

## Diagnostika leptospirózy v NRL pro leptospiry

### Diagnosis of leptospirosis at the National Reference Laboratory for Leptospira

Eliška Zadrobílková, Petr Kodym

#### Souhrn • Summary

Leptospiróza je onemocnění způsobené spirochetami rodu *Leptospira*, které je celosvětově rozšířené. Člověk se může infikovat přes půdu nebo vodu kontaminovanou močí rezervoárových hostitelů. Mezi projevy leptospirózy patří často nespecifické příznaky podobné chřipkovému onemocnění ale v 5–10 % případů může docházet k vážnému průběhu onemocnění s multiorgánovým selháváním. Diagnostika leptospirózy probíhá nepřímou pomocí sérologických metod nebo přímo pomocí kultivace nebo polymerázové řetězové reakce (PCR). Celosvětově nejpoužívanější je sérologická metoda MAT (mikroskopický aglutinační test). V NRL pro leptospiry využíváme k diagnostice leptospirové infekce metody MAT, PCR i kultivaci. V loňském roce jsme potvrdili celkem 15 pozitivních vzorků, z toho 10 pomocí MAT a 5 pomocí PCR. Celkový záchyt leptospirózy na celém území ČR za rok 2021 byl 31 pozitivních případů, což je lehce nadprůměrný výskyt onemocnění. Nejčastějším infikujícím sérotypem v letech 2001–2018 byla *L. grippityphosa*.

Leptospirosis is a disease caused by spirochetes of the genus *Leptospira*, which is widespread worldwide. Humans can become infected through soil or water contaminated with the urine of reservoir hosts. The manifestations of leptospirosis often include non-specific flu-like symptoms, but in 5–10% of cases, a serious course of the disease with multi-organ failure may occur. Leptospirosis is diagnosed indirectly using serological methods or directly using culture-based method or polymerase chain reaction (PCR). The most used worldwide is the MAT (microscopic agglutination test) serological method. In the National Reference Laboratory for Leptospira, to diagnose leptospiral infections we use MAT, PCR as well as culture-based methods. Last year, we confirmed a total of 15 positive samples, 10 of them by MAT and 5 by PCR. The total detection of leptospirosis in the entire territory of the Czech Republic for the year 2021 was 31 positive cases, which is a slightly above-average incidence of the disease. The most common infecting serotype in 2001–2018 was *L. grippityphosa*.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha). 2022; 31(10): 404–407

**Klíčová slova:** *Leptospira interrogans*, leptospiróza, MAT, PCR

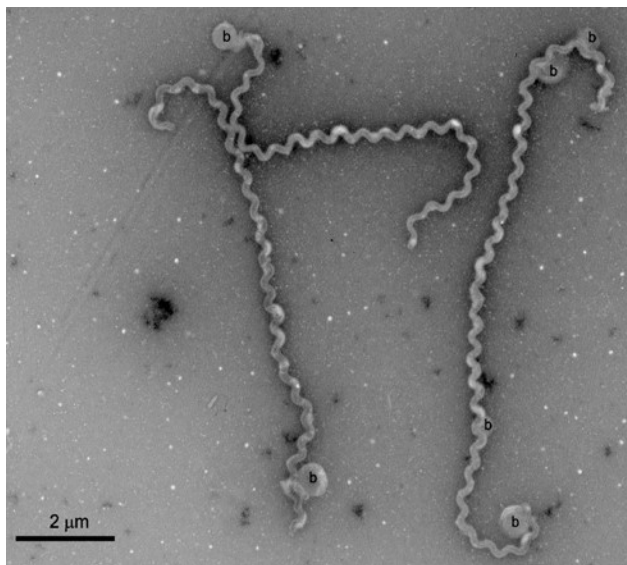
**Keywords:** *Leptospira interrogans*, leptospirosis, MAT, PCR

Leptospiróza je celosvětově se vyskytující zoonotické onemocnění s nejvyšší incidencí ve vlhkých tropických oblastech Země. Přenáší se především vodou nebo půdou, která je kontaminovaná močí infikovaných rezervoárových hostitelů, jako jsou různí hlodavci nebo domácí zvířata [1]. Onemocnění způsobují bakterie rodu *Leptospira*, které spolu s rodem *Leptonema* tvoří bazální skupinu spirochét. Spirochéty jsou skupinou spirálovitě stočených bakterií, do které spadají také další dva pro člověka významné rody *Borrelia* a *Treponema* [2].

