilová, A. *Nové techniky sekvenace lidského genomu a jejich uplatnění ve studiu molekulární podstaty a diagnostiky dědičně podmíněných onemocnění*. Praha, 2008. 53 s. Bakalářská práce na 1. Lékařské fakultě Univerzity Karlovy. Vedoucí bakalářské práce Ing. Stanislav Kmoch, CSc.
131. Romero, E.C., Blanco, R.M., Galloway, R.L. Analysis of multilocus sequence typing for identification of *Leptospira* isolates in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, vol. 49, no. 11, s. 3940 - 3942.
132. Rettinger, A., Krupka, I., Grünwald, K., Dyachenko, V., Fingerle, V., Konrad, R., Raschel, H a kol. *Leptospira* spp. strain identification by MALDI TOF MS is an equivalent tool to 16S rRNA gene sequencing and multi locus sequence typing (MLST). *BMC Microbiology* 2012, vol. 12, s. 185.

133. Ahmed, A., Thaipadungpanit, J., Boonsilp, S., Wuthiekanun, V., Nalam, K., Spratt, B.G. a kol. Comparison of two multilocus sequence based genotyping schemes for *Leptospira* species. *Public Library of Science ONE*, 2011, vol. 5, no. 11, s. e1374.
134. Herrmann, J.L., Bellenger, E., Perolat, P., Baranton, G., Saint Girons, I. Pulsed-field gel electrophoresis of NotI digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992, vol. 30, no. 7, s. 1696 - 1702.
135. Galloway, R.L., Levett, P.N. Evaluation of a Modified Pulsed – Field Electrophoresis Approach for the Identification of *Leptospira* Serovars. *American journal of tropical medicine*, 2008, vol. 78, no. 4, s. 628 – 632.
136. Vijayachari, P., Ahmed, N., Sugunan, A. P., Ghousunnisa, S., Rao, K. R., Hasnain, S. E. Use of fluorescent amplified fragment length polymorphism for molecular epidemiology of leptospirosis in India. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, vol. 42, s. 3575 – 3580.
137. Majed, Z., Bellenger, E., Postic, D., Pourcel, C., Baranton, G., Picardeau, M. Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans* sensu stricto. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, vol. 43, no. 2, s. 539 - 45.
138. Levett, P.N., Morey, R.E., Galloway, R.L., Turner, D.E., Steigerwalt, A.G., Mayer, L.W. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *Journal of Medical Microbiology*, 2005, vol. 54, s. 45 – 49.
139. Ahmed, N., Devi, S.M., de lo Á Valverde, M, Vijayachari, P., Machangú, R.S., Eliis, W.A. a kol. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2006, vol. 5, s. 28.
140. Applied Biosystems, Foster City. BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. 2010. 72 s.
141. Terpstra WJ a kol. Human Leptospirosis: Guidance for Diagnostic, Surveillance and Control, World Health Organization, International Leptospirosis Society, Malta, 2003, ISBN 9241545895.
142. Thaipadunpanit, J., Chierakul, W., Wuthiekanun, V., Limmathurotsakul, D., Amornchai, P., Boonslip, S. a kol. Diagnostic Accuracy of Real-Time PCR Assays Targeting 16S rRNA and lipI32 Genes for Human Leptospirosis in Thailand: A Case-Control Study. *Public Library of Science ONE* , 2011, vol. 6, no. 1, s. e16236.

143. Effler PV, Bogard AK, Domen HY. Evaluation of Eight Rapid Screening Tests for Acute Leptospirosis in Hawaii. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002, vol. 40, no. 4, s. 1464 – 1469.
144. Brato DG., Mendoza MT., Cordero CP. Validation of the world health organization criteria using the microscopic agglutination test (Mat) as the gold standard in the diagnosis of leptospirosis. *Phil J microbiol infect*. 1998, vol. 27, no. 4, s. 125 – 128.
145. Cermakova, Z., Ryskova, O., Honegr, K., Cermakova, E., Hanovcova, I. Diagnosis of Lyme borreliosis using enzyme immunoanalysis. *Medical Science Monitor*. 2005, vol. 11, no. 4, s. 121 – 125.
146. Croda, J., Ramos, J.G.R., Matsuganaga, J., Queiroz, A., Homma, A., Riley, L.W. a kol. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007, vol. 45, no. 5, s. 1528 – 1534.
147. Vinetz , J.M., Glass, G.E., Flexner, C.E., Mueller, P., Kaslow, D.C. Sporadic urban leptospirosis. *Annals of Internal Medicine*. 1996; vol. 125, no. 10, s. 794 – 798.



## 8. SEZNAM TABULEK, OBRÁZKŮ A GRAFŮ

### Seznam tabulek

<b>Tab. 1</b> Charakteristiky genomů 3 osekvenovaných genomospecies patogenních leptospir...	22
<b>Tab. 2</b> Přehled některých sérovarů leptospir a jejich přenašečů zjištěných v ČR a SROV...	26
<b>Tab. 3</b> Rozpis amplifikačních směsí („master mixu“)	84
<b>Tab. 4</b> Příprava mixu 1a + 1b	84
<b>Tab. 5</b> Rozpis amplifikačních směsí + IC („master mixu“):	86
<b>Tab. 6</b> Optimalizace koncentrace $Mg^{2+}$ iontů - příprava master mixu ( $V = 18 \mu l$ )	87
<b>Tab. 7</b> Optimalizace koncentrací primerů	88
<b>Tab. 8</b> Optimalizace poměru MM : množství templátové DNA	88
<b>Tab. 9</b> Příprava PCR reakční směsi pro MLST analýzu	93
<b>Tab. 10</b> Výsledky vyšetření r – t PCR a MAT metody PCR pozitivních pacientů	105
<b>Tab. 11</b> Volba optimálního materiálu pro rt PCR vyšetření pro následnou detekci DNA patogenních leptospir ve vzorcích povrchových a vlhkých substrátů	111
<b>Tab. 12</b> Výsledky MLST 11 patogenních kmenů leptospir vyskytujících se v České republice	113
<b>Tab. 13</b> Počet vyšetřených pacientů a incidence leptospirózy v letech 2002-2013	116
<b>Tab. 14</b> Výsledky vyšetření krevních sér příslušníků AČR ze sérové banky AČR na přítomnost IgM protilátek proti patogenním leptospirám metodou ELISA	117
<b>Tab. 15</b> Výsledky vyšetření krevních sér příslušníků AČR ze sérové banky AČR na přítomnost IgM protilátek proti patogenním leptospirám metodou ELISA	117
<b>Tab. 16</b> Výsledky vyšetření krevních sér příslušníků AČR, kteří se nedávno vrátili ze zahraničních misí, na přítomnost IgM a IgG protilátek proti patogenním leptospirám metodou ELISA	118
<b>Tab. 17</b> Souhrnné výsledky vyšetření krevních sér na přítomnost IgM a IgG protilátek proti patogenním leptospirám metodou ELISA	118

**Tab. 18** Výsledky vyšetření krevních ser metodou ELISA a MAT.....120

**Tab. 19** Porovnání výsledků diagnostické senzitivity, specificity, PPV, NPV soupravy SERION ELISA classic IgM/IgG s dalšími studii.....132

