

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

## **Laboratorní diagnostika leptospirózy**

**(diplomová práce)**

**Hradec Králové, 2006**

**Helena Svobodová**

## OBSAH

OBSAH .....	2
ZKRATKY .....	4
1. ÚVOD.....	4
2. ÚVOD DO PROBLEMATIKY .....	6
2.1. Leptospiróza.....	6
2.2. Historie .....	7
2.3. Mikrobiologie .....	8
2.3.1. Morfologie.....	8
2.3.2. Kultivace .....	10
2.4. Taxonomie a klasifikace .....	10
2.4.1. Sérologická klasifikace.....	11
2.4.2. Genotypická klasifikace .....	11
2.5. Epidemiologie.....	12
2.6. Patogeneza .....	17
2.7. Klinické příznaky.....	19
2.7.1. Anikterická leptospiróza.....	21
2.7.2. Ikterická leptospiróza .....	22
2.7.3. Weilova nemoc .....	26
2.7.4. Žňová horečka .....	27
2.7.5. Štuttgartská nákaza .....	28
2.8. Laboratorní diagnostika.....	28
2.8.1. Obecné laboratorní nálezy .....	28
2.8.2. Mikroskopie.....	29
2.8.3. Izolace a kultivace leptospir .....	30
2.8.4. Sérologické metody .....	31
2.8.5. Molekulární biologické metody.....	33
2.9. Léčba.....	35
2.10. Prevence .....	36
3. MATERIÁL A METODY .....	39
3.1. Pacienti.....	39
3.2. Laboratorní metody .....	39
3.2.1. Metoda mikroaglutinace – lýza (MAL).....	39
3.2.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	42
3.3. Dotazníková metoda.....	44
4. VÝSLEDKY .....	48

4.1. Demografické a epidemiologické aspekty .....	48
4.2. Klinické příznaky.....	52
4.3. Laboratorní ukazatele.....	54
4.4. Léčba.....	56
5. DISKUZE .....	58
6. ZÁVĚR.....	65
7. SEZNAM LITERATURY.....	67

## ZKRATKY

ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
AST	aspartátaminotransferáza
CSF	mozkomíšní mok
CRP	C – reaktivní protein
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GMT	$\gamma$ - glutamyltransferáza
EIA	enzymová imunoanalýza
EMJH	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harrisovo
KFR	komplement fixační reakce
<i>L.</i>	<i>Leptospira</i>
LPS	lipopolysacharid
MAL	mikroaglutinace – lýza
OMP	vnější membránový protein
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PFGE	pulsní gelová elektroforéza
RFLP	metoda polymorfismu délky restrikčních fragmentů

## 1. ÚVOD

Leptospiróza je zoonóza (onemocnění přenosné ze zvířat na lidi), která je v určitých přírodních ohniscích rozšířena prakticky po celém světě. Výrazné zvýšení v počtu hlášených a diagnostikovaných případů bylo zaznamenáno na území České republiky po rozsáhlých povodních, které se zde v posledních letech vyskytovaly. Je pravděpodobné, že různě velké záplavy se budou objevovat i nadále a tak je riziko leptospirózy na našem území stále aktuální. Člověk se může infikovat kontaminovanou vodou, půdou nebo při kontaktu s infikovanými zvířaty. K infekci dochází většinou při činnosti během volného času při pobytu v přírodě.

Onemocnění se často může manifestovat pouze jako mírné horečnaté s nespecifickými příznaky, které se vyskytují rovněž u jiných nemocí a je tak možné zaměnit diagnózu leptospirózy za jinou diagnózu. Nejzávažnější formou je Weilova nemoc, která se projevuje hepatorenálním selháváním a celkovým metabolickým rozvratem, někdy může skončit fatálně.

V této studii jsme se zaměřili na skupinu pacientů s leptospirózou, u kterých bylo onemocnění potvrzeno pomocí sérologické diagnostické metody mikroaglutinace-lýza. Naší snahou bylo zhodnocení epidemiologických údajů uvedených u těchto pacientů a jejich souvislosti s vyšším rizikem expozice onemocnění. Dále jsme se zaměřili na klinické projevy a na hodnoty obecných laboratorních ukazatelů u sledovaných pacientů. Při stanovení celkové diagnózy by měly být posuzovány výsledky laboratorních vyšetření, klinický obraz onemocnění a v rovněž tak epidemiologické aspekty.

## 2. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

### 2.1. Leptospiróza

Leptospiróza je celosvětově rozšířená zoonóza, způsobující onemocnění u lidí na všech kontinentech, v městském i venkovském prostředí, v mírném i tropickém klimatu (45). Řadí se k zoonózám, což jsou onemocnění, která se přenášejí ze zvířat na lidi. Zvláště ve vlhkých tropech a subtropích patří leptospiróza k častým a nebezpečným onemocněním zvířat a lidí a často tam probíhá ve formě rozsáhlých epizootií a epidemií. V chovech hospodářských zvířat, zvláště u skotu a prasat, způsobuje v celosvětovém měřítku obrovské ekonomické ztráty (40). Leptospiróza se vyskytuje i v České republice, zvláště od jara do podzimu (22). Nemocný člověk by měl být hlášen, léčen a izolován na infekčním oddělení nemocnic (46).

Choroba je vyvolávána spirochetami z rodu *Leptospiraceae*. V současnosti je známo přes 200 sérovarů, které se podle sérologické příbuznosti zařazují do 23 séro skupin. V České republice se vyskytuje *Leptospira grippotyphosa*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. sejroe*, *L. pomona*. V tabulce č. 1 je uvedeno všech 11 sérotypů, které se diagnosticky stanovují v České republice.

**Tab. č. 1.** Diagnostikované sérotypy v ČR

1.	<i>Leptospira icterohaemorrhagiae</i> Fryšava
2.	<i>L. copenhageni</i> Lebe
3.	<i>L. grippotyphosa</i> P 125
4.	<i>L. grippotyphosa</i> Ž 6
5.	<i>L. sejroe</i> M 84
6.	<i>L. istrica</i> J 20
7.	<i>L. bratislava</i> Jež Bratislava
8.	<i>L. pomona</i> Šimon
9.	<i>L. polonica</i> Poland
10.	<i>L. sorex-jalná</i>
11.	<i>L. canicola</i> S 392

Zdrojem leptospiróz mohou být mnohá divoce žijící zvířata (lesní a polní hlodavci, potkani) i domácí zvířata (prasata, psi, hovězí dobytek) (22). Celosvětově rozšíření potkani jsou nejobvyklejším zdrojem lidské infekce sérovarem *L. icterohaemorrhagiae*, který způsobuje závažné někdy až smrtelné onemocnění (25).

Člověk je většinou poslední hostitel, přenos z člověka na člověka je vzácný (13). K přenosu na člověka může dojít buď přímým kontaktem s infikovanou zvířecí močí nebo tkáněmi, ale také nepřímě při kontaktu s kontaminovanou vodou či půdou. Obvyklými branami vstupu u lidí jsou kožní oděrky, dokonce i neporušená kůže a exponované slizniční bariéry (spojivka, nosní nebo ústní sliznice). Většina nemocných získá infekci nahodile při pohybu v přírodě či při rekreaci (22). Celkem častá je také expozice při zaměstnání (farmáři, veterináři, zaměstnanci na jatkách atd.) (13).

Projevy leptospirózy mohou kolísat od mírného nespecifického infekčního onemocnění s příznaky podobnými chřipce až k Weilově chorobě, při které se mohou vyskytovat vážné komplikace (12). Po prodělaném onemocnění vzniká solidní, ale přísně specifická imunita jen pro příslušný sérovar leptospiru (46). Jelikož většina onemocnění probíhá lehce a krátkodobě, zůstanou tyto případy často nerozpoznány a pacienti jsou léčeni pod jinými diagnózami. Nemoc se může epidemicky rozšířit při výskytu přírodních katastrof jako jsou například povodně (38).

## 2.2. Historie

Vůbec poprvé byla leptospiróza popsána u psů a to v roce 1850 pod názvem „psí tyfus“, koncem devatenáctého století bylo toto onemocnění přejmenováno na „Štuttgartskou nákazu psů“. V roce 1933 se pak podařilo Klarenbeekovi a Schüffnerovi izolovat ze psa postiženého Štuttgartskou nákazou leptospiru, kterou nazvali *Leptospira canicola* (canis=pes). Kromě sérotypu *canicola* byly u psů již dříve známy nákazy sérotypem *icterohaemorrhagiae*, který je původcem těžce probíhající leptospirózy u lidí i domácích zvířat a to prakticky na celém světě (40).

Syndrom ikterické leptospirózy s renálním selháním byl poprvé zaznamenán před více jak 100 lety profesorem Adolfem Weilem v Heidelbergu (25). Choroba

byla poprvé rozpoznána jako nemoc spojená s povoláním u zaměstnanců pracujících v kanalizaci v roce 1883. V roce 1886 pak Weil popsal klinické projevy u 4 mužů, kteří měli těžkou žloutenku, horečku a hemoragie s ledvinným poškozením (15). Etiologie leptospirózy byla pak nezávisle na sobě vysvětlena v Japonsku a Německu (25). Obě skupiny izolovaly, kultivovaly a popsaly patogenní leptospiry (*Spirochaeta icterohaemorrhagiae*, *Spirochaeta icterogenes*). Později v roce 1914 byla nalezena v pitné vodě a také popsána saprofytická leptospira, která byla pojmenována *Spirochaeta biflexa*. V roce 1918 Noguchi navrhl název *Leptospira* (tenké spirály), což následovalo po detailních mikroskopických a kultivačních zkoumáních (37). Role potkana jako zdroje lidské infekce byla objevena v roce 1917 (25). V současnosti je známo přes 200 sérovarů, které se podle sérologické příbuznosti zařazují do 23 séroskupin (22).

V následující tabulce č. 2 jsou uvedeny jednotlivé sérovary vyskytující se v České a Slovenské republice, onemocnění která jsou vyvolávána danými sérovary a také hlavní hostitelé, kteří jsou pro tyto sérovary typičtí.

**Tab. č. 2.** Přehled leptospirových sérovarů zjištěných v ČR a SR

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

## 2.3. Mikrobiologie (*Leptospira* sp.)

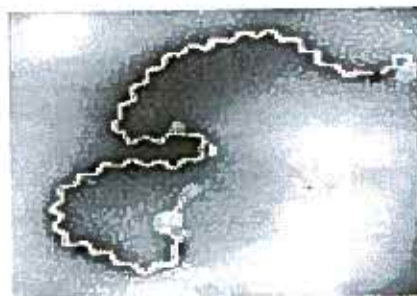
### 2.3.1. Morfologie

Leptospiry jsou vysoce pohyblivé, obligátně aerobní spirochety, které sdílejí vlastnosti jak gram-pozitivních tak i gram-negativních bakterií (5). Jsou to tenké

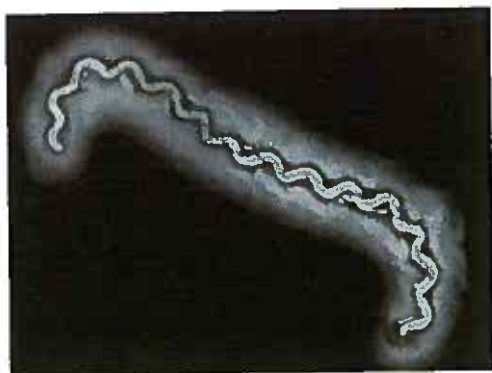


spirálovité organismy o velikosti  $0,25 \mu\text{m} \times 6 - 25 \mu\text{m}$  s těsně sestavenými závití, vyznačují se velice aktivním šroubovitým pohybem, který se uskutečňuje otáčením kolem vlastní dlouhé osy a přemísťují se klouzavým pohybem dopředu. V tekutém médiu je jejich pohyb charakteristicky klikatý, včetně rotací a flexí (37). Šířka spirály je přibližně  $0,1 - 0,15 \mu\text{m}$  a délka vlny je kolem  $0,5 \mu\text{m}$  (25).

