

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



Molekulárně biologické metody v laboratorní diagnostice patogenních leptospir

Petra Kučerová

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program
Lékařská mikrobiologie

Hradec Králové

2013

Disertační práce byla vypracována v rámci *prezenčního* studia doktorského studijního programu Lékařská mikrobiologie na Ústavu klinické mikrobiologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: Mgr. Petra Kučerová, Ústav klinické mikrobiologie LF a FN HK

Školitel: MVDr. Zuzana Čermáková, Ph.D., Ústav klinické mikrobiologie LF a FN HK

Školitel konzultant: -

Oponenti: 1) Doc. MUDr. Vilma Marešová, CSc., Infekční klinika 2. LF UK a IPVZ, Nemocnice Na Bulovce, Budínova 2, 180 81 Praha 8, tel.: 266 082 620, 266 083 198, e – mail - vilma.maresova@bulovka.cz
2) Prof. MVDr. František Tremel CSc., Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, tel. 728 159 174, e – mail tremelf@vfu.cz

Tato práce vznikla za podpory grantu Ministerstva obrany České republiky POV 907 980 „Leptospiroza - vyhodnocení rizika a nové možnosti detekce“

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

Doc. RNDr. Vladimír Buchta, CSc.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská mikrobiologie

1. OBSAH

1. OBSAH	2
2. SOUHRN	3
3. SUMMMARY	4
4. ÚVOD DO PROBLEMATIKY	5
5. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	6
6. MATERIÁL A METODIKA	7
6.1 MATERIÁL	7
6.1.1 Laboratorní kmeny	7
6.1.2 Biologické materiály získané od pacientů suspektních na leptospirozu	7
6.1.3 Vzorky z vnějšího prostředí	7
6.1.4 Epidemiologické šetření výskytu leptospirozy v Královéhradeckém, Pardubickém kraji a části kraje Vysočina	8
6.1.5 Krevní séra	8
6.2 METODY	9
6.2.1 Rt PCR metoda detekující gen kódující povrchový lipoprotein LipL32	9
6.2.2 MLST analýza	11
6.2.3 Epidemiologické šetření výskytu leptospirozy v Královéhradeckém, Pardubickém kraji a části kraje Vysočina	13
6.2.4 Serion ELISA classic <i>Leptospira</i> IgM/IgG	13
6.2.5 MAT	13
7. VÝSLEDKY	14
7.1 Rt PCR metoda detekce genu kódujícího povrchový lipoprotein LipL32	14
7.1.1 Ověření pozitivní analytické specifity	14
7.1.2 Ověření negativní analytické specifity	14
7.1.3 Ověření detekčního limitu	14
7.1.4 Výsledky rt PCR detekce genu pro LipL32 u laboratorních kmenů leptospir	14
7.1.5 Výsledky rt PCR vyšetření u pacientů suspektních na leptospirozu	14
7.1.6 Výsledky rt PCR vyšetření pro povrchové vody a vlhké substráty	14
7.2 Výsledky MLST analýzy	14
7.2.1 Výsledky MLST analýzy u 11 laboratorních kmenů patogenních leptospir vyskytujících se na území ČR	14
7.3 Výsledky vyhodnocení výskytu leptospirozy v Pardubickém, Královéhradeckém kraji a části kraje Vysočina v letech 2002 - 2013	15
7.4 Serion ELISA classic <i>Leptospira</i> IgM/IgG	16
7.4.1 Výsledky ELISA vyšetření krevních sér příslušníků AČR na přítomnost specifických IgM/IgG protilátek proti leptospirám	16
7.4.2 Stanovení diagnostické senzitivity a specifity soupravy Serion ELISA classic leptospira IgM/IgG	16
8. DISKUZE	18
9. ZÁVĚRY	21
10. POUŽITÁ LITERATURA	23
11. PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA	26
11.1. Původní práce	26
11.1.1 Recenzované časopisy	26
11.1.2 Časopisy s IF	26
11.2. Přehledové práce	26
11.2.1 Časopisy s IF	26
11.3. Přednášky na odborných setkáních	27

2. 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 vykazala velmi dobrou analytickou pozitivní i negativní specifitu, kdy se obě hodnoty rovnaly 100 %. Na 230 laboratorních kmenech leptospir ze sbírkových kultur Royal Tropical Institute v Holandsku byla real-time PCR odzkoušena. Mez detekce byla stanovena na 1 – 5 kopií genomu / ml tekutého biologického materiálu. 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 (3,2 %) biologických materiálů bylo vyhodnoceno jako LipL32 pozitivní.