Rod *Leptospira* můžeme na základě molekulárních analýz rozdělit na dvě hlavní skupiny: saprofytní, která obsahuje neinfekční druhy rozšířené v přírodním prostředí (např. *L. biflexa*) a dále na patogenní skupinu, ve které nalezneme všechny druhy schopné nakazit člověka nebo živočichy [3]. Patogenní skupina potom zahrnuje jak podskupinu pravých patogenů s nejznámějším zástupcem *L. interrogans*, tak přechodnou, málo virulentní podskupinu,

kam patří např. druh *L. inadai* [3, 4, 5]. Molekulární klasifikace rodu *Leptospira* však bohužel příliš nekoresponduje se systémem séroskupin, který se používá v diagnostické praxi a epidemiologii. To znamená, že jednotlivé sérotypy neodpovídají druhům, které jsou definované na základě molekulárně-biologických metod [6]. Geneticky podobné druhy se proto mohou objevovat v odlišné séroskupině a naopak sérotypy spadající do stejné séroskupiny mohou být geneticky naprosto odlišné. V současné době je známo asi 21 druhů rodu *Leptospira*, definovaných pomocí molekulárních dat, a přibližně 240 sérotypů, které se na základě antigenní podobnosti tradičně řadí do několika séroskupin [7].

Buňky rodu *Leptospira* jsou dlouhé, striktně aerobní a obsahují dvě axiální vlákna (periplasmické bičíky). Pomocí bičíků se bakterie pohybují typickým vývrkovitým pohybem, díky kterému snáze pronikají do hostitele. Buňky jsou na jednom nebo na obou koncích hákovitě zahnuté, což je typickým znakem rodu *Leptospira* (viz **obrázek 1**). Jsou dlouhé 6–20  $\mu\text{m}$  a široké pouze okolo 0,1  $\mu\text{m}$  [8]. Protože rozlišovací schopnost optického mikroskopu je přibližně 0,25  $\mu\text{m}$ , leptospiry jsou viditelné pouze za použití metody mikroskopování v temném poli, na kterém je založená

Obrázek 1: *Leptospira pomona*

Transmisní elektronová mikroskopie, negativní barvení, 1% roztok molybdenanu amonného. (Foto: Mgr. Eliška Zadrobílková, Ph.D., Hitachi HT7800; High-Tech, Japonsko – NRL pro průkaz infekčních agens elektronovou mikroskopií)

sérologická diagnostika metodou MAT (mikroskopický aglutinační test).

*Leptospira* proniká do lidského těla drobnými oděrkami na kůži nebo přes sliznice. Tímto způsobem se dostává do krevního řečiště, ve kterém se dále šíří [8, 9]. V prvních fázích infekce (cca první týden) je tak možné leptospiry detekovat z krve pomocí metody PCR (polymerázové řetězové reakce), tedy ještě před tím, než se začnou tvořit specifické protilátky. *Leptospira* se dále váže na endoteliální buňky vlásečnic důležitých orgánů, jako jsou především játra, ledviny, plíce nebo mozek. Poškození endoteliálních buněk může vést až k ischemii [8]. Nejčastěji jsou zasaženy hepatocyty a jejich mezibuněčné spoje, což vede k uvolnění žluči do krevního řečiště, vzestupu bilirubinu a následnému ikteru [9].