Obvykle jeden nebo oba konce těchto jednobuněčných organismů jsou ohnuté, ale také se vyskytují rovné formy leptospir, které se točí a pohybují mnohem pomaleji než zahnuté formy. Kvůli své šíři a aktivnímu pohybu mohou procházet skrze extrémně malé otvory (37).



Obr. č. 1. *Leptospira pomona*



Obr. č. 2. *Leptospira canicola*

Leptospiry mají typickou dvojitou membránovou strukturu běžnou i u ostatních spirochet, ve které je uzavřeně spojená cytoplazmatická membrána s peptidoglykanovou stěnou a ty jsou pokryty ještě vnější membránou. Leptospirový lipopolysacharid má podobné složení jako u dalších gram-negativních bakterií, ale má nižší endotoxickou aktivitu (25). Volně žijící

(*L. biflexa*) a parazitické leptospiry (*L. interrogans*) jsou morfologicky nerozlišitelné (37).

### 2.3.2. Kultivace

Leptospiry jsou obligátně aerobní bakterie s optimálním růstem při teplotě 28 až 30 °C a optimální pH je 7,2 až 7,6 (37). Rostou pomalu, zejména v primokultuře, růst je zřetelný za 2 – 3 týdny (25). Leptospiry jsou kataláza a oxidáza pozitivní. Nutné pro jejich růst jsou pouze vitamíny B1 a B12 a dlouhé řetězce mastných kyselin. Mastné kyseliny jsou jejich hlavním zdrojem energie a uhlíku a jsou také nutné jako zdroj buněčných lipidů, protože leptospiry neumí syntetizovat mastné kyseliny de novo. Amoniové soli jsou účinným zdrojem buněčného dusíku (37).

Selektivní půdy pro kultivaci leptospir jsou vyráběny přidáním různých antibiotik, nejběžnější bývá 5-fluorouracil a neomycin sulfát, dále se také používá polymyxin B, rifampicin a vankomycin. Běžně užívané je Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) médium, které obsahuje 1% hovězí sérový albumin a Tween 80 (zdroj dlouhých řetězců mastných kyselin). Korthofovo a Fletcherovo médium jsou další kapalná či polotuhá půdy obsahující sérum (5). Tekuté půdy jsou nezbytné pro růst kultur pro sérologickou diagnostiku infekce a pro typizaci izolátů (37).

## **2.4. Taxonomie a klasifikace**

Rod *Leptospira* patří do čeledi *Leptospiraceae* z řádu *Spirochaetales*. Do řádu *Spirochaetales* patří ještě čeleď *Spirochaetaceae*, kam patří rody *Spirochaeta*, *Cristispira*, *Treponema* a *Borrelia* (18). Čeleď *Leptospiraceae* zahrnuje celkem dva rody, *Leptospira* a *Leptonema*. Většinou jsou leptospiry klasifikovány podle antigenních determinant (5). Tento tradiční systém rozděluje rod na 2 species: patogenní *Leptospira interrogans* a nepatogenní *Leptospira biflexa* (18). Teprve nedávno v roce 1999 byla popsána molekulární klasifikace, která rozděluje rod *Leptospira* do několika species podle příbuznosti jejich DNA (5). Jsou tedy dva hlavní směry v klasifikaci leptospir (25).

#### 2.4.1. Sérologická klasifikace

První klasifikace je fenotypická a je klinicky užitečnější. Leptospiry jsou rozděleny do dvou sérologických species, *L. interrogans* obsahující všechny patogenní kmeny a *L. biflexa* zahrnující saprofytické kmeny izolované z prostředí. Leptospiry jsou rozdělovány do sérovarů pomocí aglutinačních testů po zkřížené absorpci s homologním antigenem, aglutinující antigen je lipopolysacharid (25). Existuje více než 250 různých sérovarů (4). Antigenně příbuzné sérovary jsou obvykle seskupovány do séroskupin (25). Bylo popsáno více než 60 sérovarů *L. biflexa sensu lato* a u *L. interrogans sensu lato* bylo rozpoznáno více než 200 sérovarů, které patří do 24 séroskupin (5).

#### 2.4.2. Genotypická klasifikace

Klasifikace species rodu *Leptospira* je založena na příbuznosti DNA. Rod je rozdělen do 17 genomospecies, které jsou definovány více jak 70% příbuzností DNA a u kterých příbuzné sekvence obsahují nejvíce 5% nespárovaných bází (divergence) (5). Genomospecies (genetické druhy) nejsou shodné se sérologickou klasifikací (*L. interrogans* a *L. biflexa*) a v jednom species se vyskytují patogenní i nepatogenní sérovary. Takto tedy ani séroskupina ani sérovar spolehlivě nepředpovídá genomospecies rodu *Leptospira* (25). Genotypická klasifikace není dosud klinicky tak často využívána jako starší sérologický systém (4).

Příbuznost DNA byla určována mezi 303 kmeny z rodů *Leptospira* a *Leptonema*, které patří do 228 dobře charakterizovaných a rozpoznaných sérovarů a do 29 séroskupin. Kmeny byly rozděleny do 17 DNA hybridizačních skupin, reprezentujících 12 již popsaných species a 5 nových genomospecies. Největší skupiny tvořily druhy *L. interrogans* (91 kmenů z 82 sérovarů), *L. santarosai* (65 kmenů z 59 sérovarů), *L. borgpetersenii* (49 kmenů z 43 sérovarů), *L. kirschneri* (29 kmenů z 26 sérovarů) a *L. noguchi* (20 kmenů z 20 sérovarů). Nové genomospecies zahrnují *Leptospira* genomospecies 1 až 5 (11 kmenů, 11 sérovarů). Pro *Leptospira* genomospecies 2 bylo navrženo jméno *Leptospira alexanderi* sp.nov (8).

Je používán jak antigenní, tak i nedávno objevený genetický systém klasifikace *Leptospira*. Z toho vyplývá, že nové izoláty leptospir mohou být charakterizovány molekulárními i sérologickými postupy (5). V České republice

byly dosud izolovány následující leptospirové sérovary: *L. icterohaemorrhagiae*, *grippotyphosa*, *copenhageni*, *sejroe*, *bratislava*, *pomona*, *sorex-jalná*, *canicola*. Uvedené sérovary patří podle současné klasifikace do druhů *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* a *L. kirschneri* (10).

## 2.5. Epidemiologie

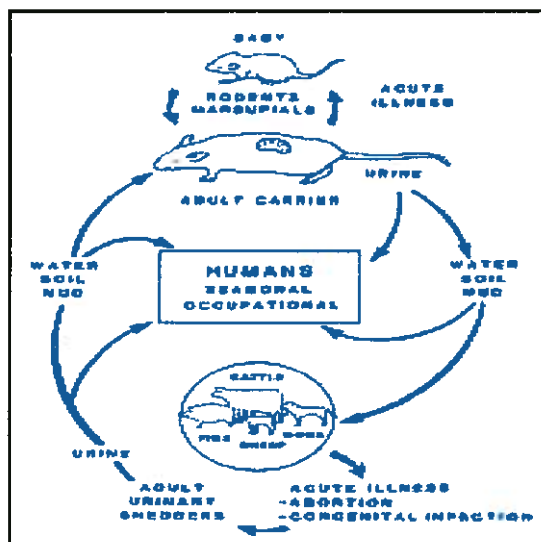
Leptospiróza je celosvětově rozšířená zoonóza. Existuje na všech pěti obydlených kontinentech a ve velkém počtu zemí. Vyskytuje se v tropických, subtropických i mírných pásmech (37). Incidence lidské infekce je prokazatelně vyšší v zemích tropického pásma než v mírných oblastech (5). Toto je způsobeno možností delšího přežití leptospir v prostředí teplých a vlhkých podmínek. Většina tropických zemí patří mezi země rozvojové a jsou zde také větší možnosti pro kontakt lidské populace s infikovanými zvířaty – s dobytkem, domácími mazlíčky či divokými a neochočenými zvířaty. Leptospiróza je sezónní nemoc s vrcholem incidence, který je v mírných regionech v létě či na podzim, neboť zde je limitujícím faktorem přežití leptospir teplota. V teplých oblastech je to v období dešťů, kde jinak rychlé vysychání zabraňuje přežití leptospir (25). Mezi rozličné faktory přispívající ke znovuobjevení této infekce patří poruchy v přirozených ekologických nikách, vyšší migrace obyvatel (např. cestování) a zdokonalení diagnostických metod umožňujících lepší detekci této infekce (4).

Leptospiróza je zaznamenávána jako celosvětově rozšířená nemoc. V klimatických podmínkách České republiky je výskyt sporadický a většinou se pohybuje okolo 0,3 na 100 000 obyvatel. Vyšší počet leptospiróz je zaznamenáván periodicky a souvisí především s přemnožením hlodavců (rezervoáry infekce) a záplavami, které v posledních letech postihly naše území (46).

Vysoce rizikové oblasti jsou Karibské ostrovy, Střední a Jižní Amerika, jihovýchodní Asie a Tichomořské ostrovy (18). Jihovýchodní Asie je endemickou oblastí pro leptospirózu a infekce u lidí byla zaznamenána v celém regionu. 70% sérovarů zahrnujících hlavně patogenní species bylo izolováno v Asii (24).

Případy leptospirózy také následovaly v oblastech po velkých záplavách (25). Rozsáhlá epidemie leptospirózy v Nikaragui v roce 1995 měla za následek vysokou morbiditu a mortalitu. Nejpravděpodobnějším vysvětlením epidemie bylo zvýšené vystavení záplavovým vodám, které byly kontaminované močí infikovaných zvířat (42). V roce 1996 v Brazílii byla po období dešťů zaznamenána městská epidemie těžké leptospirózy (23). Rozsáhlé epidemie proběhly v Latinské Americe po hurikánech, tropických bouřích a po záplavách (30).