## **Seznam obrázků**

**Obr. 1** *Leptospira* sp. ....16

**Obr. 2** Buněčná stavba leptospir.....17

**Obr. 3** Komparativní genomika 3 osekvenovaných genomospecies leptospir.....22

**Obr. 4** Možné způsoby přenosu leptospirosy.....23

**Obr. 5** Výskyt leptospirosy ve světě.....24

**Obr. 6** Leptospiry „obarvené“ za použití nepřímé imunofluorescence.....36

**Obr. 7** Leptospiry obarvené stříbřením - biopsie jater.....36

**Obr. 8** Mikroaglutinanční test .....37

**Obr. 9** Silikagelové kolonky.....39

**Obr. 10** Fenol- chloroformová extrakce.....40

**Obr. 11** Resin.....40

**Obr. 12** Princip PCR reakce .....44

**Obr. 13** Elektroforetická detekce PCR ampliconů patogenních leptospir na agarózovém gelu.....45

**Obr. 14** SybrGreenI.....47

**Obr. 15** Hybridizační sondy FRET.....48

**Obr. 16** Hydrolyzační sonda.....49

**Obr. 17** Beacon sonda.....50

**Obr. 18** Vzorec Cy3 a Cy5.....50

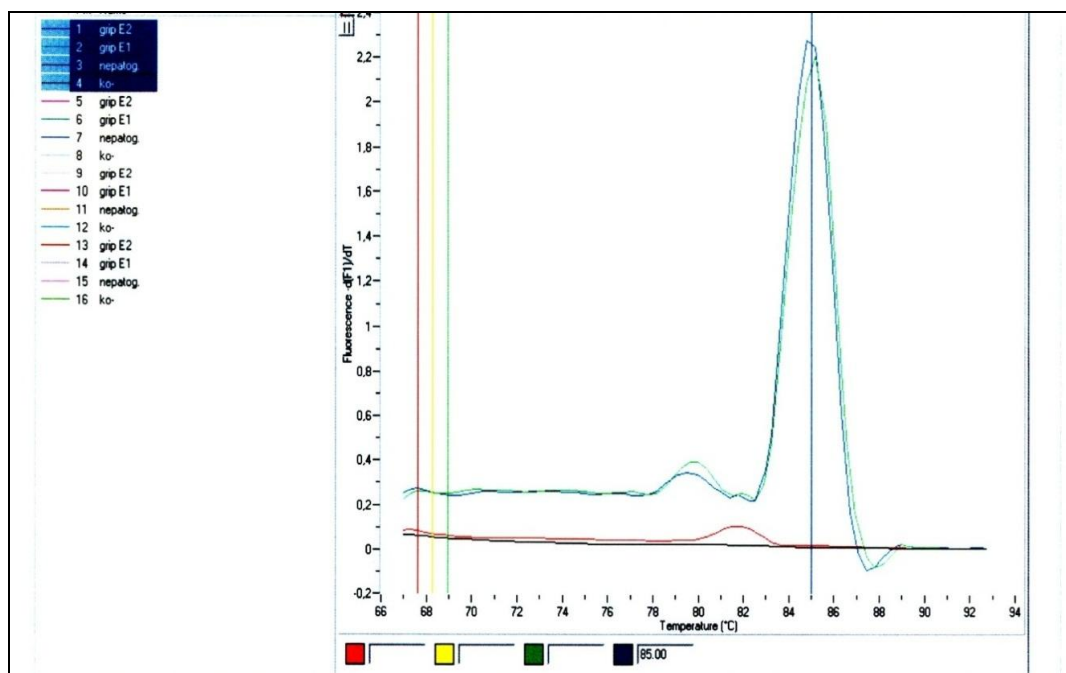
<b>Obr. 19</b> Vzorec fluoresceinu.....	50
<b>Obr. 20</b> LightCycler 1.5 (Roche).....	52
<b>Obr. 21</b> Schematické uspořádání LightCycleru.....	52
<b>Obr. 22</b> Záznam rt PCR analýzy.....	54
<b>Obr. 23</b> Záznam Analýzy teploty tání.....	56
<b>Obr. 24</b> Záznam Sangerovy sekvenace s využitím kapilární elektroforézy.....	61
<b>Obr. 25</b> DNA –DNA hybridizace.....	62
<b>Obr. 26</b> DNA fingerprinting.....	63
<b>Obr. 27</b> Štěpení DNA restrikční endonukleázou <i>EcoRI</i> .....	64
<b>Obr. 28</b> Praktické provedení PGFE analýzy.....	65
<b>Obr. 29</b> Princip provedení AFLP analýzy.....	66
<b>Obr. 30</b> Princip provedení VNTR analýzy.....	67
<b>Obr. 31</b> Ověření pozitivní a negativní analytické specifity.....	101
<b>Obr. 32</b> Testování meze detekce rt PCR metody pro jednotlivá ředění laboratorního kmene <i>L. icterohaemorrhagiae</i> Copenhageni (ředění $10^6$ – $10^1$ kopií genomu/ml tekutého biologického materiálu.....	102
<b>Obr. 33</b> Testování meze detekce rt PCR metody pro jednotlivá ředění laboratorního kmene <i>L. icterohaemorrhagiae</i> Copenhageni (ředění 5 – 1 kopií genomu/ml tekutého biologického materiálu.....	102
<b>Obr. 34</b> Vyhodnocení procesu analýzy teploty tání u prvních 24 sbírkových laboratorních kmenů leptospir + pozitivní a negativní kontrola.....	103
<b>Obr. 35</b> Výsledky rt PCR vyšetření u pacientů suspektních na leptospirozu.....	104
<b>Obr. 36</b> Koncentrace $Mg^{2+}$ iontů 3 mM.....	107
<b>Obr. 37</b> Koncentrace primerů 0,3 $\mu$ M F primer a 0,3 $\mu$ M R primer.....	107
<b>Obr. 38</b> Optimalizace množství MM : templátová DNA 4 $\mu$ l : 16 $\mu$ l.....	108
<b>Obr. 39</b> Inhibiční kontrola IC 838.....	108

<b>Obr. 40</b> Citlivost rt PCR detekce bez IC a s IC.....	109
<b>Obr. 41</b> Objem inhibiční kontroly 0,2 µl .....	109
<b>Obr. 42</b> Koncentrace primerů IC 0,02 µM .....	110
<b>Obr. 43</b> Ukázka elektroforetického záznamu PCR reakcí v rámci MLST.....	112

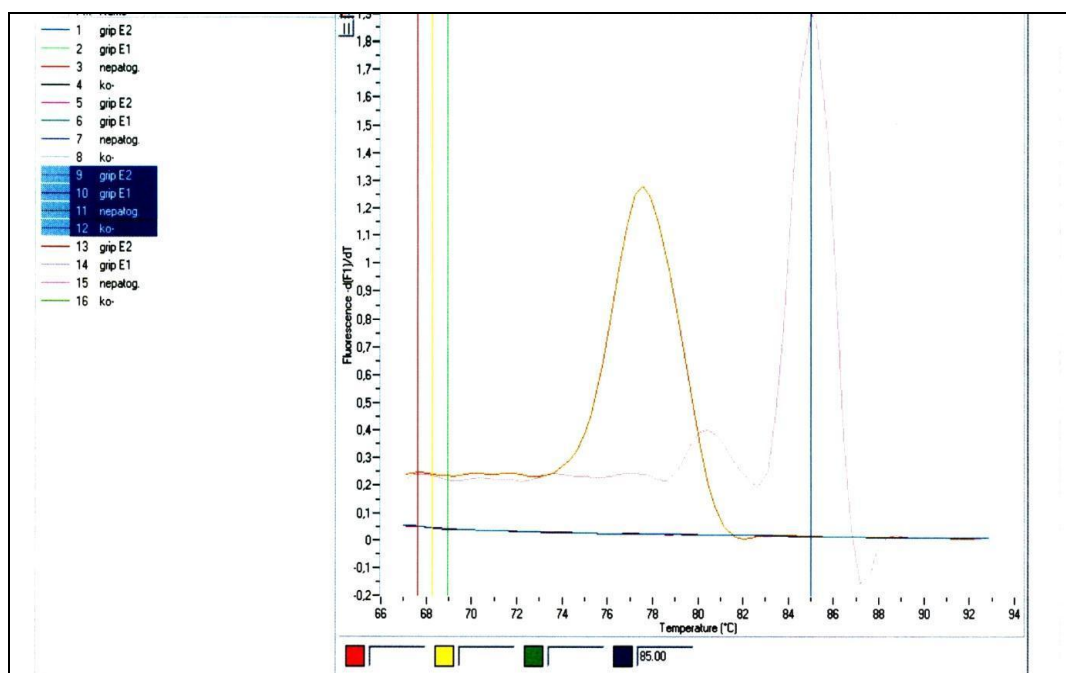
### Seznam grafů

<b>Graf 1</b> Počty vyšetřených biologických materiálů v letech 2002 -2013.....	73
<b>Graf 2</b> Výskyt leptospirózy v závislosti na věku (ženy, muži, ženy + muži) – absolutní četnost.....	115
<b>Graf 3</b> Výskyt leptospirózy v jednotlivých letech 2002–2013 - absolutní četnost.....	115
<b>Graf 4</b> Výskyt leptospirózy v jednotlivých měsících 2002–2013 – absolutní četnost.....	116