Real-time PCR byla použita 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, ovšem výsledek jejich sekvenční analýzy byl opakovaně „nekultivovatelné bakterie“. Všechny vzorky byly vyhodnoceny jako negativní. Z uvedené skutečnosti je zřejmé, že metoda není vhodná pro testování takto náročných materiálů

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 u mužů (n = 71; 70,3 %) než u žen (n = 30; 29,7 %). Maximum incidence bylo zaznamenáno v roce 2002 (celkem 21 osob) a 2005 (celkem 25 osob), kdy Českou republiku postihly jak rozsáhlé, tak lokální povodně. Nejvyšší počet pozitivních pacientů byl zaznamenán v měsíci listopadu (celkem 20 případů). Nejfrekventovanějším infikujícím typem byl v naší studii sérovar *Leptospira grippotyphosa* (n=43; 42,6 %).

Pro konfirmaci výsledků real-time PCR analýzy byly využity metody mikroaglutinačního a ELISA testu. Vyšetřením 1553 příslušníků Armády České republiky bylo ELISA metodou na přítomnost specifických protilátek určeno ve třídě IgM 292 (18,8 %) a v 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

3. SUMMARY

Title: „Molecular biological methods in laboratory diagnosis of pathogenic leptospire“

During Ph.D. study programme 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 % 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 persons from whom 15 biological materials originated as LipL32 positive were 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. From mention is clear that this method is not suitable for testing these materials.

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 leptospire 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 LipL32 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 (total 21 persons) and 2005 (total 25 persons), when the Czech Republic was affected both large and local flooding. The most frequent infectious type in our study was serovar *Leptospira grippotyphosa* (n = 43; 42,6 %).

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 as leptospira-positive were determined. The vast majority of these 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.

4. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

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 se zvyšuje v rozvojových 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 až 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].

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].

Laboratorní diagnostika tohoto infekčního onemocnění se odvíjí od jeho typického dvojfázového průběhu. 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].

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 leptospirozy a přípravu standardních operačních postupů pro laboratorní účely. Navržená molekulárně biologická metodika byla ověřena na pacientech se suspektní leptospirozou a výsledky byly porovnány s metodou ELISA a potvrzeny 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.

5. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

- a) Zavést do klinického provozu vhodnou PCR metodu pro laboratorní diagnostiku akutní formy leptospirózy.
- b) Určit vhodnou metodiku pro sekvenaci 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 specificity a senzitivity MAT a Serion ELISA classic *Leptospira* IgM/IgG

6. MATERIÁL A METODIKA

6.1 MATERIÁL

6.1.1 Laboratorní kmeny

6.1.1.1 Laboratorní kmeny *Leptospira* a dalších bakterií

Pro určení pozitivní analytické specifity real-time (rt) PCR bylo použito 11 laboratorních kmenů patogenních leptospir, jež se vyskytují na území České republiky (*L. icterohaemorrhagiae* Fryšava, *L. copenhageni* Lebe, *L. grippityphosa* P125, *L. grippityphosa* 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 (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 otestování negativní analytické specifity byla ověřena následující infekční agens: *Escherichia (E.) coli* referenční kmen ATCC 11775, *Streptococcus (Str.) pneumoniae* referenční kmen ATCC 49619, *Borrelia (B). burgdorferi* (klinický izolát), CMV (klinický izolát) a *L. biflexa* laboratorní kmen Patoc Patoc I.

6.1.1.2 Referenční kmeny *Leptospira*, Royal Tropical Institute, Holandsko

Analyzovaný soubor 11 laboratorních kmenů patogenních leptospir vyskytujících se na území ČR byl postupně doplněn o 230 certifikovaných laboratorních kmenů leptospir (218 z patogenních, 7 z nepatogenních genomospecies, u 5 nebylo dle přiložených certifikátů genomospecies možné určit), které byly získány ze sbírky Královského tropického institutu (Royal tropical Institute) v Holandsku.

6.1.2 Biologické materiály získané od pacientů suspektních na leptospirózu

Od dubna 2010 – do dubna 2013 bylo na společném 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 rt PCR metodou. Za pacienty suspektní na leptospirózu jsou považovány osoby, které trpí uvedenými klinickými příznaky: bolesti hlavy, svalů, kloubů, horečka, hepatální příznaky, renální postižení, hepatorenální insuficience, akutní respirační distress syndrom, pneumonie, srdeční insuficience, petechie, hemoragická diatéza, aseptická meningitida, popř. mají v anamnéze pobyt v přírodě, koupání ve vodě v přírodě, kontakt s hlodavci, práce v zemědělství, veterinární lékaři apod.