V průběhu prvního týdne nákazy se postupně začínají objevovat specifické protilátky třídy IgM. Byly však zaznamenány případy, kdy po časném nasazení antibiotické léčby nebyly protilátky detekovány vůbec. Imunoglobuliny IgG se začínají produkovat později a v mnohem menší míře nebo se u některých lidí neobjeví vůbec. Někdy naopak zvýšená hladina protilátek může přetrvávat měsíce až roky [10].

Rozlišujeme dvě formy leptospirosy: mírnou a také běžnější anikterickou a závažnou ikterickou, známou také pod názvem Weilova choroba, která je způsobena ve většině případů sérotypem *L. icterohaemorrhagiae*. Až okolo 80–90 % onemocnění leptospirosou probíhá lehce jako anikterická forma, která připomíná chřipkové onemocnění. Příznaky jsou často nespecifické a zahrnují např. teplotu, celkovou slabost, kašel, dušnost, bolest hlavy, svalů nebo břicha, zvracení a v některých případech také vyrážku [1, 6].

Pacienti obvykle nevyhledají lékařskou pomoc a příznaky onemocnění po několika dnech samy odezní. Velmi závažným onemocněním je ikterická forma leptospirosy, která se rozvine v 5–10 % případů. Leptospiry napadají plíce, gastrointestinální trakt a nervový systém. Zasažen je také hepato-renální systém, jehož poškození se projevuje anurií nebo oligourií a zvýšenými hladinami kreatininu a urey [1]. Onemocnění rychle progreduje a může docházet k multiorgánovému selhávání. Mortalita ikterické formy leptospirosy se pohybuje okolo 5–15 % [6].

Diagnostika leptospirosy probíhá z větší části nepřímou pomocí sérologických metod. Antileptospirové protilátky jsou stanovovány pomocí mikroskopického aglutinačního testu (MAT) nebo metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Přímá detekce je možná kultivací bakterií z krve, moči, likvoru a tkání nebo pomocí PCR metod. Celosvětově nejpoužívanější je pravděpodobně klasická metoda MAT, během kterého se smíchá pacientské sérum s živými nebo usmrcenými leptospirami. K tomuto účelu je nutné kultivovat živé leptospirové kmeny, a tak tento test provádí poměrně málo laboratoří. Externího hodnocení kvality, které v rámci AP CEM připravuje a vyhodnocuje Národní referenční laboratoř pro leptospiry, se účastní 12 laboratoří.

V diagnostické laboratoři, která vyšetřuje pomocí MAT, jsou obvykle kultivovány hlavně sérotypy, které jsou pro danou oblast endemické. V NRL pro leptospiry stanovujeme protilátky proti 12 sérotypům leptospir, které se mohou vyskytovat na území ČR. Jedná se o *L. icterohaemorrhagiae* Ictero I, *L. sorex* Sorexjalna, *L. canicola* Canis 7, *L. bratislava* Jež Bratislava, *L. pomona* Šimon, *L. grippotyphosa* Moskva V, *L. sejroe* M84, *L. tarassovi* DV-A, *L. copenhageni* Lebe, *L. jalna* Jalná, *L. bataviae* Moldava a *L. bulgarica* Nikolaev. Výše zmíněné sérotypy také uchováváme v tekutém dusíku a v případě potřeby je můžeme kdykoliv vymrazit. Stejným způsobem uchováváme navíc sérotypy *L. icterohaemorrhagiae* Petrik, *L. grippotyphosa* Kúty, *L. grippotyphosa* Turňa, *L. hardjo* Hardjoprajitno, *L. istriica* Bratislava a *L. polonica* M-37.

Pokud pacient produkuje protilátky proti určitému sérotypu, dochází k aglutinaci až lyzi leptospir daného sérotypu. Test je hodnocen jako pozitivní, když je míra aglutinace/lyze 50 % a více. V dalším kroku se pak stanoví titer protilátek. Metodou MAT se zjišťují současně protilátky jak třídy IgM, tak IgG, a proto nelze z jednoho vzorku jednoznačně určit, zda se jedná o začínající nebo v minulosti proběhlou infekci. Z tohoto důvodu je vhodné z odstupem 5–7 dnů zaslat do diagnostické laboratoře párové sérum, díky kterému je možné zjistit dynamiku titru protilátek. Metodou ELISA se obvykle zjišťují hladiny IgM protilátek, jejichž přítomnost ukazuje na právě probíhající nebo nedávnou infekci. Nevýhodou ale je, že má nižší specificitu než MAT a nelze tímto způsobem identifikovat infikující sérotyp [11].