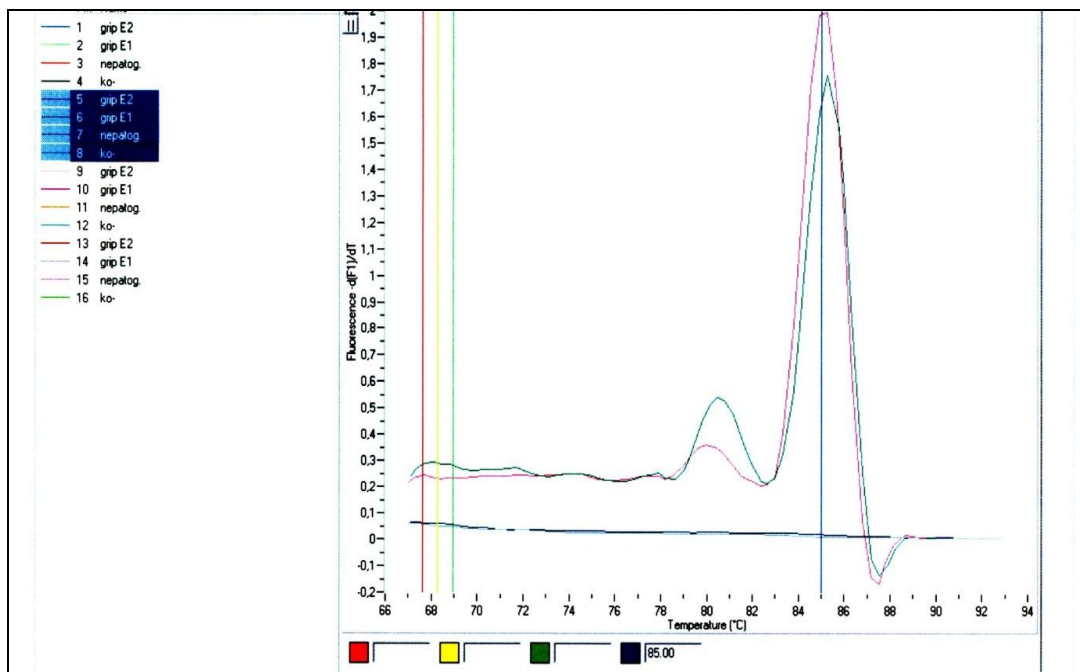
## 9. PŘÍLOHY



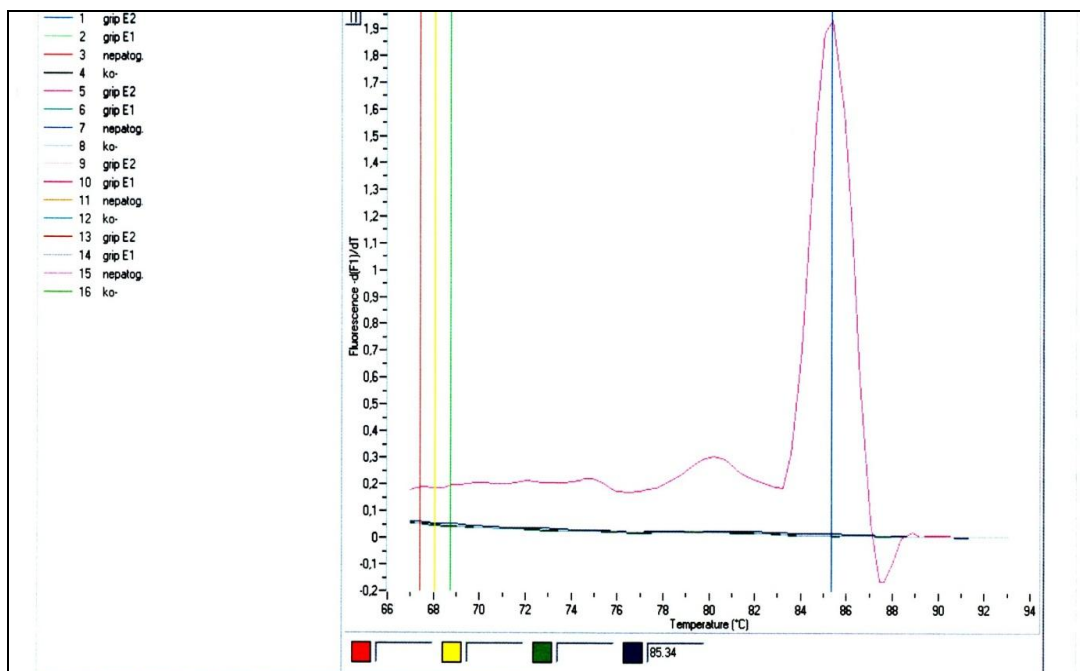
Příl. 1 Koncentrace  $Mg^{2+}$  6 mM



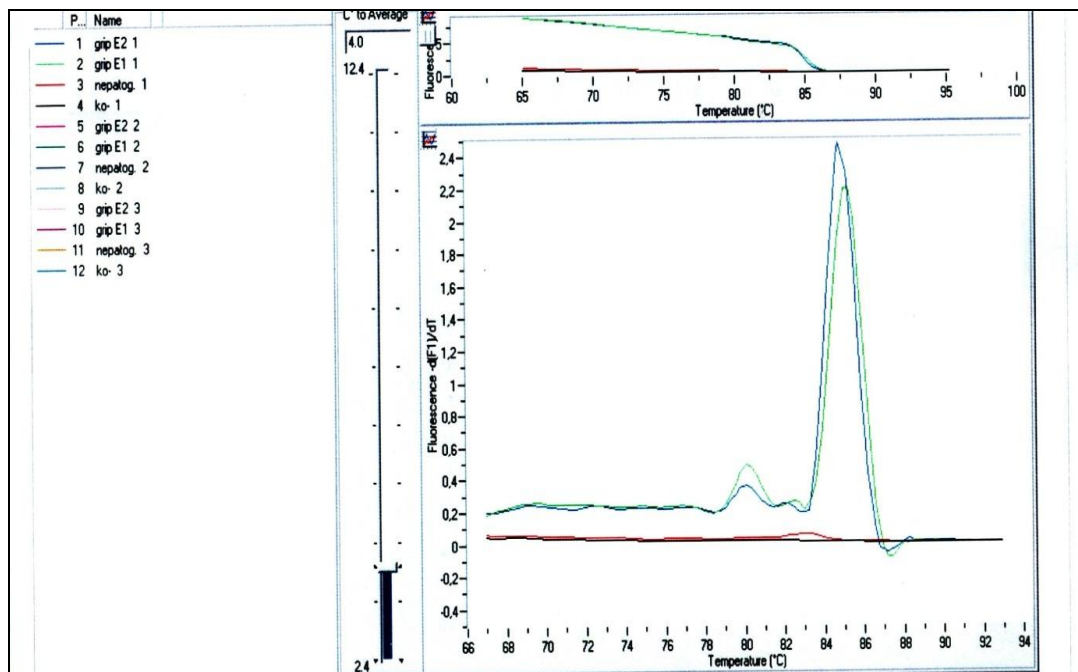
Příl. 2 Koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů 5 mM