Epidemiologie lidské leptospirózy odráží ekologický vztah mezi lidmi a chronicky infikovanými zvířecími hostiteli (45). Zdrojem infekce u lidí je obvykle buď přímý nebo nepřímý kontakt s močí infikovaných zvířat (25). Leptospiry infikují mnoho typů savců zahrnujících potkany, krysy, psy, kočky, dobytek, prasata, veverky, drobné hlodavce a další druhy zvířat (18). Rezervoároví hostitelé leptospir jsou definováni jako druhy, u kterých je infekce endemická a je obvykle přenášena přímým kontaktem ze zvířete na zvíře. Infekce je obvykle získávána v brzkém věku a prevalence chronické exkrece močí roste s věkem zvířete. Další zvířata (také člověk) se mohou infikovat nepřímým, popř. přímým kontaktem s rezervoárovým zvířetem (udržovací živočišný druh) (25).



Obr. č. 3. Cyklus leptospirózy

Malí savci, převážně hlodavci, jsou jedním z hlavních zdrojů leptospirózy. Kontakt s hlodavci je označován za jeden z hlavních rizikových faktorů (1).

Rozdělení jednotlivých kmenů a sérotypů ve specifických hostitelích závisí také na přírodních podmínkách. V ČR byly při jedné studii z 9 zkoumaných různých druhů zjištěni jako nejhojnější hostitelé myši *Apodemus spp.* a hraboš (*Microtus arvalis*) (41).

Zvířata hostící jednotlivé leptospirové séroskupiny a sérovary se liší region od regionu. Jednotlivá zvířata mohou nést rozmanité sérovary (18). Většina leptospirových sérovarů má svůj primární rezervoár u divokých zvířat, která následně nakazí domácí zvířata. Mnoho sérovarů je spojováno s jednotlivými druhy hostitelských zvířat. Například *L. pomona* a *L. interrogans* jsou u dobytka a prasat, *L. grippotyphosa* u dobytka, ovcí, koz a hrabošů, *L. ballum* a *L. icterohaemorrhagiae* jsou spojovány s potkany a myšmi a *L. canicola* je propojen se psovitými šelmami. Dalšími důležitými sérotypy jsou *autumnalis*, *hebdominalis* a *australis* (15).

Leptospiróza je u zvířat často subklinická (18). Leptospiry mohou přetrvávat po dlouhé období v renálních tubulech zvířat, kde vytvářejí symbiotický vztah bez klinických příznaků nemoci či patologických změn v ledvinách (15). Infikovaná zvířata mohou zůstat bezpříznaková a mohou vylučovat infekční organismy močí po celý svůj život (5). Leptospirurie byla také zaznamenána u očkovaných psů. Tento nálezný by mohl být možná vysvětlen buď neúplnou imunitou nebo očkování nezahrnovalo daný sérovar odpovědný za infekci (18). Vylučování mikroorganismů močí infikovaných zvířat je nejdůležitějším zdrojem těchto bakteriálních patogenů. Leptospiruria u lidí je přechodná a jen vzácně trvá déle než 60 dní (15).

Nepřímý kontakt s infikovanými zvířaty přes vodu nebo půdu kontaminovanou infikovanou močí je častějším zdrojem lidské infekce než přímý kontakt se zvířaty (4). Bylo zaznamenáno několik vzplanutí leptospirózy způsobených kontaminovanou vodou. Přežití patogenních leptospir v prostředí je závislé na několika faktorech zahrnujících pH, teplotu a přítomnost inhibičních sloučenin (25). Nejlépe přežívají v čerstvé vodě, vlhké alkalické půdě, vegetaci a bahně při teplotě vyšší než 22 °C. Infekce se vzácně přenáší po kousnutí větším zvířetem či hlodavcem, po kontaktu s produkty z utracených infikovaných zvířat a také po požití kontaminované potravy či vody (15).

Obvykle leptospiry vstupují do lidského organismu přes odřeny, poranění kůže nebo přes spojivku. Infekce může také pronikat do organismu přes

neporušenou kůži po dlouhém ponoření ve vodě. Vdechnutí vody či aerosolu může také mít za následek vznik infekce cestou slizničních membrán respiračního traktu (25). Slizniční povrch úst, hltanu a jícnu mohou patogenní leptospiry překročit stejně snadno jako slizniční membrány bronchiálního kmene a plicních alveol (18). Za nejpozdější místo přenosu infekce přes sliznice gastrointestinálního traktu člověka je považována sliznice dutiny ústní a jícnu, protože leptospiry nepřežívají v kyselém prostředí (15).

Přímý přenos mezi lidmi je velice vzácný. Je to vysvětlováno tím, že nízké pH lidské moči omezuje přežití leptospir po vyloučení (25). Lidská moč má odlišné pH než zvířecí hostitelé a leptospiry v ní většinou dlouho nepřežívají. Nicméně vylučování leptospir v lidské moči může probíhat i několik měsíců po uzdravení (27). Byl zaznamenán i přenos pohlavním stykem během rekonvalescence (25). Byl rovněž popsán transplacentární přenos leptospir a tento přenos je obvykle spojován se smrtí plodu či potratem. Rovněž byl zjištěn případ anikterické leptospirózy u kojící ženy a jejího dítěte, u kterého byla pravděpodobnou cestou přenosu nemoci mateřské mléko (6). Lidé jsou tedy většinou v řetězci nositelů a nemocných savců posledními hostiteli leptospirózy (18). Přenos při laboratorní nehodě se může také vyskytnout, ale je to méně obvyklé (15).

Lidská infekce může být získána prostřednictvím expozice při zaměstnání, rekreaci či vedlejší zájmové činnosti (25). Expozice při zaměstnání vysvětluje pravděpodobně 30-50% lidských případů (15). Zaměstnání je významným rizikovým faktorem. Leptospiróza byla dříve považována za původní nemoc z povolání, které byly spojeny s činnostmi jako je těžba uhlí, údržba stok, chov dobytka a práce na jatkách a v zemědělství, veterinární lékařství, práce spojené s pobytem v přírodě. Relativní význam těchto rizik v zaměstnání se snížil od té doby, co byla realizována ochranná opatření (5). Například rozpoznání rizikové činnosti u pracovníků v kanálech vedl k přijetí programů kontroly hlodavců a k užívání ochranných oděvů, což mělo za důsledek snížení případů spojených s tímto zaměstnáním (25).

Přímý kontakt s infikovanými zvířaty vysvětluje většinu infekcí u farmářů, veterinářů, jatečních zaměstnanců, inspektorů masa, pracovníků kontrolujících stav hlodavců a u dalších zaměstnání, která vyžadují kontakt se zvířaty. Nepřímý kontakt je důležitý u zaměstnanců v kanalizacích a stokách, horníků,

vojáků, čističů usazovacích jímek, farmářů, myslivců, pracovníků na rýžových polích, banánových farmách a sekáčů cukrové třtiny.

Horníci byly první rozpoznanou rizikovou skupinou zaměstnanců. Výskyt Weilova syndromu byl poprvé zaznamenán v roce 1930 u zaměstnanců kanalizací (25). Infikovaní potkani mohou kontaminovat vodu v kanalizacích. Částečné či celkové ponoření v bahně a vodě hraje důležitou roli v možnosti přenesení infekce na zaměstnance v kanálech a na rýžových polích. Infekce u vojenských jednotek se vyskytuje jako následek přímého vystavení kontaminované moči nebo nepřímého kontaktu s kontaminovanou půdou či vodou (15). Rybáři byli další skupinou zaměstnanců, u kterých bylo celkem brzo rozpoznáno riziko získání leptospirózy. Nedávno se ukázalo, že rybáři jsou v riziku zejména u infekce sérovaru ze séroskupiny *Icterohaemorrhagiae*. Předpokládalo se, že to pochází ze zamoření domů potkany. Chov hospodářských zvířat je jedním z nejrizikovějších faktorů při posuzování zaměstnání na světě obecně (25).

Ačkoliv leptospiróza je stále vedena převážně jako choroba z povolání, od roku 1970 je stále více popisována jako nemoc získaná během rekreace. Rekreční aktivity, u kterých se může vyskytovat riziko infekce patogenními leptospirami, zahrnují cestování do tropických oblastí, kanoistika, pěší turistika, jízda na kajaku, rybaření, windsurfing, plavání, vodní lyžování, brodění se, jízda na kole přes vodu, rafting a další venkovní sporty provozované v kontaminované vodě (15). Cestovatelé vracějící se z endemických oblastí výskytu leptospirózy mohou importovat nemoc domů (45). Potenciální expozice velkého počtu jedinců se vyskytuje během různých sportovních událostí a soutěží (25). Sdělení autorů Morgan a kolektiv se zabývá popisem propuknutí leptospirózy mezi účastníky triatlonu společenstvím osadníků ve Springfieldu v roce 1998. Silné deště předcházející triatlonu zde pravděpodobně zvýšily kontaminaci jezera Springfield leptospirami (30). Dále bylo také vyšetřováno propuknutí leptospirózy u atletů po všestranném závodě "Eco-Challenge" v roce 2000 (38).

Hodně sporadických případů leptospirózy nejen v tropických oblastech je získáno následkem expozice mimo zaměstnání, která se vyskytuje během aktivit běžného života. Mnoho infekcí je důsledkem bosé chůze ve vlhkých podmínkách nebo práce na zahradách bez ochranných rukavic. Část



propuknutí leptospirózy je zapříčiněna pitím kontaminované vody a přímým kontaktem s hlodavci (25). Obyvatelé měst jsou také ve zvýšeném riziku, protože mohou být sporadicky vystaveni kontaktu s močí potkanů, kvůli zhoršení hygienické situace uvnitř měst. Kvůli stejnému problému se zvyšuje rovněž incidence u městských dětí (15).

Leptospiróza je nejobvyklejší u dospělých mužů, což je pravděpodobně důsledkem expozic při zaměstnání a rekreačních aktivitách (18). Muži většinou pracují a provozují různé rekreační aktivity ve venkovním prostředí častěji než ženy (15). Ačkoliv většina sérií případů a přehledů leptospirózy ukazuje jako rizikovou skupinu dospělé muže, byly zaznamenány propuknutí nemoci, u kterých bylo více než 40% pacientů mladších než 15 let – opak tradiční prevalenční křivky. Možným vysvětlením v těchto případech by mohlo být to, že děti mají častější přímý kontakt s infikovanými hostiteli (např. pes) nebo nevybíravý kontakt s vodou (18).

## 2.6. Patogeneza

Mechanismy, kterými leptospiry způsobují onemocnění, nejsou dosud zcela prozkoumány. Bylo navrženo několik předpokládaných virulentních faktorů, ale až na několik výjimek zůstává jejich role v patogeneze nejasná (25). Leptospiry jsou vysoce účinné patogeny, což dokazuje jejich všudypřítomné rozšířením a různorodost patogenních mechanismů. Jedním z mechanismů virulence je pohyblivost a schopnost leptospir proplouvat přes viskózní prostředí. Patogenní mechanismy leptospir můžeme rozdělit na přímé účinky vyvolané druhem *Leptospira* a imunitní odpověď hostitele na infekci (5). Leptospirami zprostředkované poškození charakterizuje počáteční fázi onemocnění. Imunitní odpověď hostitele označuje nástup druhé fáze symptomů (18).