**Tabulka 1: Počty vzorků vyšetřených v NRL pro leptospiry (Zdroj: NRL pro leptospiry)**

Rok	Počet vzorků		
	PCR	sérologie	celkem
2018	9	102	111
2019	14	146	160
2020	20	116	136
2021	74	131	205

**Tabulka 2: Počty pozitivních případů leptospirózy registrované v NRL pro leptospiry (Zdroj: NRL pro leptospiry)**

Rok	Počet pozitivních případů leptospirózy		
	PCR	sérologie	celkem
2018	0	1	1
2019	2	7	9
2020	0	2	2
2021	5	10	15

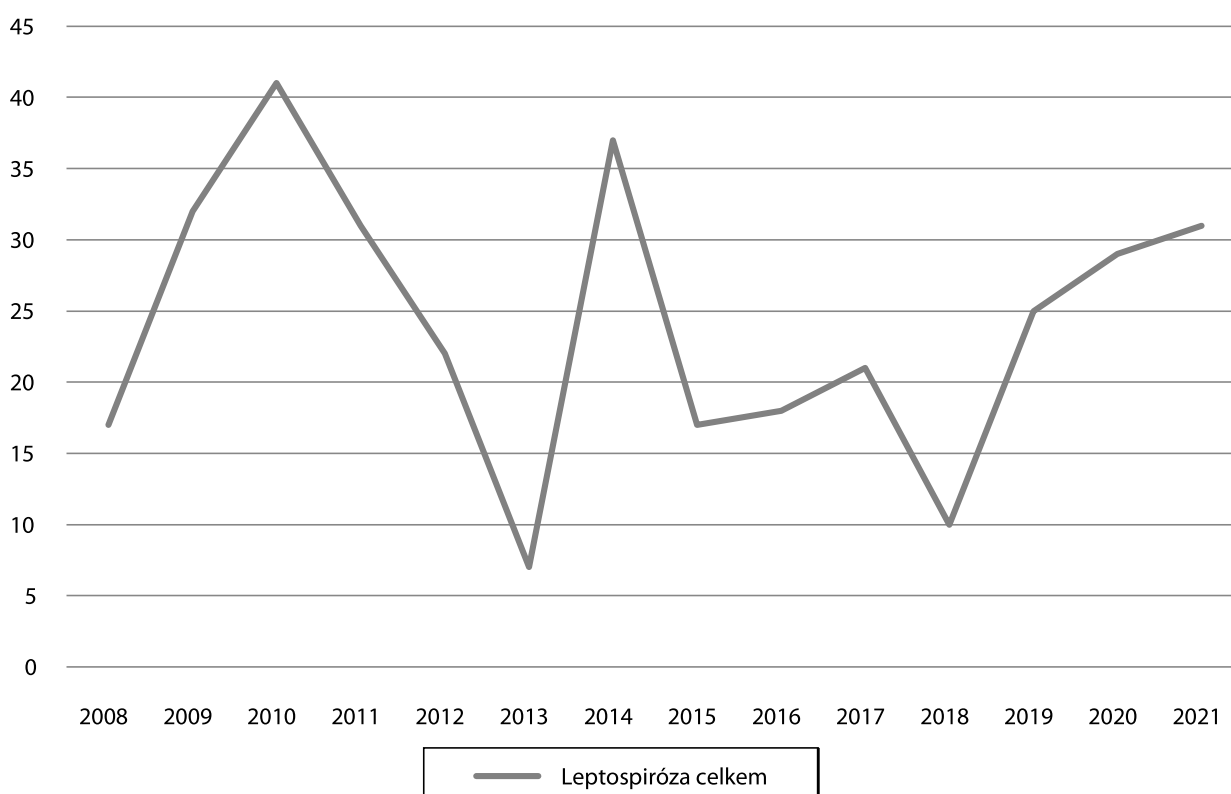
Leptospiry lze vykultivovat naočkováním patientského materiálu do kultivačního média. V případě krve by se mělo provést nejpozději do deseti dnů od doby, kdy se objevily první příznaky a před podáním antibiotické léčby [11]. Kultivace leptospir z moči je vhodná ve druhém týdnu od nákazy [6]. Protože má moč kyselé pH, není to příznivé prostředí pro růst leptospir. Proto je nutné moč naočkovat do kultivačního média nejlépe ihned, nejpozději však do dvou hodin po odběru. Růst leptospir je všeobecně velmi pomalý. V kultuře se mohou začít objevovat nejdříve po týdnu, obvykle však později, a proto se kultivace využívá spíše k dourčení sérotypu než ke včasné diagnostice [11].