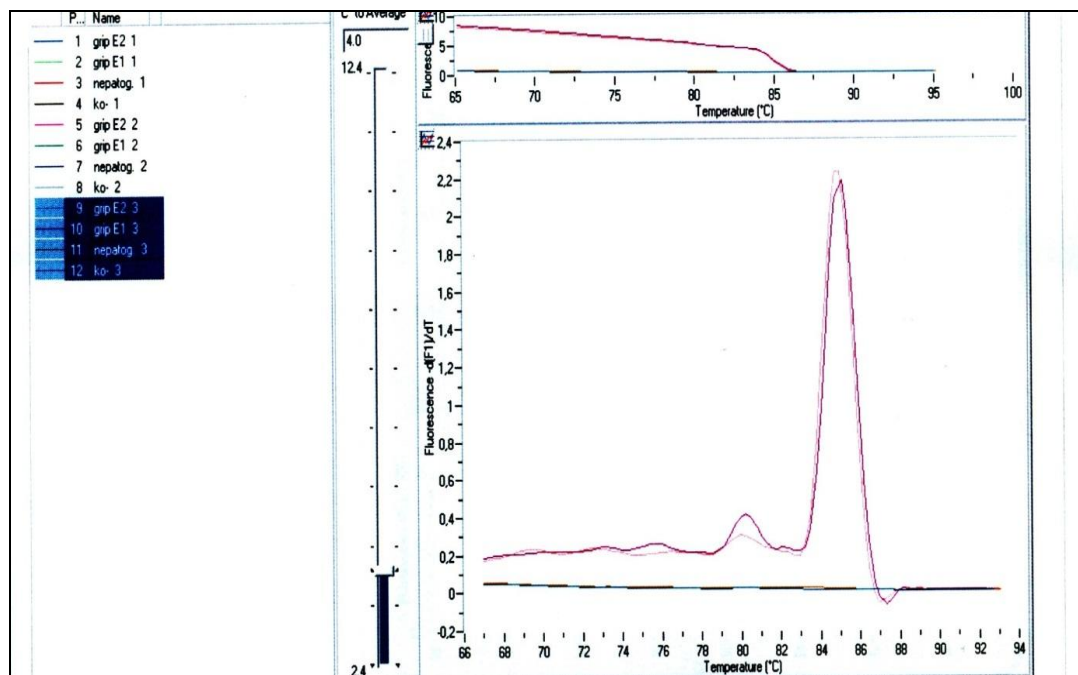
Příl. 3 Koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů 4 mM



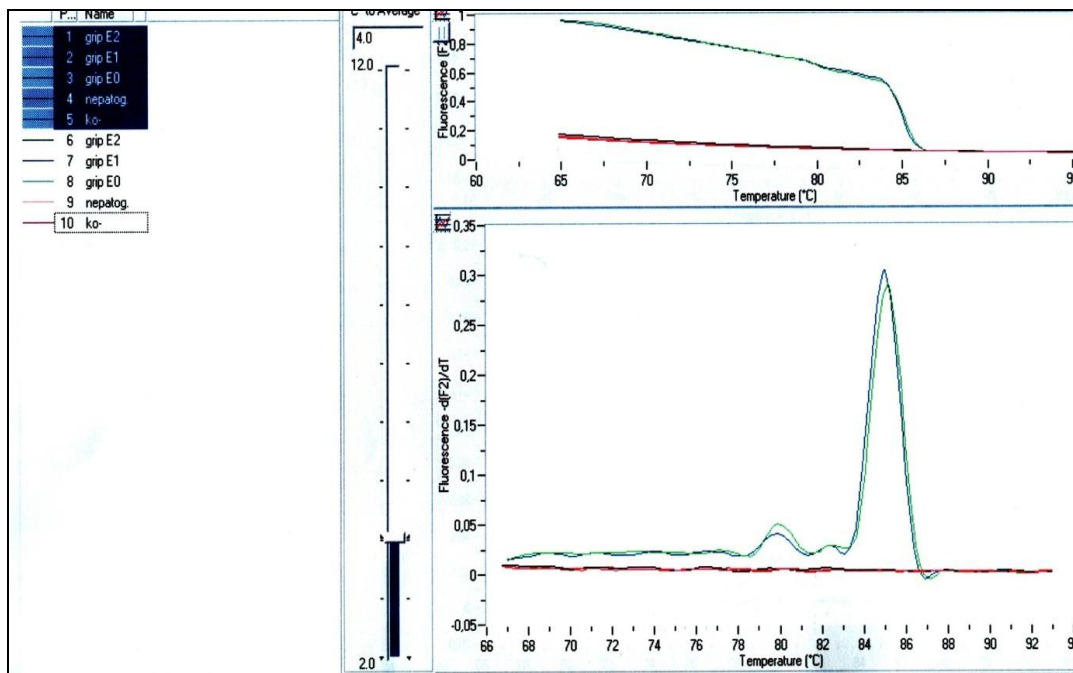
Příl. 4 Koncentrace  $Mg^{2+}$  iontů 2,5 mM



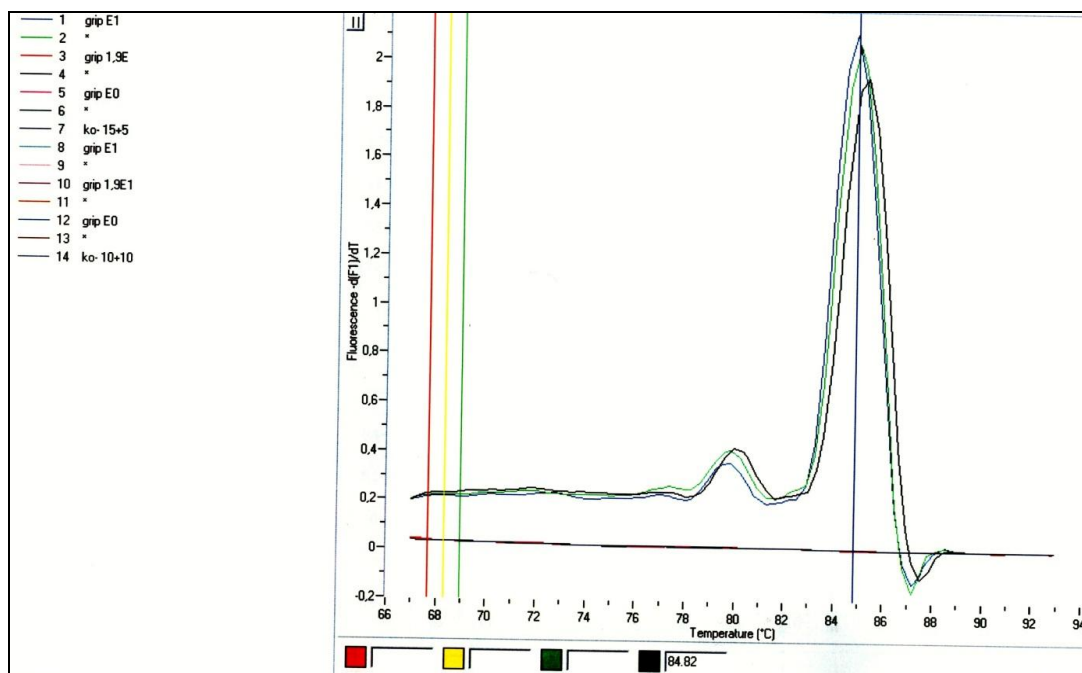
**Příl. 5** Koncentrace primerů 0,3  $\mu\text{M}$  F primer a 0,9  $\mu\text{M}$  R primer