Patogenní *Leptospira* rychle proniká po prostoupení kůže či slizničních bariér do krevního oběhu (37). Leptospirová invaze přes epitel je následována jejich rozšířením a rozsáhlou diseminací. Může být napaden kterýkoliv hlavní orgánový systém a leptospirové antigeny mohou být detekovány v napadených tkáních (18). Bezprostředním poškozením u leptospirózy je přerušení celistvosti buněčné membrány endotelových buněk lemujících malé cévy. Důsledkem je pak kapilární prosakování a krvácení (37). Leptospiróza je tedy

charakterizována rozvojem vaskulitidy, endotelového poškození a zánětlivých infiltrátů složených z monocytů, plazmatických buněk, histiocytů a neutrofilů. Histopatologie je nejpatrnější v játrech, ledvinách, srdci a plicích, ale podle vážnosti infekce mohou být napadeny další orgány (25).

Leptospiry jsou schopné přetrvávat na některých anatomicky a imunologicky privilegovaných místech, poté jsou krevní cestou zaneseny do dalších orgánů. Nejvýznamnějším místem přežívání jsou ledvinné tubuly. Leptospiry se objevují v ledvinách 2 až 4 týdny po akutní infekci. Zvířata mohou vylučovat leptospiry přerušovaně nebo pravidelně po období měsíců či let nebo po celý svůj život. Avšak lidé nezůstávají nosiči na dlouho a moč je obvykle bez leptospir už v čase klinického uzdravení (37).

Vnější membrána leptospir obsahuje lipopolysacharid (LPS) a několik lipoproteinů (např. vnější membránový protein [OMPs]). LPS je vysoce imunogenní a je odpovědný za sérovarovou specifiku. Leptospirový LPS stimuluje přilnavost neutrofilů k endotelovým buňkám a destičkám, způsobující agregaci a má důležitou roli v rozvoji trombocytopenie (25). LPS leptospir je podstatně méně toxický než je typický gram-negativní lipopolysacharid a má odlišné biochemické, fyzikální a biologické vlastnosti (5). Fibronektin vázající protein produkovaný pouze virulentními kmeny byl popsán teprve nedávno (25) a je specificky vyjádřen na povrchu *L. interrogans* sérovar *icterohaemorrhagiae*, ale není na avirulentních kmenech. Může být významný v počátečním přilnutí a proniknutí do kožních a slizničních míst vstupu (5). Je tedy identifikováno několik leptospirových proteinů vnější membrány a lipoproteinů a dva z nich (OmpL1 a LipL41) jsou doporučeny jako možní kandidáti na očkovací vakcínu (45).

Produkce toxinů patogenními leptospirami *in vivo* byla popsána Areánem (25). U několika sérovarů byla rovněž zaznamenána endotoxická aktivita a byly popsány hemolytické, sfingomyelinázové a fosfolipázové aktivity *in vitro* (5). Hemolysiny jsou charakterizovány u několika sérovarů. Hemolysiny sérovarů *ballum*, *hardjo*, *pomona* a *tarassovi* jsou sfingomyelinázy. U sérovaru *canicola* byla popsána aktivita fosfolipázy C (25). U virulentních kmenů leptospir byla prokázána chemotaxe směrem k hemoglobinu, ne však u kmenů avirulentních či saprofytických (5).

Vaskulitida kapilár je nejčastějším patologickým znakem u leptospirózy a projevuje se endoteliálním otokem, nekrózou a infiltrací lymfocytů. Kapilární vaskulitida se objevuje v každém napadeném orgánovém systému (18). V ledvinách je hlavním nálezem intersticiální nefritida, která je doprovázená intenzivní buněčnou infiltrací neutrofilů a monocytů. Leptospiry se mohou vyskytovat v ledvinných tubulech (25). Poškození jater se projevuje jako centrilobulární nekróza s proliferací Kupfferových buněk (15). Je zde evidentní hypertrofie a hyperplázie Kupfferových buněk (25). Žloutenka se může vyskytovat jako důsledek dysfunkce jaterních buněk (15). Patologické nálezy v srdci zahrnují intersticiální myokarditidu s infiltrací převážně lymfocytů a plazmatických buněk, petechiální krvácení (hlavně v epikardu), mononukleární infiltraci v epikardu, perikardiální efúze a srdeční artritidu (25). Plicní nálezy jsou způsobeny poškozením alveolárních kapilár, buď ložiskovým nebo difúzním. V místech zasažených vaskulitidou se může vyskytovat intersticiální a intraalveolární otok a krvácení (18). Leptospiry mohou také poškodit kosterní svaly a způsobit otok, vakuolizaci myofibril a ložiskovou nekrózu (15). Přední komora oční je napadána leptospirami během akutní infekce (37). Leptospiry mohou proniknout do komorové oční tekutiny, v níž mohou přežívat několik měsíců a občas infekce vede k chronické či opakující se uveitidě (18). Poškození nervového systému je zprostředkováno hlavně imunologicky a mezi velké změny patří exudáty, leptomeningeální edém, mozkové a míšní městnání a krvácení (33).

## **2.7. Klinické příznaky**

Leptospiróza je popisována jako zoonóza se širokým spektrem projevů (25). Časná klinická prezentace je často nespecifická, spojená s výskytem horečky, bolestmi hlavy, myalgií, „chřipkovými příznaky“ a bolestmi břicha. Jsou popsány 2 klasické formy leptospirózy: anikterická (běžnější a mírnější) a ikterická (Weilův syndrom), která způsobuje těžké ledvinné, jaterní a vaskulární projevy (42). Přibližně u 90% pacientů se nemoc projevuje jako mírná anikterická forma a asi 5-10% má těžkou formu se žloutenkou, která je známá jako Weilova choroba (15). Nákaza leptospirami může mít podobu bezpříznakové infekce

prokazatelné pouze sérologicky (22). Přibližně u 15–40 % pacientů, kteří byli exponováni, ale nebyli nemocní, ukázalo sérologické testování proběhlou infekci (přítomnost protilátek) (15). Nutno zdůraznit, že v našich podmínkách většina leptospiróz probíhá lehce pod obrazem tzv. letních chřipek, a tak mnohdy zůstává nerozpoznána (22).

Infekce způsobené různými sérotypy probíhají pod různým klinickým obrazem (27). Například žloutenka je popisována u 83% pacientů s infekcí vyvolanou *L. icterohaemorrhagiae* a u 30% pacientů infikovaných *L. pomona*. Charakteristická předloketní erytematoidní vyrážka se vyskytuje u pacientů infikovaných *L. autumnalis*. Podobně gastrointestinální potíže převažují u pacientů infikovaných *L. grippotyphosa*. Aseptická meningitida se obvykle vyskytuje u pacientů s *L. pomona* nebo *L. canicola* (15). U lidí jsou těžké formy leptospirózy často způsobovány sérovary ze séroskupiny *icterohaemorrhagiae* (13). V Evropě jsou obvykle za infekce odpovědné sérovary *copenhageni* a *icterohaemorrhagiae*, které jsou přenášeny potkany, zatímco v jihovýchodní Asii je běžný sérovar *lai* (25).

Inkubační doba bývá v rozmezí 2 až 20 dnů (průměrně 10 dnů) (13). Klinicky je leptospiróza popisována jako onemocnění s typickým dvoufázovým průběhem, s úvodní akutní či septikémickou fází trvající okolo týdne, ta je následována imunní fází, která je charakterizována produkcí protilátek a exkrecí leptospir do moči. Většina komplikací leptospirózy je spojena s lokalizací leptospir uvnitř tkání během imunní fáze a tak se vyskytují až v průběhu druhého týdne onemocnění (25). Symptomy mohou přetrvávat od 6 dnů až po více než 4 týdny s průměrným trváním kolem 14 dnů (18). Ve většině případů není bifázická choroba klinicky rozlišitelná od dalších syndromů horečnatého onemocnění (5).

První fáze leptospirózy se nazývá septikémická či leptospiremická, protože mikroorganismus může být vyizolován z krevních kultur, mozkomíšního moku (CSF) a většiny tkání. Leptospiremická fáze má rychlý začátek (22). Během této fáze, která trvá zhruba 4–7 dnů, se u pacienta objevuje nespecifické onemocnění připomínající chřipku. Je charakteristické přítomností horečky, pocitem nachlazení, únavy a bolestí svalů a především jsou bolestivá lýtka, záda a břicho. Dalšími symptomy jsou kašel, bolest hlavy, bolest páteře, hemoptýza, vyrážka, fotofobie, nauzea a zvracení (15). Někdy se mohou objevit

i spojivkové sufúze (22). Po této první fázi následuje období zlepšení, které trvá asi 1-3 dny (13). Teplota poklesne a pacient se může stát afebrilním a relativně asymptomatickým. Horečka se poté opět vrátí a určuje tak nástup druhé fáze, kdy se klinicky nebo subklinicky objevuje často meningitida (15). Příznaky u anikterické a ikterické formy leptospirózy jsou v průběhu této septikémické fáze velice podobné (18).

Druhá fáze se nazývá imunní či leptospirurická, kvůli cirkulujícím protilátkám, které mohou být detekovány nebo může být mikroorganismus vyizolován z moči (15). Leptospiry zmizí z krve a z CSF a zůstávají přerušovaně v moči a v komorové oční tekutině (13). Tato fáze se vyskytuje jako následek imunologické odpovědi těla na infekci a trvá 0 až 30 dnů či více (15). Imunní fáze se může či nemusí vyskytovat a je charakterizována zvýšením titrů protilátek a zánětlivou infiltrací napadených orgánových systémů (5). Nemoc se týká specifických orgánů a mezi tyto orgány patří mozkomíšni pleny, játra, oči a ledviny. Nespecifické symptomy, jako je horečka a myalgie, mohou být méně intenzivní než v první fázi a trvají několik dnů až týdnů (15). Aseptická meningitida a dysfunkce ledvin jsou jedny z příznaků imunní fáze (18). Pozdními projevy mohou být iridocyklitida nebo myokarditida (22). U ikterické formy leptospirózy se během této fáze může vyskytovat žloutenka, různé hemoragické projevy, postižení plic a někdy také zvětšení jater (5).

Studie provedená v roce 2004 v Turecku (město Samsun) u 72 pacientů s leptospirózou zaznamenala nejčastější klinické projevy. Nejobvyklejšími symptomy byly respirační symptomy (72,1%), bolest svalů (65,7%) a nevolnost a zvracení (65,3%). Nejčastějšími klinickými příznaky u daných pacientů byly ikterus (75,0%), horečka (61,1%), tachykardie (52,9%) a spojivková sufúze (31,9%) (12).