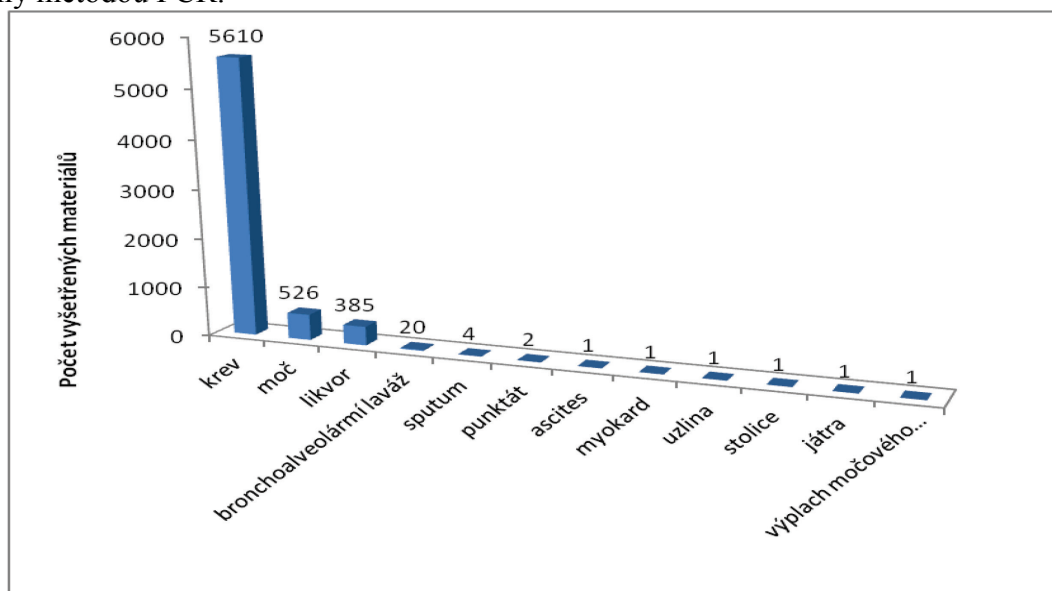
6.1.3 Vzorky z vnějšího prostředí

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 čistírně 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.

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

V epidemiologické retrospektivní 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.



6.1.5 Krevní séra

6.1.5.1 Krevní séra analyzovaná soupravou Serion 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. Současně s odběrem krevního séra byl všemi příslušníky AČR podepsán informovaný souhlas příslušníka a byl vyplněn krátký dotazník

6.1.5.2 Krevní séra pro stanovení diagnostické specifity a senzitivity ELISA soupravy

Do studie bylo celkem zařazeno 45 krevních sér od 45 pacientů. Byla analyzována krevní séra (n = 10) získaná od pacientů s laboratorně a klinicky potvrzenou leptospirózou. Další krevní séra (n = 10) byla od pacientů vyšetřených metodou MAT, u nichž byl výsledek tohoto sérologického vyšetření opakovaně negativní. Zbývajících 25 krevních sér 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 u dvou pacientů byla ještě diagnostikována roztroušená skleróza (RS). Všechny vzorky byly popsány, anonymizovány přidělením pořadových čísel a od pacientů byl získán informovaný souhlas.

6.1.5.3 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 (6.1.2) a všechna krevní séra vyšetřená ELISA testem (viz. 6.1.5.1). Pro detekci protilátek byly použity živé laboratorní kmeny patogenních leptospir (viz 6.1.1.1.).

6.2 METODY

6.2.1 Rt PCR metoda detekující gen kódující povrchový lipoprotein LipL32

6.2.1.1 Princip metodiky

Pro detekci DNA patogenních leptospir byla použita metoda rt PCR, v jejímž průběhu byly využity primery z oblasti genu *lipL32*, jež 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. Identifikace DNA patogenních leptospir byla realizována za použití 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 i kontrola inhibice DNA polymerázy, jež byla uskutečněna ve vedlejší reakci amplifikací lidského beta globinového genu metodou PCR s následnou elektroforetickou detekcí. Při modifikaci metody byla detekce inhibice DNA polymerázy následně realizována v jedné reakci v rámci provedení rt PCR analýzy.

6.2.1.2 Vyšetřovaný materiál, doporučená množství biologického materiálu, podmínky transportu a uchovávání 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.