**Příl. 6** Koncentrace primerů 0,9  $\mu\text{M}$  F primer a 0,9  $\mu\text{M}$  R primer

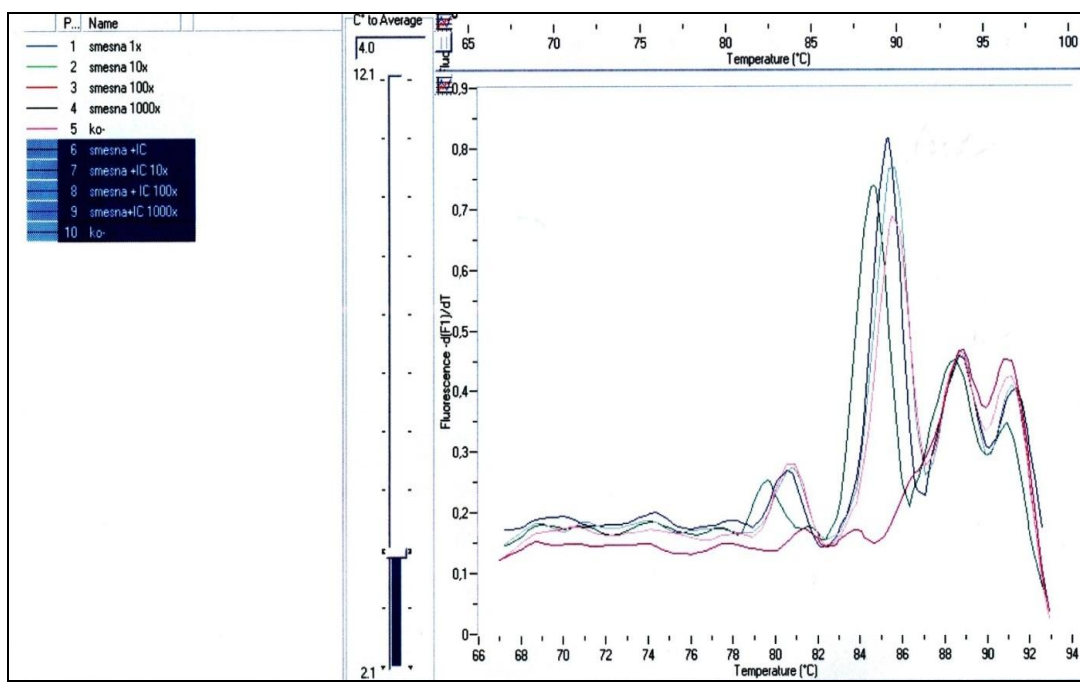


Příl. 7 Optimalizace množství MM : templátová DNA 18  $\mu$ l : 2  $\mu$ l

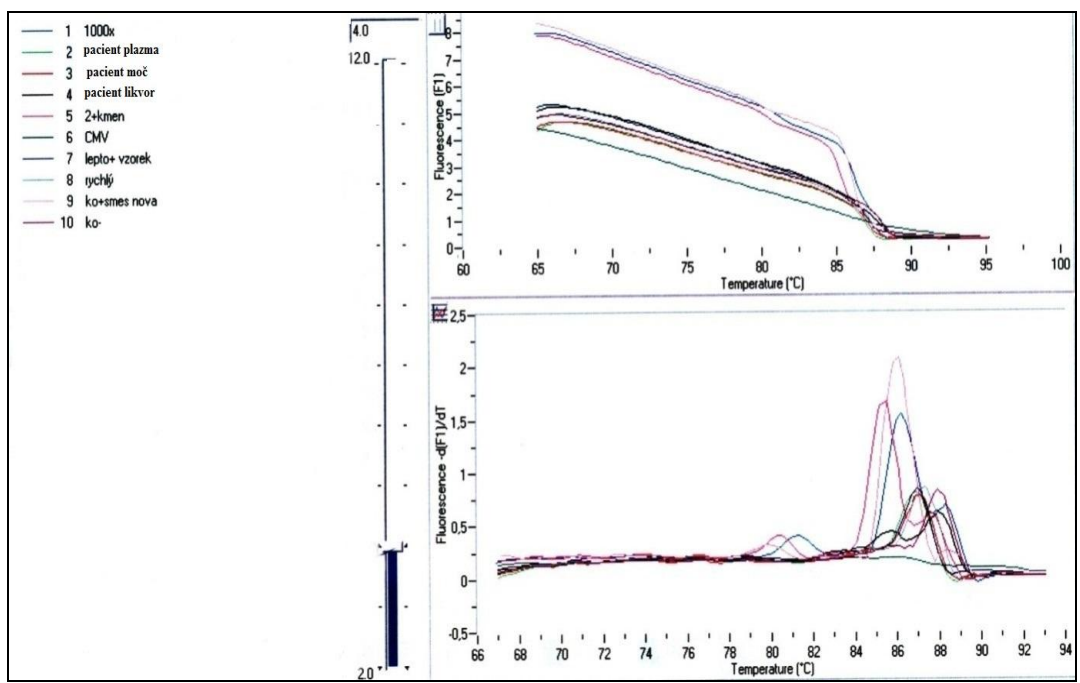


Příl. 8 Optimalizace množství MM : templátová DNA 15  $\mu$ l : 5  $\mu$ l a 10  $\mu$ l : 10  $\mu$ l