### 2.7.1. Anikterická leptospiróza

Velká většina infekcí vyvolaných leptospirami jsou buď subklinické nebo mají velmi mírný průběh a pacienti většinou ani nevyhledávají lékařskou péči. Menší část infekcí, které ale patří mezi drtivou většinu rozpoznávaných případů, se projevuje jako horečnaté onemocnění s náhlým a prudkým začátkem (25). Anikterická forma leptospirózy je obvyklejší a vyskytuje se zhruba v 90% ze všech případů. Nemoc obvykle začíná po 10 dnech inkubační doby bolestí

hlavy, horečkou a těžkou svalovou bolestí s anorexií, nevolností, zvracením a bolestí břicha u většiny pacientů. Symptomy jsou nápadné po 4 až 7 dnech během septikemické fáze onemocnění (4). Mezi další příznaky patří spojivková sufúze a méně často také kožní vyrážka. Pokud se vyrážka vyskytuje, tak je to pouze přechodné a trvá méně než 24 hodin. Tento anikterický syndrom trvá obvykle týden. Horečka může být většinou dvoufázová a může se vracet po přestávce 3 až 4 dnů (25). Bolest hlavy je často těžká a podobá se bolesti vyskytující se při dengue s retroorbitální bolestí a fotofóbií (5). Myalgie postihující spodní část zad, stehna a lýtka je často velice intenzivní (25). Poškození dalších orgánů se vyskytuje v průběhu imunní fáze leptospirózy. U anikterických případů je úmrtí extrémně vzácné (18).

Aseptická meningitida je nejdůležitějším klinickým syndromem, který se vyskytuje v imunní fázi anikterické leptospirózy (15). Může být nalezena u více jak 25% všech případů leptospirózy a může vysvětlovat významnou menšinu všech případů aseptické meningitidy (25). Mírná pleocytóza (zvýšený počet lymfocytů v CSF) je přítomná s nebo bez meningeálních příznaků. Na počátku nemoci převládají polymorfonukleární buňky a později převažují mononukleární buňky (27). Bolest hlavy je velmi často doprovázejícím symptomem. Pacienti s aseptickou meningitidou jsou obvykle mladší než ti s ikterickou leptospirózou (25). Meningitida trvá většinou několik dní, ale výjimečně může trvat 1-2 týdny (15).

Mezi další poruchy nervové soustavy, které se mohou vyskytovat při leptospiróze patří myelopatie, meningoencefalitida, projevy podobající se syndromu Guillain-Barré, třes, intracerebrální krvácení apod. (33). V průběhu choroby se může velice vzácně objevit také oboustranná obrna lícního nervu (28).

### 2.7.2. Ikterická leptospiróza

Ikterická leptospiróza je závažné onemocnění, jehož klinický průběh je často velmi rychlý (25). Asi 5 až 10% všech pacientů s leptospirózou má ikterickou formu onemocnění. Komplikované případy se často projevují v pozdním průběhu choroby a to přispívá k vysoké mortalitě, která se pohybuje v rozmezí mezi 5 a 15% (5). Bifázický průběh je provázen vysokou a trvalou horečkou,

žloutenkou a azotémií. Závažné komplikace této formy leptospirózy zdůrazňují multisystémovou povahu nemoci (4).

Leptospiry mohou být izolovány do 24 - 48 hodin po objevení žloutenky (18). Žloutenka vyskytující se u leptospirózy není spojena s nekrózou jaterních buněk, a tak se po uzdravení vrací funkce jater do normálu. U těchto pacientů je zaznamenáváno zvýšení sérového bilirubinu a kreatininfosfokinázy s pouze mírným zvýšením hladin transamináz. Vyskytuje se také mírné zvýšení hladiny alkalické fosfatázy (25). Cholecystitida u leptospirózy (pravděpodobně způsobená zánětem žlučníku) je dobře popsána v pediatrické literatuře a často vyžaduje chirurgický zákrok. Obvyklé komplikace spojené s leptospirózou jsou bolesti břicha, nauzea a zvracení. Gastrointestinální krvácení způsobené systémovou vaskulitidou se může objevit v celém gastrointestinálním traktu a může se lišit intenzitou (15).

Renální patologie je různá v průběhu choroby (18). Leptospiróza je obvykle příčinou akutního selhání ledvin, které se projevuje u 16- 40% případů a obvykle není oligurické, pokud se objeví, bývá u pacientů významným smrtelným rizikem (5). Pacienti mohou rychle přecházet ze stavu s normální funkcí ledvin až k selhání ledvin, které již vyžaduje dialýzu. Akutní ledvinné selhání vyznačující se oligurií či polyurií se může objevit 4 až 10 dnů po nástupu symptomů. U leptospirózy byla také popsána hyperkalémie spojená s metabolickou acidózou a hyponatrémie (18). Hladina sérové amylázy je u pacientů s akutním renálním selháním často zvýšená, ale nevyskytují se u nich běžné klinické symptomy pankreatitidy (25). Přesto někdy může být leptospiróza zaměněna za pankreatitidu či cholecystitidu (45). Trombocytopénie (počet destiček menší než  $100 \times 10^9$ /litr) je celkem typická a projevuje se u více než 50% pacientů s tímto onemocněním, koreluje s výskytem selhání ledvin a je spojena se špatnou prognózou. Přesto je trombocytopénie u leptospirózy přechodná a nezpůsobuje diseminovanou intravaskulární koagulaci (DIK) (5).

Oční poškození bývá často zaznamenáváno u pacientů s vážnou formou leptospirózy (25). Spojivková sufúze a citlivost svalů jsou důležitými příznaky u tohoto onemocnění (5). Spojivková sufúze je přítomna při sklerálním ikteru. Subkonjunktivální krvácení je nejběžnější oční komplikací leptospirózy, která se vyskytuje u více jak 92% pacientů. Iridocyklitida a chorioretinitida jsou dalšími

pozdními komplikacemi, které mohou přetrvávat roky. Tyto symptomy se nejdříve manifestují 3 týdny až 1 měsíc po expozici (15).

Uveitida je významná pozdní komplikace, která může způsobovat reverzibilní či ireverzibilní slepotu u lidí a koní (34). Uveitida (incidence 2-10%) se může objevit dříve či později v průběhu onemocnění a bylo zaznamenáno, že se může manifestovat až 1 rok po proběhlém onemocnění (15). Leptospirová uveitida je obvykle akutní, občas se prezentuje jako chronická či návratná forma. Přestože negranulomatózní uveitida je nejčastějším projevem, může se vyskytovat také granulomatózní reakce přední komory. U menšího počtu případů se přední uveitida, buď jednostranná či oboustranná, objevuje po uzdravení z akutní choroby (34). Přední komora oční je postižena nejčastěji, uveitida zadní komory byla ale také zaznamenána (18). Ve studii provedené v roce 1994 v Indii bylo pozorováno 73 pacientů infikovaných leptospirózou s příznaky uveitidy. U 35 pacientů bylo oční poškození jednostranné a u 38 oboustranné. Leptospiry mohou být přítomny v komorové oční tekutině (35).

Incidence plicního poškození není jasná, ale pohybuje se v rozmezí 20-70%. Plicní nedostatečnost je tedy celkem obvyklá a je většinou spojována s vysokou nemocností a úmrtností (44). Kouření cigaret bylo označeno jako jeden z rizikových faktorů pro rozvoj respiračních symptomů (25). Mezi projevy plicního poškození se řadí kašel, hemoptýza (může být mírná či těžká), dušnost a pneumonie. Respirační symptomy se mohou změnit na závažnější a přejít v syndrom akutního respiračního selhání („respiratory distress syndrom“), který vyžaduje intubaci a umělou plicní ventilaci (18). Alveolární infiltráty a dušnost jsou špatnými prognostickými indikátory u komplikované leptospirózy (5). Šelesty je běžnější u ikterické než u anikterické formy onemocnění. Intenzita respiračních projevů nemá vztah k přítomnosti žloutenky (25).

Plicní krvácení může být dosti komplikované a někdy vést dokonce k smrti postiženého. Infekce vyvolaná leptospirami je považována za příčinu systémové vaskulitidy s poškozením kapilárního endotelu jako hlavního místa vaskulárního poškození. Bylo zaznamenáno krvácení z tracheobronchiálního kmene, parenchymu, bránice a povrchu pohrudnice (7). Rentgenové vyšetření hrudníku může odhalit jednostranné, oboustranné či multifokální infiltráty a stejně tak pleurální výpotek (25). Rentgenové abnormality jsou nejčastěji popisovány v prvním týdnu nemoci u 6-10% dospělých pacientů (7).



Anatomické a histologické studie ukazují, že tyto infiltráty jsou místy intersticiálního a intraalveolárního krvácení spolu s ohniskovým kapilárním poškozením (25). Příčina alveolárního krvácení zůstává neznámá. Hypotéza dotýkající se autoimunitního onemocnění nebyla potvrzena. Pomocí bronchiální biopsie a autopsie byly nalezeny v plicní tkáni leptospirové antigeny, což naznačuje přímé působení mikroorganismů nebo jejich toxických produktů na plicní cévní endotel (9).

Srdeční nedostatečnost je u leptospirózy celkem běžná, ale někdy bývá podceňována (25). Srdeční komplikace jsou dobře popsány u pacientů se závažnou až fatální formou onemocnění. Fatální myokarditida byla popsána poprvé v roce 1935. U pacientů se může vyskytovat myokarditida, ale i jiné srdeční poruchy. U mírného onemocnění mohou být abnormality na elektrokardiogramu (EKG) nespecifické (5). V jedné provedené studii byly nalezeny abnormality na EKG u 48% pacientů starších 14 let s těžkou leptospirózou (18). První stupeň atrioventrikulárního (AV) bloku a změny podněcující akutní perikarditidu bývají nejčastějšími nalezenými změnami (5). Inverze T-vlny se vyskytovala u 18% pacientů, povýšení ST-segmentu u 15 % a dysrytmie u 11%, ale později nebyli spojeni s přestupem do šoku či městnavého srdečního selhání. Nebylo prokázáno žádné spojení mezi srdeční nedostatečností a poškozením kosterních svalů (18).

Téměř všichni pacienti s akutní leptospirózou mají problémy s těžkou myalgii a většina také s mírnou rhabdomyolýzou. Myalgie začíná často během prvního týdne symptomů a může trvat 3 až 4 týdny. Krvácení do svalů, zejména do svalů v břišní stěně a na dolních končetinách, je příčinnou intenzivní bolesti a je ověřeno, že je odpovědné za některé akutní břišní projevy. Mechanismy navozující rhabdomyolýzu zůstávají nevyjasněné. Spekulace zahrnují úvahu o spirochetálním uvolňování toxinu, který poškozuje svaly přímo a další možností je, že leptospiry porušují svaly, což vede k zánětu a destrukci tkáně (5). Několik autorů zaznamenalo těžkou rhabdomyolýzu a podotklo, že tato komplikace může zhoršit renální poškození (11).

Krvácení se může vyskytovat u více než 39% pacientů. Projevuje se v rozsahu od epistaxis a krvácení z dásní až po hematurii, hemoptýzu a plicní krvácení. U případů leptospirózy nebyla popsána přítomnost DIK. Může se vyskytnout trombocytopenie a zvýšení protrombinového času. Rychlost

sedimentace erytrocytů je většinou také navýšená. Anémie se může projevit ve spojení s krvácivou dispozicí pacienta (18).