6.2.1.3 Izolace DNA

Izolace DNA patogenních leptospir v moči, séru a likvoru byla realizována za použití komerčního kitu QIAamp® DNA Mini Kit (250) (Qiagen, Roche, Penzberg, Německo) [30].

6.2.1.4 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 I) dle metodiky autorů Levett a kol. (2005) [31]. Specifické primery byly vybrány z oblasti genu *lipL32* a amplifikace byla uskutečněna na přístroji LightCycler 1.5 (viz tab. 1). 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. 1 Rozpis amplifikačních směsí („master mixu“):

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

b) Modifikace rt PCR metody – inhibiční kontrola integrována do jedné reakce

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. 2

Tab. 2 Rozpis amplifikačních směsí + inhibiční kontrola („master mixu“)

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

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 x

2. analýza teploty tání

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

40 °C 20 s, rozmezí teplot 65 – 95 °C

6.2.1.5 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.

6.2.2 MLST analýza

MLST analýza byla provedena podle metodiky navržené autory Ahmed a kol. (2006) [32]. Bylo vybráno 5 cílových genů: *adk* gen (amplifikační produkt o velikosti 531 bp), *icdA* 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) [32].

6.2.2.1 Sekvence použitých primerů [32]:

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

F - 5'GGGCTGGAAAAGGTACACAA3'

R - 5'ACGCAAGCTCCTTTTGAATC3'

icdA 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'

6.2.2.2 PCR amplifikace

PCR amplifikace 5 rozličných cílových genů byla uskutečněna v 5 oddělených reakcích za použití následující reakční směsi (viz. tab. 3) na cykléru 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, USA):

Tab. 3 Příprava PCR reakční směsi pro MLST analýzu

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

Zvolený teplotní profil:

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

6.2.2.3 Detekce PCR amplikonu

Detekce na agarózovém gelu

Všechny PCR amplikony 5 detekovaných cílových genů byly posléze odděleně identifikovány za použití gelové elektroforézy, jež byla provedena na agarózovém gelu (koncentrace agarózy 2 %) s integrovaným interkalačním fluorescenčním barvivem Ethidium bromid.

6.2.2.4 Přečištění PCR amplikonů

Přečištění PCR amplikonů bylo uskutečněno pomocí kitu InnuPREP PCRpure Kit (Analytik Jena, Jena, Německo) [33].

6.2.2.5 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' → 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 [34].

Teplotní profil sekvenační reakce

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

4°C do vyhodnocení

6.2.2.6 Přečištění produktů sekvenační reakce

Přečištění produktů sekvenační reakce bylo provedeno soupravou Innu PREP DYE pure Kit (Analytik Jena, Jena, Německo) [35].

6.2.2.7 Detekce produktů sekvenční 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.

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

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.

6.2.4 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. Při praktickém provedení testování se postupovalo dle instrukcí obsažených v návodu soupravy [36].

6.2.5 MAT

MAT byl proveden standardně používanou metodikou, která je doporučována Světovou zdravotnickou organizací [37].

7. VÝSLEDKY

7.1 Rt PCR metoda detekce genu kódujícího povrchový lipoprotein LipL32

7.1.1 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. sejroae* 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*

7.1.2 Ověření negativní analytické specifity

U všech laboratorních kmenů určených jako kontrola negativní analytické specifity – *E. coli* referenční kmen ATCC 11775, *Str. pneumoniae* referenční kmen ATCC 49619, *B. burgdorferi* (klinický izolát), CMV (klinický izolát) a *L. biflexa* kmen Patoc Patoc I byl výsledek rt PCR vyšetření vždy negativní, u žádného uvedeného mikroorganismu nebyl detekován gen *lipl32*.

7.1.3 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

7.1.4 Výsledky rt PCR detekce genu pro LipL32 u laboratorních kmenů leptospir

Výsledky vyšetření u laboratorních kmenů získaných z Royal Tropical Institute v Holandsku byly následující: u 218 laboratorních kmenů patogenních leptospir byl výsledek rt PCR vyšetření genu *lipl32* vždy pozitivní, u 7 nepatogenních vždy negativní.

7.1.5 Výsledky rt PCR vyšetření u pacientů suspektních na leptospirózu

Z 295 pacientů se suspektní leptospirózou bylo 9 osob (3,1 %) LipL32 pozitivní a od nich pocházelo 15 (3,3 %) pozitivních biologických materiálů (10× moč, 4× krevní plazma, 1× likvor). Jak bylo ověřeno u klinických pracovníků, všechny rt PCR pozitivní biologické materiály byly odebrány v prvním týdnu onemocnění a před zahájením antibiotické terapie.