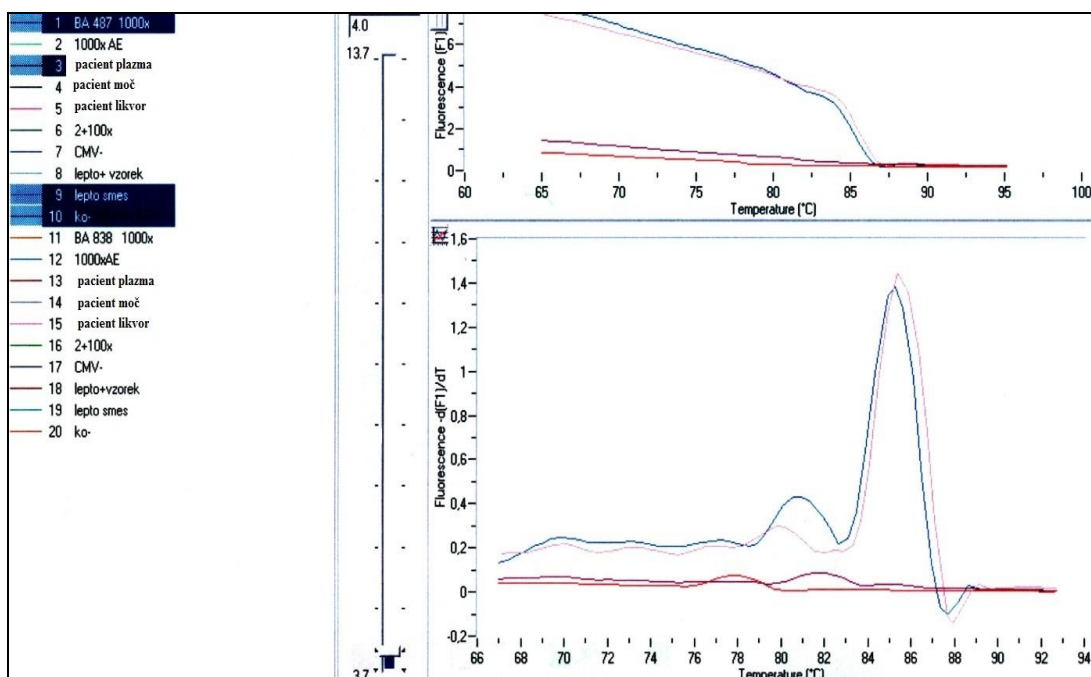




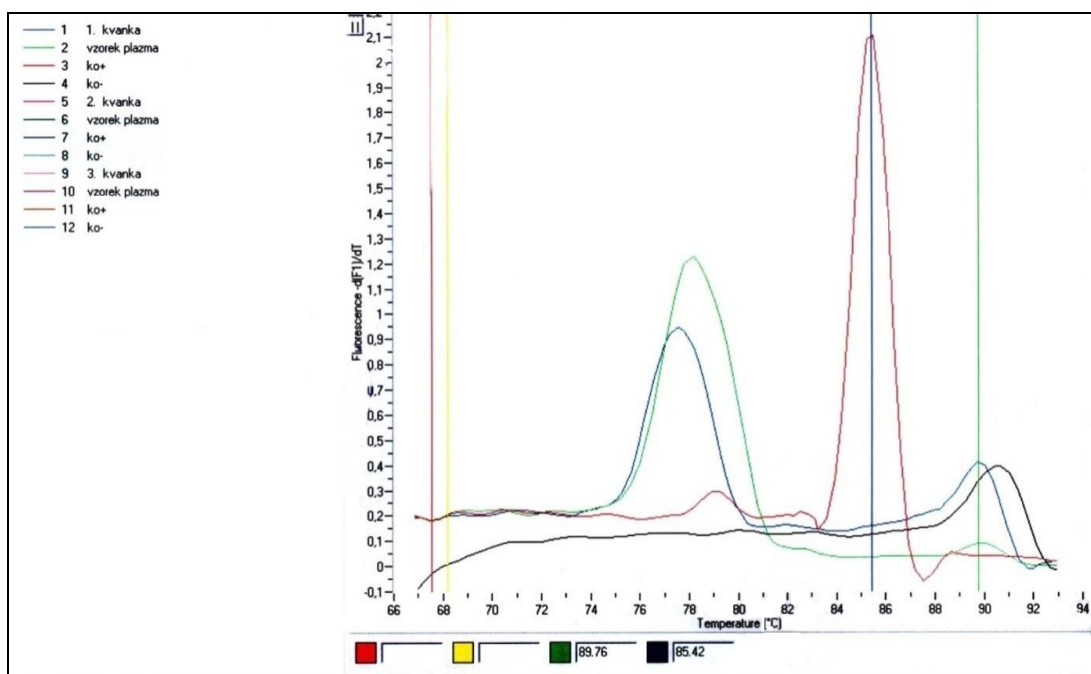
Příl. 9 IC 309



Příl. 10 IC HLA DQ

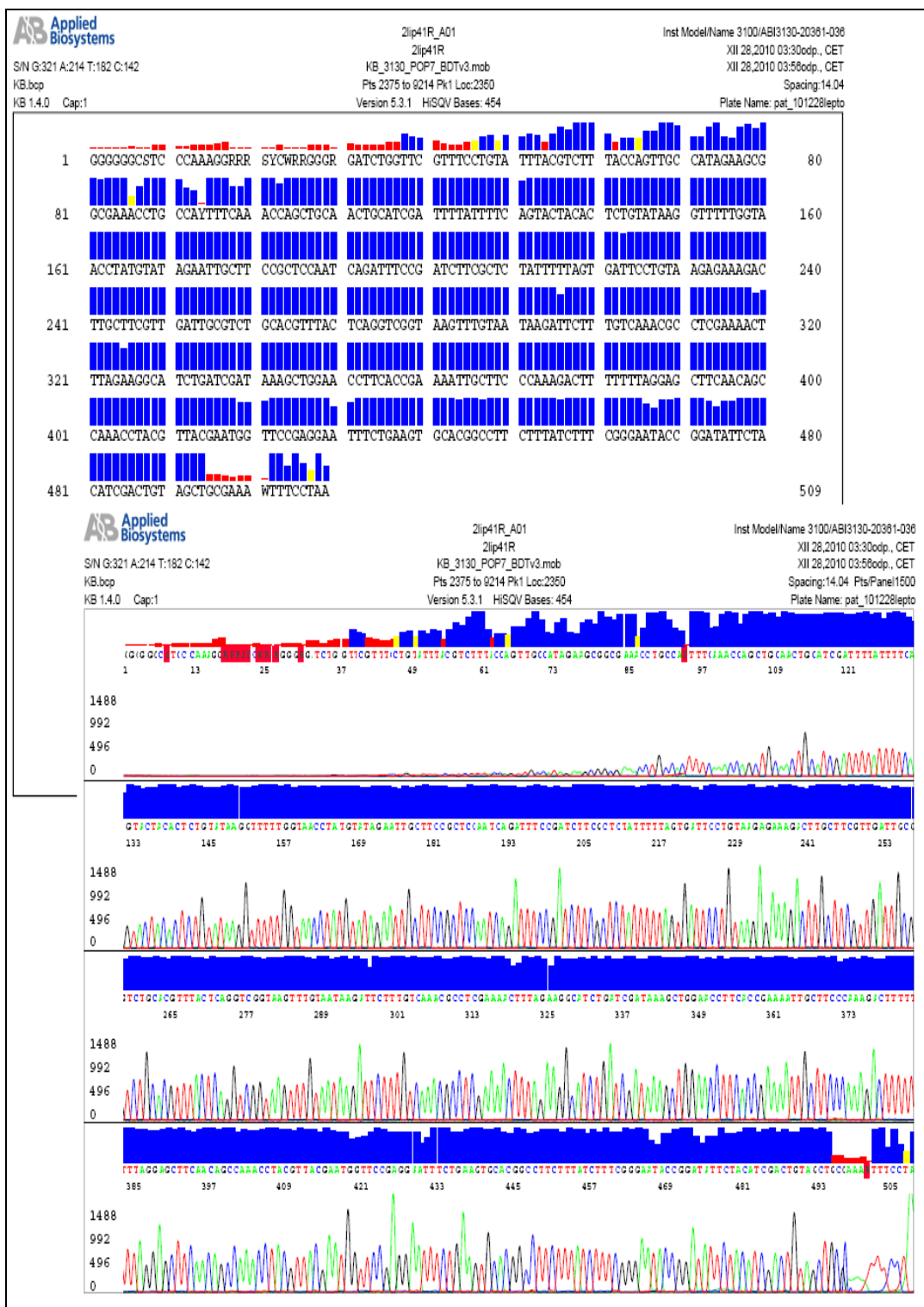


**Příl. 11** Inhibiční kontrola IC 487



**Příl. 12** Optimalizace množství IC 0,4 µl





Příl. 14 Ukázka sekvenačních dat a elektroferogramu *Leptospira copenhageni* Lebe pro gen lipL41

```

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

seq1L.copenhageniLEBE      -----TTGCACCATACGTATTACCGCGGCTGCTGGYACGTAGTTAGCCGG 45
seq3L.grippotyphosaZ6     --CGCTTGACCATACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGG 48
seq7L.polonica             --CGCTTGACCATACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGG 48
seq5L.istricalJ20        ---GCTTGACCATACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGG 47
seq6L.canicola            -----GCACCATACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGG 43
seq2L.grippotyphosaP125  AACGCTTGACCATACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGG 50
seq4L.sejroem84           -----TTAGCCGG 8
seq8L.sorex               -----CGTAGTTAGCCGG 13
seq9pacient               -----

seq1L.copenhageniLEBE      TGCTTTAGGCAGGTACCATCATCACATTGCTGCTTATTTTTCCCTGCTTA 95
seq3L.grippotyphosaZ6     TGCTTTAGGCAGGTACCATCATCACATTGCTGCTTATTTTTCCCTGCTTA 98
seq7L.polonica            TGCTTTAGGCAGGTACCATCATCACATTGCTGCTTATTTTTCCCTGCTTA 98
seq5L.istricalJ20        TGCTTTAGGCAGGTACCATCATCACATTGCTGCTTATTTTTCCCTGCTTA 97
seq6L.canicola            TGCTTTAGGCAGGTACCATCATCACATTGCTGCTTATTTTTCCCTGCTTA 93
seq2L.grippotyphosaP125  TGCTTTAGGCAGGTACCATCATCACATTGCTGCTTATTTTTCCCTGCTTA 100
seq4L.sejroem84           TGCTTTAGGCAGGTACCATCATCACATTGCTGCTTATTTTTCCCTGCTTA 58
seq8L.sorex               TGCTTTAGGCAGGTACCATCATCACATTGCTGCTTATTTTTCCCTGCTTA 63
seq9pacient               -GCTTTAGGCAGGTACCATCATCACATTGCTGCTTATTTTTCCCTGCTTA 49
*****

seq1L.copenhageniLEBE      CTGAACTTTACAATCCGAAGACCTTCATCGTTCACGCGGCGTCGCTGCTT 145
seq3L.grippotyphosaZ6     CTGAACTTTACAATCCGAAGACCTTCATCGTTCACGCGGCGTCGCTGCTT 148
seq7L.polonica            TTTGAACTTTACAATCCGAAGACCTTCATCGTTCACGCGGCGTCGCTGCTT 148
seq5L.istricalJ20        TTTGAACTTTACAATCCGAAGACCTTCATCGTTCACGCGGCGTCGCTGCTT 147
seq6L.canicola            CTGAACTTTACAATCCGAAGACCTTCATCGTTCACGCGGCGTCGCTGCTT 143
seq2L.grippotyphosaP125  CTGAACTTTACAATCCGAAGACCTTCATCGTTCACGCGGCGTCGCTGCTT 150
seq4L.sejroem84           TTTGAACTTTACAATCCGAAGACCTTCATCGTTCACGCGGCGTCGCTGCTT 108