K tomuto účelu se naopak v některých laboratorích zavádí metoda PCR nebo rt-PCR (real-time PCR), pomocí které lze odhalit leptospirovou infekci již v počátku. Jako nejčastější marker se používá gen pro povrchový lipoprotein lipL32, který nalezneme pouze u patogenních

druhů leptospir [12]. Senzitivita i specifita této metody je poměrně vysoká [13, 14]. V naší laboratoři používáme pro zachycení časně leptospirové infekce, klasickou metodu PCR (amplifikujeme gen *lipL32*) s následnou analýzou výsledků pomocí gelové elektroforézy. Tato metoda se nám zatím osvědčila lépe než rt-PCR.

Přestože je leptospiróza v České republice poměrně vzácné onemocnění, potvrzení nebo vyvrácení této diagnózy je klíčové pro nasazení včasné a správné léčby. Na naší laboratoř se s požadavkem o vyšetření obracují lékaři a lékařky jak z jednotek intenzivní péče nebo interních oddělení tak kolegyně a kolegové z odborných ambulancí. Vyšetřujeme krevní sérum, plazmu, nesrážlivou krev, případně i moč a likvor.

Za loňský rok bylo v naší laboratoři metodou MAT vyšetřeno 131 vzorků, což je v porovnání s předchozími lety celkem stabilní počet vyšetření (viz **tabulka 1**).

**Graf 1: Počty pozitivních případů leptospirózy v ČR v letech 2008–2021 [21, 22]**

Tabulka 3: Počty pozitivních případů leptospirózy v ČR v letech 2008–2021 [21, 22]

Rok	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
Počet případů	17	32	41	31	22	7	37	17	18	21	10	25	29	31

Metodou PCR jsme v loňském roce vyšetřili celkem 74 vzorků (viz **tabulka 1**). Vyšší počet vyšetření, než je za poslední roky obvyklé, je dán především snahou naší laboratoře o zkvalitnění poskytovaných služeb a optimalizaci stávajících metod.

V roce 2021 jsme v laboratoři potvrdili 10 sérologicky pozitivních vzorků a 5 vzorků bylo vyhodnoceno jako pozitivní pomocí metody PCR (viz **tabulka 2**). Pokud pomíneme opakovaná vyšetření a skutečnost, že v některých případech měl pacient pozitivní výsledky jak sérologie, tak PCR, tak jsme za loňský rok zachytili celkem 10 pacientů pozitivních na leptospiru. Podle údajů v ISIN byl celkový záchyt leptospirózy na území celé ČR v loňském roce 31 pozitivních případů (viz **tabulka 3**). V porovnání s ostatními roky (viz **graf 1**) se jedná spíše o vyšší výskyt tohoto onemocnění. Mohlo by to souviset s tím, že některé kraje (Moravskoslezský, Jihočeský, Olomoucký, Ústecký, Liberecký) byly v květnu, červnu a červenci 2021 zasaženy přívalovými (bleskovými) povodněmi [15] a již dříve bylo několikrát zaznamenáno, že právě během povodní v teplých měsících roku roste riziko nákazy leptospirou nejvíce [16, 17]. V zasažených krajích však nebyl zaznamenán větší počet případů leptospirózy v porovnání s ostatními kraji [18, 19, 20], a proto lze předpokládat, že rychlý průběh povodní nemá na vyšší výskyt onemocnění pravděpodobně vliv. Podrobnější statistická analýza ale nebyla provedena. V letech 2001–2018 byl nejčastějším původcem onemocnění diagnostikovaným jako leptospiróza (dg. A27) sérotyp *L. grippityphosa* a to v téměř 45 % případů (zdroj Epidat/ISIN).