7.1.6 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 konfirmovány na pracovišti Ústavu klinické biochemie a diagnostiky LF a FN HK s negativním výsledkem. Poté byla provedena sekvenační analýza pro konečnou konfirmaci výsledků vyšetření. V sekvenační analýze byl opakovaně prokázán výsledek „nekultivovatelné bakterie“. Všechny vzorky byly tedy vyhodnoceny jako negativní.

7.2 Výsledky MLST analýzy

7.2.1 Výsledky MLST analýzy 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 genomospecíes (*L. interrogans*, *L. kirschneri* a *L. borgpetersenii*) byla použita metoda MLST. Při provedení MLST analýzy byly detekovány následující geny: *adk*, *icdA*, *lipl41*, *rrs2* (16S rRNA) a *lipl32* gen. Byla zjištěna skutečnost, že gen *adk* umožňuje detekci

DNA pouze *L. interrogans*, gen *icdA* detekci *L. interrogans* a *L. kirschneri*, zbývající tři geny (*lipI41*, *rrs2* a *lipI32*) umožňují detekci všech 3 genomospecies přítomných v ČR

7.3 Výsledky vyhodnocení výskytu leptospirózy v Pardubickém, Královéhradeckém kraji a části kraje Vysočina v letech 2002 - 2013

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. Největší počet pozitivních pacientů - mužů (celkem 34, 47,9 %) byl ve věkovém rozmezí 26 - 45 let, u žen (celkem 12, 40,0 %) se dostáváme k obdobným závěrům. 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. 4). 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).

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 %).

Tab. 4 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	1,83
2003	773	11	0,96
2004	681	9	0,78
2005	763	25	2,17
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
celkem	5840	101	-

7.4 Serion ELISA classic *Leptospira* IgM/IgG

7.4.1 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 leptospirozy.

Celkem bylo ELISA metodou vyšetřeno 1553 krevních sér příslušníků AČR na přítomnost specifických protilátek proti leptospirám. Rozpis vyšetřovaných krevních sér je uveden v kapitole 6.1.5.1. Kompletní výsledky vyšetření krevních sér jsou zaznamenány v tab. 5.

Všechna pozitivní krevní séra od příslušníků AČR byla konfirmačně vyšetřena s 11 laboratorními kmeny patogenních leptospir izolovaných v ČR (viz 6.1.1.1) 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. grippityphosa* P125 (8×), *L. grippityphosa* Ž6 (7×), *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava (3×), *L. sorex – jalna* Sorexjalna (3×), *L. copenhageni* Lebe (2×) *L. istrica* J20 (1×), *L. bratislava* Jež Bratislava (1×) a *L. canicola* S392 (1×).

Tab. 5 Souhrnné výsledky vyšetření krevních sér na přítomnost IgM a IgG protilátek proti patogenním leptospirám metodou ELISA

Souhrnné výsledky vyšetření	IgM protilátky		IgG protilátky	
	Počet krevních sér	%	Počet krevních sér	%
Pozitivní	292	18,8	396	25,5
Hraniční	148	9,5	392	25,2
Negativní	1113	71,7	765	49,3
Celkem	1553	100,0	1553	100,0

7.4.2 Stanovení diagnostické senzitivity a specifity soupravy Serion ELISA classic leptospira IgM/IgG

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 %. Při vyšetření zbývajících 35 sér metodou ELISA detekující IgM protilátky proti patogenním leptospirám byly odhaleny celkem 4 falešně pozitivní reakce. Diagnostická specifita ELISA soupravy byla stanovena na 88,6%, pozitivní prediktivní hodnota (PPV) 71,4% a negativní prediktivní hodnota (NPV) 100%.

U diagnostické soupravy pro detekci IgG specifických protilátek byla prokázána nižší specifita. U všech pozitivních leptospirových sér byl sice touto soupravou prokázán pozitivní

výsledek testu, diagnostická senzitivita je rovna 100%, 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. Diagnostická specificita tohoto ELISA kitu detekujícího IgG protilátky byla vyhodnocena pouze 54,3%, PPV 38,5% a NPV 100%.