Pokud se leptospiróza vyskytuje v těhotenství, může zapříčinit potrat a smrt plodu, ale není tomu tak vždy (18). Ve skupině 16 případů těhotných žen infikovaných leptospirózou byl samovolný potrat pravděpodobný během prvních 2 trimestrů. Každé třetí těhotenství skončilo potratem nebo perinatální smrtí, pokud se nemoc objevila v třetím trimestru. Leptospiry mohou být vyzolovány z mateřského mléka a v jednom případě byl sérovar hardjo přenesen kojením z infikované matky na její dítě (25). Leptospiróza může způsobit dokonce smrt plodu z infekce, která u matky byla pouze subklinická (18).

Mezi další vzácné komplikace leptospirózy patří cerebrovaskulární příhody, trombotická trombocytopenická purpura, akutní cholecystitida, erythema nodosum, aortální stenóza, Kawasakiho syndrom, reaktivní artritida, epididymitida, mužský hypogonadismus a syndrom Guillain-Barré (25).

Diferenciální diagnóza leptospirózy musí počítat s nemocemi, které v daném místě převládají a jsou obvyklé, a které se prezentují nediferencovanou horečkou, jako například malárie, riketsióza, arbovirální infekce (dengue, žlutá horečka a další). Diagnóza musí také zahrnovat běžné virové infekce jako chřipka, HIV sérokonverze a kromě toho také bakteriální příčiny horečky neznámého původu jako je například tyfus. U pacientů s plicní nedostatečností musí brát diferenciální diagnóza také v úvahu hantavirové infekce. Vážné horečnaté onemocnění s krvácivými projevy může udělat leptospirózu klinicky nerozlišitelnou od virových hemoragických horeček (5).

### 2.7.3. Weilova nemoc

Tato forma onemocnění je nejzávažnějším možným stupněm leptospirózy. Má mnoho jiných synonymních názvů (např. Fiedlerův syndrom, Landouzyho syndrom, Mathieova choroba aj.). Původcem je *L. icterohaemorrhagiae* a tato nemoc je rozšířená prakticky po celém světě (25). Nákaza se mezi hlavními rezervoárovými hostiteli, kterými jsou potkani, volně šíří, což je dáno hlavně tím, že u nich nevyvolává onemocnění (21). Infikovaný potkan vylučuje leptospiry převážně močí.

Inkubační doba je obvykle 1 až 3 týdny. Onemocní většinou mladí lidé, děti méně často a průběh je u nich lehčí (45). Kritéria určující u koho dojde k rozvoji

Weilovy choroby nejsou dobře ohraničená. Tato komplikovaná forma leptospirózy se zprvu manifestuje jako žloutenka, renální dysfunkce, jaterní nekróza, plicní dysfunkce a krvácivá dispozice. Uvedené příznaky se vyskytují na konci prvního stádia a vrcholí v stádiu druhém, ale stav pacienta se může kdykoliv náhle zhoršit. Chorobu provází rovněž vysoká horečka, bolesti svalů a kloubů, poruchy vědomí, meningeální příznaky, oční komplikace a další symptomy. Plicní projevy zahrnují kašel, dušnost, bolest na hrudníku, krvavé sputum, hemoptýzu a poruchy dýchání. Cévní a renální dysfunkce doprovázená žloutenkou se projevuje asi 4 až 9 dní po nástupu nemoci a ikterus může přetrvávat několik týdnů. Může být přítomná také hepatomegalie, dále oligurická či anurická akutní tubulární nekróza, která někdy způsobuje hypovolémii a snížení ledvinného průtoku (15).

Není-li onemocnění včas rozpoznáno a adekvátně intenzivně léčeno, tak není výjimkou ani letální průběh. U nemocných včas diagnostikovaných a intenzivně komplexně léčených je předpověď relativně dobrá, jinak mimo dětský věk je onemocnění vždy těžké, mnohdy životu nebezpečné (24). Na území ČR se smrtnost na Weilovu hepatitidu stále pohybuje mezi 5 až 10% (21). Nejhorší případy Weilova onemocnění s hepatorenálním selháním a žloutenkou mají úmrtnost v rozmezí 20-40% (15). Příčinnou smrti při Weilově žloutence je hemoragická diatéza, intersticiální nefritida a multiorgánové selhání (46).

#### 2.7.4. Žňová horečka

Někdy se také nazývá polní či blatácká horečka, protože se vyskytuje (občas dokonce i v epidemiích) v období žní či začátkem podzimu zvláště u lidí, kteří pracují na polích, vlhkých loukách a na blatech v období deště. Původcem je *L. grippotyphosa*. Hlavním rezervoárovým zvířecím hostitelem mikroorganismu je hraboš polní, vedlejšími pak různé druhy hrabošů a myši (40). Tato leptospiróza má podstatně lehčí průběh, je mnohem častější a řada případů zřejmě uniká diagnóze právě pro svůj lehký průběh.

Inkubační doba je kolísavá, většinou 2 až 14 dní. U typického průběhu bývá náhlý začátek, horečka, myalgie, pocit vyčerpanosti a téměř vždy bolesti hlavy. Dále se mohou objevit příznaky jako vyrážka, kašel, plicní infiltrace a záněty žlučníku. Onemocnění je krátkodobé a prognóza je dobrá. Obvykle je nutná jaterní dieta (13).

### 2.7.5. Štuttgartská nákaza

Označuje se jinak také jako psí tyfus a vyvolává ji *Leptospira canicola*. Průběh onemocnění u psa může být velmi těžký, poměrně často smrtelný a to zvláště u psů starých. Smrtnost bývá 10-80%. Nemocný pes je pak zdrojem nákazy pro psy, domácí zvířata popřípadě i pro člověka. Nákazou jsou ohroženi zvláště majitelé a chovatelé psů, psovodi a veterináři (40). U člověka bývá onemocnění sérotypem *canicola* středně závažné, žloutenka se vyskytuje vzácněji. Může tedy probíhat lehce pod obrazem žňové horečky, ale i komplikovaně pod obrazem Weilovy choroby (18).

## **2.8. Laboratorní diagnostika**

Diagnóza leptospirózy zůstává často nepotvrzená, a to především kvůli nedostatku klinických příznaků, nevhodnému odebírání vzorků, nedosažitelnosti diagnostických metod nebo kvůli kombinaci těchto faktorů (26). Vzhledem k rozmanitosti klinických projevů je leptospiróza často špatně diagnostikovaná jako aseptická meningitida, chřipka, nemoc jater či horečka neznámého původu. Proto je diagnóza spíše založená na laboratorní diagnostice než na samotných klinických projevech (29).

Laboratorní diagnostika leptospirózy může být prováděna buď přímým průkazem mikroorganismů nebo sérologickými testy, které detekují leptospirové protilátky (5). Diagnóza se dá stanovit na základě klinické a profesionální anamnézy, společně s počátečními laboratorními nálezy, které jsou později potvrzeny sérologicky (47). Etiologické potvrzení je absolutně zbytečné pro počátek terapie, důležité je vyloučení dalších důležitých nemocí (malárie, žlutá zimnice, septikémie atd.) (13).

### 2.8.1. Obecné laboratorní nálezy

Sedimentace erytrocytů je zvýšená a je pozorována periferní leukocytóza s posunem vlevo (15). Trombocytopenie je běžná a může se vyskytovat. Jaterní testy ukazují nepatrné zvýšení aminotransferáz, bilirubinu a alkalické fosfatázy při nepřítomnosti žloutenky. U ikterické leptospirózy jaterní testy obvykle prokazují významný vzestup bilirubinu, menší zvýšení transamináz a mezní

zvýšení hladin alkalické fosfatázy (25). Může být přítomná proteinurie. V močovém sedimentu se mohou vyskytovat leukocyty, erytrocyty, hyalinní a zrnité válce (15). Poškození ledvin vyvolává zvýšení hladin plazmatického kreatininu. Stupeň azotémie se liší podle těžkosti choroby (25). CSF protein může být normální nebo lehce zvýšený, CSF glukóza je obvykle normální. U pacientů s těžkou žloutenkou se může objevit xantochromie (5). Tlak CSF je normální, ale lumbální punkce může ulevit od bolesti hlavy (15).

Tyto nálezy získané rutinními laboratorními testy pouze naznačují diagnózu leptospirózy, pro jejíž potvrzení jsou potřebné specifické mikrobiologické testy (5).

### 2.8.2. Mikroskopie

Leptospiry mohou být v klinickém materiálu pozorovány pomocí mikroskopie v zástinu, fázově kontrastním mikroskopem, imunofluorescentním či imunoperoxidázovým barvením nebo také mikroskopii po obarvení stříbřením. Mikroskopie krve, moči a CSF je někdy prováděna, ale má malou senzitivitu a nedostačující specifitu (4). Mikroskopie krve má význam pouze během několika prvních dnů akutního onemocnění, kdy se vyskytuje leptospirémie. Barvicí metody jsou používány ke zvýšení citlivosti vyšetření přímou mikroskopii. Patří sem hlavně imunofluorescenční barvení moči, vody a eluátu půdy a imunoperoxidázové barvení krve a moči. Leptospiry byly poprvé obarveny pomocí stříbření (25).

Mikroskopie v zástinu: Typická pohyblivost leptospir v klinickém vzorku (krev, CSF, moč či peritoneální tekutina) je pozorována mikroskopii v zástinu a může přispět k dřívější diagnóze. Je to jednoduchá metoda, ale nemusí mít pozitivní výsledek, pokud je ve vzorku přítomno jenom několik bakterií. Artefakty jako lyzované erytrocyty, fibrily atd. mohou být zaměněny za leptospiry (37). Vyšetření tělesných tekutin mikroskopii v zástinu je necitlivé a nedostatečně specifické (25).

Mikroskopie ve fázovém kontrastu: Tato metoda je využívána pro pozorování leptospir v laboratoři, ale kvůli jejím technickým omezením a optickým charakteristikám, nemá praktický význam, pokud je dostupná mikroskopie v zástinu (37).

Imunofluorescence: Imunofluorescenční barvení leptospir je často výhodnější než stříbření vzorků z prostředí a klinických vzorků, protože jsou leptospiry lépe vidět, obzvláště malé počty. Použije-li se kombinace antiséra značeného různými fluorochromy, může být identifikován ve stejném preparátu více než jeden sérologický typ leptospir (37). Imunofluorescenční mikroskopie je rozsáhle využívána k prokázání mikroorganismů ve veterinárních vzorcích (25).

Barvení stříbřením: Pomocí těchto metod mohou být barveny leptospiry v tkáňových nátěrech nebo tekutiny na sklíčkách. Barvení je založeno na chemicky redukovaném povrchu leptospir a dalších spirochet. Dobře obarvené preparáty ukazují černé spirochety ve světle žlutých či hnědých tkáních (37). Tato metoda má stejná omezení jako mikroskopie v temném poli (25).

### 2.8.3. Izolace a kultivace leptospir

Izolace mikroorganismů kultivací umožňuje definitivní diagnózu (15). Leptospiry mohou být izolovány ze vzorků krve a CSF během prvních 7 až 10 dní nemoci a z moči během 2. a 3. týdne (5). Leptospirémie trvá pouze prvních 10 dní nemoci, proto je vhodné dělat krevní kultivace co nejdříve po nástupu klinických příznaků (4). Infekční sérovar může být izolován pouze kultivací (15). Leptospirurie je přítomná od druhého týdne a déle (4). U některých pacientů mohou zůstat močové kultivace pozitivní i měsíce či roky po prodělaném onemocnění (15).