#### LITERATURA

- [1] Karpagam KB, Ganesh B. Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance – an updated review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020; 39(5): 835–846.
- [2] Paster BJ, Dewhirst FE, Weisburg WG, et al. Phylogenetic analysis of the Spirochetes. *J Bacteriol*. 1991; 173(19): 6101–6109.
- [3] Vincent T, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13(5): e0007270.
- [4] Fouts DE, Matthias MA, Adhikarla H, Adler B, et al. What Makes a Bacterial Species Pathogenic?: Comparative Genomic Analysis of the Genus *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(2): e0004403.
- [5] Wilkinson DA, Matthew J, Benschop J, Nisa S. Identification of pathogenic *Leptospira* species and serovars in New Zealand using metabarcoding. *PLoS ONE* 2022; 16(9): e0257971.
- [6] Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14(2): 296–326.
- [7] Rajapakse S. Leptospirosis: clinical aspects. *Clin Med*. 2022; 22(1): 14–17.
- [8] Adler B, Moctezuma A de la P. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol*. 2010; 140(3–4): 287–296.
- [9] Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015; 387: 65–97.
- [10] Faine S. *Leptospira* and leptospirosis. 1994. Boca Raton. CRC Press. ISBN 0-8493-6994-0.
- [11] WHO. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. 2003. Geneva (Switzerland). World Health Organization.
- [12] Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, et al. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. Through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009; 64(3): 247–255.
- [13] Podgoršek D, Ružič-Sabljic E, Logar M, Pavlović A, et al. Evaluation of real-time PCR targeting the *lipL32* gene for diagnosis of *Leptospira* infection. *BMC Microbiol*. 2020; 20(1): 59.
- [14] Marvanová T, Kybicová K, Kodym P. Průkaz DNA patogenických leptospir metodou PCR v NRL pro leptospiry. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2016; 25(4): 140–142.
- [15] <https://www.chmi.cz/>
- [16] Smetana J, Čermáková Z, Boštíková V, Kučerová P, et al. Leptospiróza v České republice a možnosti laboratorní diagnostiky. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol*. 2010; 59(4): 159–167.
- [17] Zitek K, Beneš Č. Epidemie povodňové leptospirózy. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 1998; 7(4): 160–165.
- [18] Výskyt vybraných hlášených infekcí v ČR podle krajů, květen 2021. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2021; 30(5): 133–140.
- [19] Výskyt vybraných hlášených infekcí v ČR podle krajů, červen 2021. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2021; 30(6): 175–182.
- [20] Výskyt vybraných hlášených infekcí v ČR podle krajů, červenec 2021. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2021; 30(7–8): 209–216.
- [21] Počty případů hlášených infekcí v ČR vykázané v letech 2008–2017, vybrané diagnózy dle MKN 10. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2018; 27(1): 1–2.
- [22] Výskyt vybraných hlášených infekcí v ČR, leden–prosinec 2021; porovnání se stejným obdobím v letech 2012–2020. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2021; 30(12): 387–388.

Mgr. Eliška Zadrobílková, Ph.D.  
vedoucí Národní referenční laboratoře pro leptospiry  
CEM SZÚ