8. DISKUZE

Rt PCR metoda detekující gen kódující povrchový lipoprotein LipL32

Nově zavedená rt PCR má oproti předešlé konvenční PCR (využívající B I, II a G1 a G2 primery) několik výhod, které spočívají hlavně v její rychlosti (výsledek vyšetření je k dispozici již za 5 h), finanční náklady jsou podstatně nižší než u předešlé PCR metody (je používán pouze jeden set primerů a poloviční množství reagensů 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 x ne a nevíme nic o infikujícím genomospecies. Uvedená skutečnost ale byla již odstraněna zavedením sekvenačních reakcí.

Z výše uvedených faktů vyplývá skutečnost, že zavedená rt PCR metoda je vhodným, citlivým, rychlým a především spolehlivým diagnostickým prostředkem nejenom pro diagnostiku akutní formy leptospirózy, metoda nachází své uplatnění také i v detekci laboratorních kmenů leptospir, popř. i ke zjištění výskytu leptospir v povrchových vodách a vlhkých substrátech.

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 %.

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.

Z celkového počtu 680 odebraných vzorků ze zevního prostředí (povrchové vody, vlhké substráty, ČOV) bylo 5 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

Princip této MLST analýzy spočíval v prvotní izolaci DNA a následné detekci 5 genů : *adk*, *icdA*, *rrs2*, *lipl41* a *lipl32* genů. Byla zjištěna skutečnost, 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. Ze sekvencí 11 laboratorních kmenů patogenních leptospir přítomných na území ČR byla vytvořena knihovna referenčních sekvencí, která následně sloužila pro určení neznámého infikujícího sérovaru (kmene) patogenních leptospir a může být i nadále používána.

V naší studii se nepodařilo odhalit sekvenci nukleotidů specifickou pro Weilovu chorobu a tímto ji jednoznačně odlišit od jiných druhů leptospiróz (polní horečka, nemoc pasáků vepřů, horečka rýžových polí). Pravděpodobným důvodem může být špatná volba cílových genů. V případě získání grantové podpory se pravděpodobně se zaměříme na detekci a sekvenaci genů *pntA*, *sucA*, *pfkB*, *tpiA*, *mreA*, *glmU* and *fadD*, jež jsou popsány v odborné publikaci autorů

Thaipadungpanit a kol. (2007) [38]. Domníváme se, že vyšší počet cílových genů zvýší možnost odhalení požadované sekvence DNA patogenních leptospir typické pro Weilovu chorobu.

Výskyt leptospirózy na části území ČR v letech 2002 – 2013

Z celkového počtu 5840 pacientů suspektních na leptospirózu bylo jako pozitivní vyhodnoceno 101 osob. Onemocnění bylo diagnostikováno u 71 mužů (70,3 %) a 30 žen (29,7 %), průměrný věk u mužů $42,56 \pm 18,45$ a u žen $46,52 \pm 18,12$, průměrný věk muži + ženy $44,56 \pm 18,29$, věkové rozmezí 3 - 78 let. Nejvíce pozitivních pacientů - mužů ($n = 34$) bylo ve věkovém rozmezí 26 - 45 let, u žen ($n = 12$) se dostáváme k obdobným závěrům. Nejvyšší počet leptospirapozitivních osob jsme zaznamenali v roce 2002 ($n = 21$) a 2005 ($n = 25$). V roce 2002 zasáhl 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. V letním období až do října je skutečně případů více, ale onemocnění se vyskytuje prakticky v průběhu celého roku. 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. 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.

V naší studii jsme zjistili skutečnost, že nejvíce pacientů s laboratorně potvrzenou diagnózou leptospiróza bylo ve věku mezi 26-45 lety. Tento jev si vysvětlujeme tím, že se uvedená věková skupina lidí nejvíce věnuje rizikovým aktivitám.

Ve shodě s většinou odborných publikací zaměřených na epidemiologickou charakteristiku souboru pacientů s leptospirózou 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) [39] tvořili analyzovaný soubor pacientů s leptospirózou muži v 93 %, 91,4 %, 85 %, resp. v 81,9 %. V literatuře je tento fenomén vysvětlován tím, že muži jsou při výkonu povolání vystaveni vyššími riziky expozice patogenním leptospirám než ženy.

MAT a ELISA - konfirmace výsledků PCR analýzy

Jak bylo prokázáno v předkládané studii, má MAT vyšetření 100% diagnostickou senzitivitu a 100% diagnostickou specificitu. 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.