Leptospiry mohou být kultivovány na selektivních půdách obohacených neomycinem nebo 5-fluorouracilem (18). Leptospiry dobře rostou na Fletcherově půdě nebo komerčně dostupném EMJH médiu (4). Kultivace moči se provádí na alkalizovaných půdách (47). Kultury jsou inkubovány při 28 až 30°C a každý týden jsou vyšetřovány pomocí mikroskopie v zástinu a to až do 13. týdne, než jsou likvidovány (25).

Kultivace je obtížná, vyžaduje několik týdnů inkubace a má nízkou citlivost (5). Kultivační techniky tedy nehrají významnou roli v diagnóze nemoci (4). Může být ale mimořádně hodnotná u pacienta, u kterého je sérologická odpověď pomalá nebo někdy může dokonce naprosto chybět, pokud jsou brzy podána antibiotika (37).

#### 2.8.4. Sérologické metody

Při laboratorní diagnostice leptospirózy jsou nejčastěji používanými metodami sérologické testy (5). Během prvního týdne onemocnění může být sérologie negativní a musí být zopakována s odstupem 7-10 dnů, kdy jsou vysoce vyjádřené klinické příznaky, popř. později (20). Protilátky jsou detekovatelné v krvi přibližně 5 až 7 dní po nástupu symptomů (25). Protilátky obvykle reagují simultánně s mnoha různými typy leptospir. Po 1 až 2 měsících bývá specifický titer sérovaru vysoký, zatímco titry proti jiným sérovarům klesají dolů. Včasná antibiotická léčba může snižovat tvorbu protilátek (47). Sérologické metody se rozdělují do dvou skupin: genově specifické metody a séroskupinově specifické metody (25).

Metoda mikroaglutinace-lýzy (MAL): MAL je referenční standardní test pro sérologickou diagnostiku leptospirózy, protože je vysoce citlivá a specifická (5). MAL je používána v humánní i veterinární medicíně pro stanovení leptospirových protilátek v diagnostice leptospirózy již mnoho let. Je to jednoduchá technika a vyžaduje jen málo finančně nákladné zařízení (19). Metodou aglutinace je nutno vyšetřit sérum jak v akutní fázi (tedy po jednom až dvou týdnech trvání nemoci), tak i v rekonvalescenci (tři až čtyři týdny od začátku onemocnění a déle). Pozitivita MAL od druhého týdne mnohdy narůstá až na mnohatisícové hodnoty (22).

MAL je prováděna se suspenzemi živých kultur leptospir nebo kultur inaktivovaných přidáním neutralizovaného formaldehydu. Shluky aglutinovaných žijících leptospir se liší vzhledem od shluků mrtvých spirochét (37). Séra pacientů reagují s antigenními suspenzemi leptospirových sérovarů. Po titraci a inkubaci jsou směsi sérum-antigen vyšetřovány mikroskopicky na aglutinaci a jsou určeny titry. Rozsah používaných antigenů by měl zahrnovat reprezentativní sérovary všech séroskupin a všechny místní běžné sérovary (25). Aglutinace je vidět, pokud sérum od pacienta obsahuje protilátky (34).

MAL je vyhodnocována mikroskopii v temném poli. Konečným bodem je nejvíce zředěné sérum, u kterého se vyskytuje 50% aglutinace. Protože je velice těžké určit, kdy jsou leptospiry aglutinovány z 50%, tak je konečný bod určován podle přítomnosti přibližně 50% volných, neaglutinovaných leptospir v porovnání s kontrolou (25). Standardní kritéria pro pozitivní MAL jsou čtyřnásobné zvýšení protilátkového titru nebo konverze ze séronegativity na titer

1:100 či větší (5). Párová séra jsou vyžadována pro potvrzení diagnózy. Interval mezi prvním a druhým odebraným vzorkem závisí na časovém období mezi nástupem klinických projevů a příchodem pacienta k lékaři či na vyšetření (25).

Metoda mikroaglutinace-lýza může mít falešně negativní výsledek v případě nepřítomnosti infekčního sérovaru v testovacím panelu antigenů a naopak falešně pozitivní (v nízkém titru) při přítomnosti reziduálních protilátek v séru v endemických oblastech. Časná antibiotická terapie rovněž někdy způsobuje falešnou negativitu (34). Falešně pozitivní výsledky MAL (v nízkých titrech) se mohou vyskytovat u případů lymfské nemoci, syfylis a případů vyvolaných bakterií *Legionella* (18). Průkaz infekčního sérovaru je důležitý pro diagnózu i z důvodů epidemiologických (19). Jednotlivé sérovary leptospir způsobují charakteristické klinické obrazy, mají své původní zvířecí rezervoáry, a proto je důležité určit sérovar původce onemocnění (10).

Enzymová imunoanalýza (EIA): EIA metody používají široce reaktivní antigen a patří mezi standardní sérologické metody stejně jako MAL. Protože je detekován imunoglobulin M (IgM), mohou být užitečné pro diagnózu nových infekcí ve 3 až 5 dnech (15). Jak konjugáty značené peroxidázou tak i ureázou jsou uspokojivě využívány (37). EIA metody jsou aplikovány v početných modifikacích (25). Existuje několik nových komerčně dostupných rychlých metod pro detekci protilátek, které detekují genově specifické protilátky, IgM nebo IgG i IgM. Testy detekující IgM jsou citlivější než MAL a dávají pozitivní výsledky v akutní fázi onemocnění (26). EIA test umožňuje detekovat antileptospirové protilátky o něco dříve než MAL, většinou okolo 5 dní po začátku klinických projevů (45). U pacientů s ikterickou leptospirózou mohou být objeveny IgM protilátky pomocí EIA metod v CSF (25).

Komplement fixační reakce (KFR): KFR byla široce využívána, ale metody nebyly standardizovány. KFR byla používána ve veterinární medicíně, ale byly zaznamenány druhově specifické rozdíly. Tato metoda byla nahrazena hlavně metodami EIA (25).

Makroskopický aglutinační test: Rychlý makroskopický sklíčkový aglutinační test může být využíván k pozorování lidských a zvířecích vzorků sér. Tyto testy jsou prováděny s hustou suspenzí leptospir, které aglutinují do shluků viditelných pouhým okem (37).



Mikrokapslový aglutinační test: Tento test byl vyvinut v roce 1982 pro sérodiagnostiku leptospirózy. Je založený na pasivní aglutinaci syntetických polymerních nosičů s leptospirovými protilátkami (37). Výhodou této přímé aglutinační metody je, že může být bez jakékoliv modifikace použita na zvířecí séra (25).

Latex aglutinační test: Test je založen na potažení komerčně dostupných latexových částic leptospirovým antigenem. Antisérum reaguje s antigenem a způsobuje aglutinaci částic (37).

Metody se senzibilizovanými erytrocyty: Bylo popsáno několik metod používajících senzibilizované červené krvinky (25). Leptospirové extrakty (lipopolysacharidy) a senzibilizující látka jsou používány k senzibilizaci ovčích či lidských červených krvinek (37). Vede to k rozvoji hemolytického testu vyžadující komplement a hemaglutinační látku a ještě k několika dalším modifikacím. Tyto testy detekují IgM i IgG protilátky. Patří sem také nepřímý hemaglutinační test. Jedná se o rychlou a jednoduchou metodu, která je založena na druhově specifických protilátkách. Sérum pacientů je smícháno s antigeny potaženými či nepotaženými kontrolními buňkami v mikrotitrační destičce. Destička je inkubována 1 hodinu a poté je odečítána hodnocením s rozsahem od nuly do ++++ (18).

Povrchové leptospirové proteiny: Identifikace leptospirových proteinů, exprimovaných během akutní a rekonvalescentní fáze nemoci, by mohlo pomoci k rozvoji nových sérodiagnostických postupů. Leptospirový protein p32 (Lp32) byl objeven jako vysoce citlivý a specifický a mohl by být užitečný pro vývoj nových laboratorních technik pro diagnózu. Je zřejmé, že Lp32 je hlavní vnější membránový protein, který je exprimován během počáteční fáze infekce se zvyšující se sérokonverzí (32).

#### 2.8.5. Molekulární biologické metody

Rychlá identifikace etiologických agens a rozlišení leptospirových sérovarů jsou důležité pro prevenci vysoké úmrtnosti spojené s určitými séroskupinami (3). Kvůli obtížnostem spojených se sérologickou identifikací leptospirových izolátů je velký zájem o molekulární metody pro identifikaci a subtypizaci (25). Byly objeveny četné techniky založené na PCR, které jsou postaveny na typizaci leptospirálních referenčních kmenů. Další molekulární techniky jako je

metoda polymorfismu délky restričních fragmentů (RFLP) a pulsní gelová elektroforéza (PFGE) jsou nápomocné v klasifikaci leptospir do séro skupin (3). Laboratorní potvrzení je také důležité pro účinnou terapii a pro epidemiologické mapování. Kvantifikace virových a bakteriálních agens v biologických vzorcích užívající PCR amplifikaci má význam pro klinické i výzkumné účely (43).

Polymerázová řetězová reakce (PCR): PCR je citlivá, specifická a rychlá technika, která je úspěšně aplikována pro detekci mikrobů a virů v různých vzorcích (2). Je používána k diagnostice infekčních nemocí způsobených choulivými či pomalu rostoucími bakteriemi jako je *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum* a *Borrelia burgdorferi* a dalších (29). Aplikace této metody byla popsána pro diagnózu leptospirózy u koní, dobytka, psů a lidí (16,17). Testované klinické vzorky zahrnují moč, krev, komorovou oční tekutinu, sputum, sperma, stolici, CSF a další tkáně (2,16). Užití citlivé metody jako je PCR může poskytovat informaci o periodě, během které pacienti vylučují leptospiry v moči a o účinnosti léčby antibiotiky (2).

Principem PCR je *in vitro* enzymatická amplifikace definované sekvence DNA opakovanou polymerizací prováděnou termostabilní DNA polymerázou a připraveným párem krátkých fragmentů DNA (oligonucleotidů), které se specificky váží na dané sekvence (37). Amplifikace je prováděna paralelně z každého vzorku dvěma dvojicemi primerů např. G1, G2 a B64-I, B64-II (44). Detekce amplifikované DNA leptospir je prováděna elektroforézou (10). PCR byla poprvé vyvinuta pro detekci leptospir ve vzorcích moči infikovaného dobytka (37).

Kvantitativní PCR (TaqMan) zkouška pro patogenní *Leptospira spp* bývá využívána jak na vzorky krve i moče a neopírá se o izolaci ani kultivaci mikroorganismů. Je specifická pro leptospiry a rozeznává patogenní a nepatogenní kmeny (39). Tato metoda může být také používána u pacientů, kteří již začali s antibiotickou léčbou (5).