seq8L.sorex               TTTGAACTTTACAATCCGAAGACCTTCATCGTTCACGCGGCGTCGCTGCTT 113
seq9pacient               CTGAACTTTACAATCCGAAGACCTTCATCGTTCACGCGGCGTCGCTGCTT 99
*****

seq1L.copenhageniLEBE      CAGGGTTCCCCCATTGAGCAAGATTCTTAACTGCTGCCCTCCCGTAGGAG 195
seq3L.grippotyphosaZ6     CAGGGTTCCCCCATTGAGCAAGATTCTTAACTGCTGCCCTCCCGTAGGAG 198
seq7L.polonica            CAGGGTTCCCCCATTGAGCAAGATTCTTAACTGCTGCCCTCCCGTAGGAG 198
seq5L.istricalJ20        CAGGGTTCCCCCATTGAGCAAGATTCTTAACTGCTGCCCTCCCGTAGGAG 197
seq6L.canicola            CAGGGTTCCCCCATTGAGCAAGATTCTTAACTGCTGCCCTCCCGTAGGAG 193
seq2L.grippotyphosaP125  CAGGGTTCCCCCATTGAGCAAGATTCTTAACTGCTGCCCTCCCGTAGGAG 200
seq4L.sejroem84           CAGGGTTCCCCCATTGAGCAAGATTCTTAACTGCTGCCCTCCCGTAGGAG 158
seq8L.sorex               CAGGGTTCCCCCATTGAGCAAGATTCTTAACTGCTGCCCTCCCGTAGGAG 163
seq9pacient               CAGGGTTCCCCCATTGAGCAAGATTCTTAACTGCTGCCCTCCCGTAGGAG 149
*****

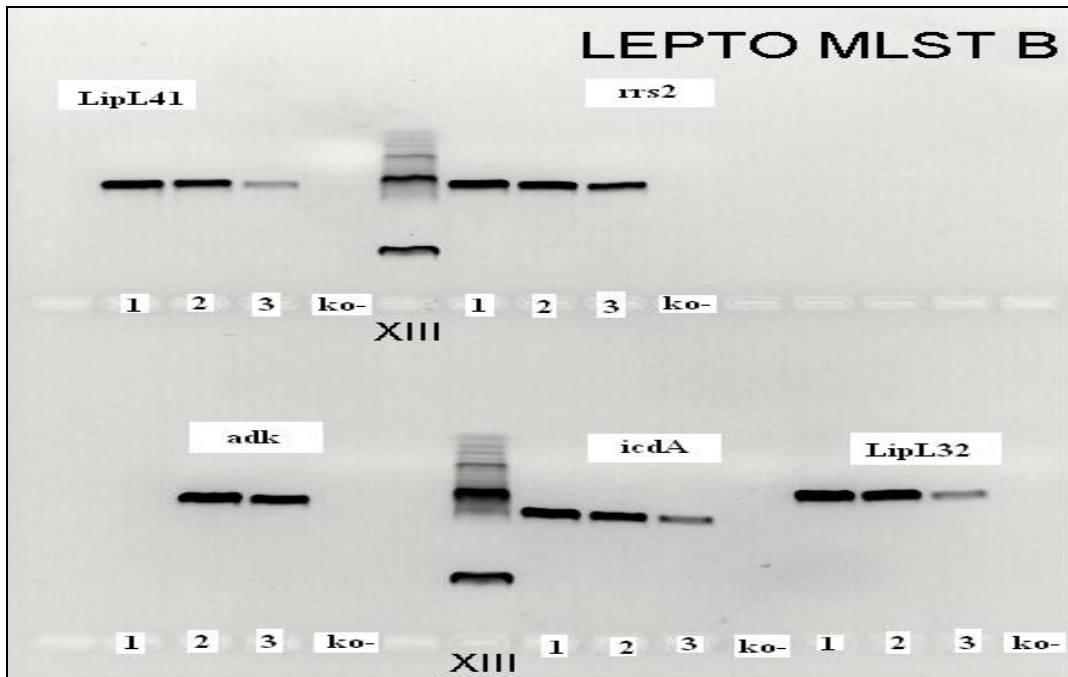
seq1L.copenhageniLEBE      TATGGACCGTGTCTCAGTTCATTGTGGCCGAACACCCTCTCAGGCCGGC 245
seq3L.grippotyphosaZ6     TATGGACCGTGTCTCAGTTCATTGTGGCCGAACACCCTCTCAGGCCGGC 248
seq7L.polonica            TATGGACCGTGTCTCAGTTCATTGTGGCCGAACACCCTCTCAGGCCGGC 248
seq5L.istricalJ20        TATGGACCGTGTCTCAGTTCATTGTGGCCGAACACCCTCTCAGGCCGGC 247
seq6L.canicola            TATGGACCGTGTCTCAGTTCATTGTGGCCGAACACCCTCTCAGGCCGGC 243
seq2L.grippotyphosaP125  TATGGACCGTGTCTCAGTTCATTGTGGCCGAACACCCTCTCAGGCCGGC 250
seq4L.sejroem84           TATGGACCGTGTCTCAGTTCATTGTGGCCGAACACCCTCTCAGGCCGGC 208
seq8L.sorex               TATGGACCGTGTCTCAGTTCATTGTGGCCGAACACCCTCTCAGGCCGGC 213
seq9pacient               TATGGACCGTGTCTCAGTTCATTGTGGCCGAACACCCTCTCAGGCCGGC 199
*****

seq1L.copenhageniLEBE      TACCGATCGYCGCCTTGGTGAGCCTTACCTCACCAACTAGCTAATCGGA 295
seq3L.grippotyphosaZ6     TACCGATCGTCCGCTTGGTGAGCCTTACCTCACCAACTAGCTAATCGGA 298
seq7L.polonica            TACCGATCGTCCGCTTGGTGAGCCTTACCTCACCAACTAGCTAATCGGG 298
seq5L.istricalJ20        TACCGATCGTCCGCTTGGTGAGCCTTACCTCACCAACTAGCTAATCGGG 297
seq6L.canicola            TACCGATCGTCCGCTTGGTGAGCCTTACCTCACCAACTAGCTAATCGGA 293
seq2L.grippotyphosaP125  TACCGATCGTCCGCTTGGTGAGCCTTACCTCACCAACTAGCTAATCGGA 300
seq4L.sejroem84           TACCGATCGTCCGCTTGGTGAGCCTTACCTCACCAACTAGCTAATCGGG 258
seq8L.sorex               TACCGATCGTCCGCTTGGTGAGCCTTACCTCACCAACTAGCTAATCGGG 263
seq9pacient               TACCGATCGTCCGCTTGGTGAGCCTTACCTCACCAACTAGCTAATCGGA 249
*****

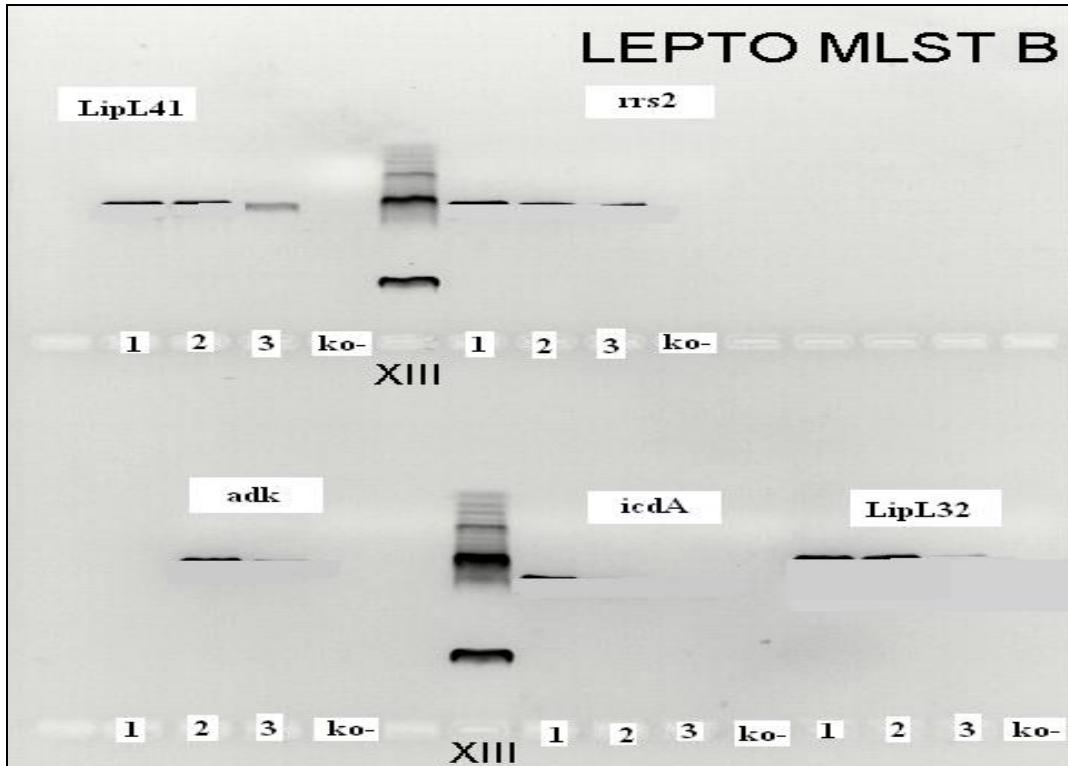
```