Analyzované diagnostické soupravy SERION ELISA *classic Leptospira* IgM/IgG vykazovaly diagnostickou senzitivitu 100 %. Diagnostická specificita soupravy pro detekci IgM protilátek činila 88,6 % a soupravy pro detekci IgG protilátek 54,3 %. Vzhledem ke skutečnosti, že u soupravy ELISA *classic Leptospira* IgM byly zaznamenány celkem 4 falešně pozitivní reakce a u soupravy SERION ELISA *classic Leptospira* IgG falešně pozitivních reakcí celkem 16, nelze považovat tyto diagnostické kity za vhodné a především za spolehlivé pro rutinní

diagnostiku leptospirózy. Diagnostická senzitivita soupravy vhodné pro použití v rutinním provozu by měla převyšovat hodnotu 95 %.

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) [40] 100 % resp. 96,2 %. Ve sdělení autorů Efflera a kol. (2002) [41] se však setkáme s diagnostickou senzitivitou 43 %. Autoři Panwala a kol (2011) [40] souhlasně s námi došli k téměř identické hodnotě diagnostické specifity 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 specifity soupravy SERION ELISA *classic Leptospira* IgG. Ve studii Honarmanda a kol. (2010) [19] byla diagnostická senzitivita a specifita soupravy detekující IgG rovna 84 % resp. 77 % (v naší studii 100 % resp. 54,3 %). Je zapotřebí také respektovat skutečnost, že soupravy SERION ELISA *classic Leptospira* IgM/IgG jsou dle sdělení výrobce založeny na průkazu rodově specifických protilátek (nepatogenní *L. biflexa*), neboť při velkém množství sérovarů patogenních leptospir je zatím obtížné připravit soupravy s širokým spektrem antigenů [40,42]. 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) [43] byla testována séra od 90 pacientů s klinicky potvrzenou boreliózou, a autoři ověřili 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.

9. ZÁVĚRY

V ČR je v laboratorní diagnostice leptospirózy používána pouze sérologická metoda mikroaglutinačního testu, která má však v prvním týdnu onemocnění nízkou diagnostickou senzitivitu a specificitu. 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 konfirmaci výsledků PCR vyšetření, kromě metody MAT byla testována pro detekci protilátek proti leptospirám i ELISA souprava, kterou 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 analytickou pozitivní i negativní specificitou, obě hodnoty jsou rovny 100 %. Metoda byla ověřena na 230 laboratorních kmenech leptospir, které 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 vliv na další vývoj infekce způsobené patogenními leptospirami. Z 295 pacientů suspektních na leptospirózu vyšetřených v období duben 2010 – duben 2013 bylo jako LipL32 pozitivní vyhodnoceno 9 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 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*, *lipL41* a *lipL32* 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 určeno, o jaký sérovar patogenních leptospir se jednalo u suspektního pacienta. Pomocí této MLST analýzy 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 reakcí vyhodnoceno jako hraniční, výsledek sekvenační analýzy byl opakovaně „nekultivovatelné bakterie“. Všechny vzorky byly vyhodnoceny jako negativní. Z uvedené skutečnosti je 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 retrospektivní šetření výskytu leptospirózy v Královéhradeckém, Pardubickém kraji a části kraje Vysočina v letech 2002 - 2013

Z celkového počtu 5840 pacientů suspektních na leptospirozu 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) bylo ve věkovém rozmezí 26 - 45 let, u žen (n = 12) 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 leptospirozy 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 případů). Nejfrekventovanějším infikujícím typem byl v naší studii sérovar *L.grippotyphosa* (n = 41, 42,3 %).

e) Stanovení diagnostické specificity a senzitivity MAT a Serion ELISA classic *Leptospira* IgM/IgG - potvrzení 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 konfirmovaných 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 (8×), *L. grippotyphosa* Ž6 (7×), *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava (3×), *L. sorex – jalna* Sorexjalna (3×), *L. copenhageni* Lebe (2×) *L. isticra* J20 (1×), *L. bratislava* Jež Bratislava (1×) a *L. canicola* S392 (1×).

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

10. POUŽITÁ LITERATURA

1. Abgueguen, P., Delbos, V., Blanvillain, J., Chenebault, J.M., Cottin, J., Fanello, S.*et al.* 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.*et al.* 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. *et al.* 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.*et al.* 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.*et al.* 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.*et al.* *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. *et al.* 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., Campese, C., Postic, D., Vaillant, V.*et al.* 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., Bošítková, V., Kučerová, P., Prášil, P., Pavliš, O. *et al.* Leptospiroza 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.
- 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
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. et al. 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. Quiamp
31. Levett, P.N., Morey, R.E., Galloway, R.L., Turner, D.E., Steigerwalt, A.G., Mayer, L.W. (2005) Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *Journal of Medical Microbiology*, 2005, vol. 54, s. 45 - 49
32. Ahmed, N., Devi, S.M., de lo Á Valverde, M., Vijayachari, P., Machangú, R.S., Eliis, W.A. et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2006, vol. 5, s. 28
33. Analytic Jena Biosolutions, Jena. InnuPREP PCRpure Kit. 2008. 16 s.
34. Applied Biosystems, Foster City. BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. 2010. 72 s.
35. Analytic Jena Biosolutions, Jena. InnuPREP PCRDye Kit. 2008. 16 s.
36. Virion/Serion, Würzburg. SERION ELISA classic *Leptospira* IgG/IgM. 2000, 16 s.

37. 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
38. Thaipadunpanit, J., Chierakul, W., Wuthiekanun, V., Limmathurotsakul, D., Amornchai, P., Boonslip, S. et al. Diagnostic Accuracy of Real-Time PCR Assays Targeting 16S rRNA and lipL32 Genes for Human Leptospirosis in Thailand: A Case-Control Study. *Public Library of Science ONE*, 2011, vol. 6, no. 1, s. e16236
39. 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.
40. 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
41. 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
42. Vinetz, J.M. Leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2001, vol. 14, s. 527 - 538
43. 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.

11. PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA

11.1. Původní práce

11.1.1 Recenzované časopisy

1. Smetana, J., Čermáková, Z., Boštíková, V., Kučerová, P., Prášil, P., Pavliš, O., Chlíbaek, R. Leptospiróza v České republice a možnosti laboratorní diagnostiky. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie*. 2010;59(4):159-167

2. Kučerová P., Čermáková Z., Valenta Z., Polák P., Plíšková L., Pavliš O, Voxová B. Výskyt leptospirózy v Královéhradeckém a Pardubickém kraji a v části kraje Vysočina v letech 2002 – 2009. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2011;17(5):170-174

3. Kučerová P., Čermáková Z., Plíšková L., Valenta Z., Pavliš O., Kubíčková P. Porovnání výsledků dvou metod sérologické diagnostiky leptospirózy – mikroaglutinačního testu a metody ELISA. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2011;17(5):175-180

11.1.2 Časopisy s IF

1. Cermakova Z, Kucerova P, Valenta Z, Pliskova L, Bolehovska R, Prasil P et al. Leptospirosis: Possibilities of Early Laboratory and Clinical Diagnosis. *Central European Journal of Medicine* 2013;8:84-89 (IF = 0,312)

2. Kucerova P., Cermakova Z., Pliskova L., Pavlis O., Kubickova P., Kleprlikova H., Valenta Z. Our experience using real-time PCR for the detection of the gene that encodes the superficial lipoprotein LipL32 of the pathogenic leptospires to confirm the acute form of human leptospirosis. *Biomedical Papers*. 2013, DOI: 10.5507/bp.2012.109 (IF = 0,702)

3. Cermakova Z, Kucerova P, Pliskova L, Kubickova P. Real - time PCR method for detection of the gene encoding surface lipoprotein LipL32 of pathogenic *Leptospira* - use in laboratory diagnosis of acute form of leptospirosis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. Aktuální stav přijato 5. 4. 2013 (IF = 1,722)

11.2 Přehledové práce

11.2.1 Časopisy s IF

1. Kucerova P., Cermakova Z. Leptospirosis - a neglected zoonosis of global distribution. *Reviews in Medical Microbiology*. Aktuální stav přijato 7.4. 2013 (IF = 0,370)

+ 1 publikace v recenzním řízení v časopisu s IF

11.3 Přednášky na odborných setkáních

1. XX. Moravsko – Slovenské mikrobiologické dny, Mikulov. 05. - 07. září 2012. Kučerová P., Čermaková Z, Pavliš O, Kubíčková P. „Pokroky v diagnostice leptospirózy“
2. 8th Postgraduate Medical Students Conference, Hradec Kralove, 22. říjen 2012. Kucerova P., Cermakova Z., Pliskova L., Kubickova P. „Detection of the gene encoding surface lipoprotein LipL32 of pathogenic Leptospira with using of real-time PCR method and analysis of the temperature of melting”
3. The Student Scientific Conference on Biotechnology and Biomedicine, Brno, 10. – 12. duben 2013. Kucerova P, Cermakova Z, Pliskova L, Kubickova P, „Molecular biology methods of laboratory diagnosis acute form of leptospirosis – detection of gene encoding surface lipoprotein LipL32 of pathogenic leptospires”