seq1L.copenhageniLEBE	CGCGGGCTCATCTCCGAGCAATAAATCTTTACCCGAAAAATCTTATGATC	345
seq3L.grippotyphosaZ6	CGCGGGCTCATCTCCGAGCAATAAATCTTTACCCGAAAAATCTTATGATC	348
<del>seq7L.polonica</del>	CGCGGGCTCATCTCCGAGCAATAAATCTTTACCCGAAAAATCTTATGATC	348
<del>seq5L.istricalJ20</del>	CGCKGGCTCATCTCCGAGCAATAAATCTTTACCCGAAAAATCTTATGATC	347
<del>seq6L.canicola</del>	CGCGGGCTCATCTCCGAGCAATAAATCTTTACCCGAAAAATCTTATGATC	343
seq2L.grippotyphosaP125	CGCGGGCTCATCTCCGAGCAATAAATCTTTACCCGAAAAATCTTATGATC	350
seq4L.sejroeM84	CGCGGGCTCATCTCCGAGCAATAAATCTTTACCCGAAAAATCTTATGATC	308
<del>seq8L.sorex</del>	CGCGGGCTCATCTCCGAGCAAWAAATCTTTACCCGAAAAATCTTATGATC	313
seq9pacient	CGCGGGCTCATCTCCGAGCAATAAATCTTTACCCGAAAAATCTTATGATC	299
	*** ***** **	
seq1L.copenhageniLEBE	TCTCGGGACCATCCAGTATTAGCTTCCCTTTCCGAAAGTTATCCAGACT	395
seq3L.grippotyphosaZ6	TCTCGGGACCATCCAGTATTAGCTTCCCTTTCCGAAAGTTATCCAGACT	398
<del>seq7L.polonica</del>	TCTCGGGACTATCCAGTATTAGCTTCCCTTTCCGAAAGTTATCCAGACT	398
<del>seq5L.istricalJ20</del>	TCTCGGGACTATCCAGTATTAGCTTCCCTTTCCGAAAGTTATCCAGACT	397
seq6L.canicola	TCTCGGGACCATCCAGTATTAGCTTCCCTTTCCGAAAGTTATCCAGACT	393
seq2L.grippotyphosaP125	TCTCGGGACCATCCAGTATTAGCTTCCCTTTCCGAAAGTTATCCAGACT	400
seq4L.sejroeM84	TCTCGGGACTATCCAGTATTAGCTTCCCTTTCCGAAAGTTATCCAGACT	358
<del>seq8L.sorex</del>	TCTCGGGACTATCCAGTATTAGCTTCCCTVTCGAAAGTTATCCAGACT	363
seq9pacient	TCTCGGGACCATCCAGTATTAGCTTCCCTTTCCGAAAGTTATCCAGACT	349
	***** **	
<del>seq1L.copenhageniLEBE</del>	<del>CGGAGGAAGATTACCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCGCTGAGTATTGC</del>	<del>445</del>
seq3L.grippotyphosaZ6	CGGAGGAAGATTACCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCGCTGAGTATTGC	448
seq7L.polonica	CGGAGGAAGATTACCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCGCTGAGTATTGC	448
seq5L.istricalJ20	CGGAGGAAGATTACCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCGCTGAGTATTGC	447
<del>seq6L.canicola</del>	<del>CGGAGGAAGATTACCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCGCTGAGTATTGC</del>	<del>443</del>
seq2L.grippotyphosaP125	CGGAGGAAGATTACCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCGCTGAGTATTGC	450
seq4L.sejroeM84	CGGAGGAAGATTACCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCGCTGAGTATTGC	408
seq8L.sorex	CGGAGGAAGATTACCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCGCTGAGTATTGC	413
seq9pacient	CGGAGGAAGATTACCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCGCTGAGTATTGC	399
	* ***** **	
seq1L.copenhageniLEBE	TACTCCGCTT-	455
seq3L.grippotyphosaZ6	TACTCCGC---	456
seq7L.polonica	TACTCCGC---	456
seq5L.istricalJ20	TACTCCGC---	455
seq6L.canicola	TACTCCGC---	451
seq2L.grippotyphosaP125	TACTC-----	455
seq4L.sejroeM84	TACTCCGCT--	417
seq8L.sorex	TACTCCGCTTG	424
seq9pacient	TACTCCGCTTG	410
	*****	

Příl. 15 Ukázka určení sérovaru (genomospecies) prokázané leptospiry u konkrétního pacienta.



Příl. 16 Pufir TAKARA



Příl. 17 Pufir MOLZYME