Restriční enzymová analýza DNA (REA): Tato metoda je založena na extrakci DNA ze stejnorodé populace mikroorganismů, natrávení DNA restriční endonukleázou a elektroforézu tato pozměněné DNA v agarózovém gelu. Takto vytvořené otisky DNA jsou vysoce specifické pro každý typ leptospir. Metoda se ukázala být dostatečně citlivou k rozlišení leptospirových sérovarů na základě genetických rozdílů (37).

Pulsní gelová elektroforéza (PFGE): PFGE je variantou elektroforézy v agarózovém gelu a umožňuje analýzu fragmentů bakteriální DNA. Tento proces je technicky náročnější, vyžaduje dražší a specializovanější zařízení, ale poskytuje vysoce specifické restriční profily s dobře rozloženými fragmenty (37). PFGE analýza se stala standardem pro molekulární charakterizaci leptospirových izolátů (25).

Testování nukleových kyselin a hybridizace: Nukleové kyseliny (NK), které obsahují specifické sekvence jsou izolovány, čištěny a označeny referenční molekulou například radioaktivní ( $^{32}\text{P}$  nebo  $^{35}\text{S}$ ) nebo neradioaktivní (biotin, digoxigen). Značená DNA v jednořetězcové formě je potom hybridizována k ssDNA ve tkáních (hybridizace in situ), na papíře (Southern blot hybridizace) nebo v roztoku (roztoková hybridizace). Jsou-li nukleotidové sekvence v sondě NK komplementární s těmi ve vzorku, nastane hybridizace a výsledky jsou monitorovány autoradiografií (v případě sond značených radioaktivním materiálem) nebo kalorimetricky (u neradioaktivního materiálu) (37).

Ribotypizace: Nedávno byly použity ribozomální genové restriční vzory ribonukleové kyseliny pro identifikaci species a epidemiologickou typizaci. Zachování povahy genu rRNA požaduje užití jednotlivé sondy pro typizaci bakterie pro každé fylogenetické srovnávání (37). Ribotypizace ukázala dobrou souvztažnost s fylogenetickou klasifikací leptospir do 11 genomospecies (25).

## 2.9. Léčba

Leptospiroza je ve všech svých formách přístupná antibiotické léčbě (37). Léčení by mělo začít co nejdříve po nástupu prvních příznaků onemocnění. Antimikrobiální terapie je indikována u vážných forem leptospirózy, ale je někdy sporná u forem mírných (15). Léčba onemocnění se tedy liší v závislosti na závažnosti a trvání symptomů v době rozpoznání infekce. Pacienti s mírnými projevy připomínajícími chřipkové onemocnění vyžadují pouze systematickou léčbu, ale měli by určitě vyhledat lékařskou pomoc, pokud se u nich objeví žloutenka. Pacienti s komplikovanější formou anikterické leptospirózy potřebují nemocniční hospitalizaci a pečlivější pozorování. Průběh ikterické leptospirózy vyžaduje většinou na počátku přijetí pacienta na jednotku intenzivní péče (25).

Leptospiry jsou citlivé v laboratorních testech ke všem užívaným antibiotikům kromě chloramfenikolu a rifampicinu (37). Není známo, zda systémová antibiotická léčba během septikemické fáze má nějakou ochrannou roli, pokud jde o dlouhotrvající komplikace jako je uveitida (34). Mírné leptospirózy jsou léčeny doxycyklinem, ampicilinem nebo amoxicilinem. Na těžkou leptospirózu je primárním lékem penicilin G, který je hodně používán v klinické praxi. Alternativními léky jsou ampicilin, amoxicilin nebo erytromycin. Může být použito i několik dalších antibiotik, ale klinické zkušenosti s nimi jsou omezené (15).

Penicilin by se měl podávat již během leptospirémické fáze, a to především u vážně nemocných jedinců. Žádné antibiotikum sice nemůže zabránit ničivým účinkům leptospir v tkáních a orgánech, ale u penicilinu byly objeveny blahodárné účinky snižující úmrtnost a trvání nemoci u vážné formy, pokud je podáván intravenózně, a to dokonce i v pozdním stádiu (37). V praxi je u komplikovaných případů systémové leptospirózy podáván intravenózně penicilin G 1,5 milionů jednotek každých 6 hodin po dobu týdne (34). Ceftriaxon má výhodu ve snížení frekvence podávání (pouze jednou denně) a v možnosti výběru z intravenózní či intramuskulární formy aplikace. Je rovněž cenově výhodnější než penicilin a může být alternativním antibiotikem u pacientů s alergií na penicilin (5).

Důležitý je však komplexní terapeutický přístup zohledňující možná orgánová postižení. Prognóza onemocnění, vyjma ikterické formy leptospirózy, je příznivá a nemoc nezanechává následky. U Weilovy choroby je prognóza dána včasností stanovení diagnózy a komplexní péčí (22).

## **2.10. Prevence**

V současnosti je prevence lidské leptospirózy velmi obtížná a je nemožné zcela eliminovat její zvířecí hostitelské rezervoáry. Účinná likvidace potkanů, vakcinace dobytka a domácích zvířat by mohla pomoci ke snížení prevalence této nemoci, především ve státech s jejím vysokým výskytem (4). Prevence je složitá, protože mikroorganismy nemohou být úplně eradikovány z populace divokých zvířat, která se podílí na přenosu onemocnění na domácí zvířata (15). Nejlepším způsobem, jak se vyvarovat leptospirózy, je vyhnout se kontaktu se

zvířaty a oblastem, které mohou být kontaminované jejich močí. Lidé, jejichž zaměstnání, cestování či zájmové aktivity s sebou přináší určitá rizika, by měli být informováni o této nemoci a rovněž o tom, jak se jí co nejlépe vyvarovat (37).

Mezi významná opatření pro prevenci nemoci patří zabránění močení infikovaných zvířat do vod, se kterými přichází člověk do kontaktu, dále dezinfekce kontaminovaných pracovních ploch, provádění dobré osobní hygieny a používání osobního ochranného vybavení, pokud je to třeba (15). Důležité je mytí rukou dezinfekčním prostředkem bezprostředně po přímém kontaktu s mrtvými či nemocnými zvířaty nebo po kontaktu s potenciálně kontaminovaným materiálem. Mezi osobní ochranné vybavení patří voděodolné kalhoty, boty, rukavice, masky a zástěry (27). Lidé by si také měli být vědomi nebezpečí při plavání v řekách a rybnících podezřelých z kontaminace (37).

Dalším veřejným zdravotním opatřením je zvýšená kontrola počtu hlodavců (15). S tím souvisí i vedení domácího chovu potkanů i myší, který je v současné době díky nenáročnosti ve značné oblibě a lidé si neuvědomují nebezpečí spojená s tímto chovem. Zvláště by se mělo zabránit, aby chovaný potkan přišel do jakéhokoliv styku s populacemi divoce žijících potkanů nebo s prostředím, které je těmito potkany kontaminovaným (21).

Lidé ve vysokém riziku leptospirózy mohou uvažovat o chemoprofylaxi doxycyklinem (200 mg perorálně, 1 týden), která začíná většinou 1 až 2 dny před expozicí a trvá v průběhu předpokládané expozice (38). Bylo potvrzeno, že profylaxe doxycyklinem nezabrání leptospirové infekci v endemických oblastech, ale má významný ochranný účinek ve snižování nemocnosti a úmrtnosti. Může se zdát neúčelné podávat chemoprofylaxi ve vysoce endemických oblastech, ale je to pravděpodobně užitečné pro dobrodružné cestovatele a vojenské pracovníky, kteří navštěvují endemické oblasti a rovněž u infekcí způsobených laboratorní nehodou (5).

Očkování je dostupné pro dobytek a pomáhá zpravidla zabránit infekci u dalších domácích zvířat (psi). Tyto zvířecí vakcíny jsou sérovar specifické a jsou účinné, když je přítomen jeden nebo několik sérovarů. Proto by podávaná vakcína měla obsahovat sérovary převládající v dané oblasti (15). Komerčně dostupné jsou očkovací látky obsahující suspenze mrtvých *L. borgpetersenii* sérovar *hardjo* a *L. interrogans* sérovar *pomona*. Vakcíny jsou aplikovány

subkutánně nebo intramuskulárně ve dvou hlavních dávkách měsíc po sobě (37). Očkování dobytka vakcínami obsahujícími mrtvé leptospiry vyvolá protilátkovou odpověď. Očkování není 100% účinné u všech očkovaných zvířat (27).

Psi jsou očkováni kvůli své ochraně a ochraně majitelů (37). Psí vakcíny běžně obsahují sérovary *canicola* a *icterohaemorrhagiae*. Očkovací látky chrání proti onemocnění a vylučování leptospir ledvinami, ale byl zaznamenán přenos sérovaru *icterohaemorrhagiae* z očkovaných psů na lidi (25). Přece jenom se tedy u očkovaných psů může vyskytovat renální infekce a přetrvávající leptospirurie (15). Mimo to mohou být očkovaní psi nakaženi jinými sérovary než těmi, které jsou obsaženy v komerčních vakcínách (25).

Očkování zabraňující leptospiróze u lidí je dostupné jen v několika zemích. Větší rozvoj vakcíny proti lidské leptospiróze ovlivňuje negativně několik faktorů. Často byly popisovány vedlejší účinky, které vyvolávaly vakcíny obsahující mrtvé bakterie. Tyto bakteriální očkovací látky poskytují pravděpodobně krátkodobou a možná nekompletní ochranu. Dále je zde teoretická možnost rozvoje autoimunitní choroby, jako je uveitida. Zatím rovněž nejsou zcela objasněny obranné imunitní mechanismy proti leptospirové infekci (5).

Lidské vakcíny jsou sérovar specifické a jejich aplikace se musí opakovat každý rok. Jsou spojeny s bolestivým otokem, hlavně po přeočkování (15). Očkovací látky jsou tedy složeny z mrtvých kultur leptospir. Většinou jsou aplikovány subkutánně dvě dávky po 3 až 4 týdnech. K dispozici jsou rovněž složené multivalentní kombinované vakcíny účinkující proti několika sérovarům, podle toho jak vyžadují místní potřeby (37).

Preparáty leptospirových LPS mohou vyvolat ochrannou imunitu, ale jsou sérovar specifické a očkování by vyžadovalo užívání kombinace obvyklých převládajících sérovarů v dané oblasti. Po identifikaci povrchových leptospirových proteinů by mohla být v relativně krátké době připravena protektivní vakcína. OMP, které stimulují IgM odpověď a další nedávno popsané povrchové proteiny by mohly být využity jako kandidáti pro přípravu vakcíny, která by měla široký účinek v prevenci leptospirózy u lidí a zvířat (4).

### **3. MATERIÁL A METODY**

#### **3.1. Pacienti**

Skupina 33 pacientů s pozitivním výsledkem vyšetření metodou MAL v parazitologické laboratoři v Ústavu klinické mikrobiologie ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Krevní séra od pacientů byla vyšetřena touto metodou v rozmezí let 1999 až 2005. Tuto skupinu tvořilo 25 mužů a 8 žen. U 27 pacientů byla určena diagnóza leptospirózy, u 6 pacientů byla stanovena diagnóza jiná. Věkové rozmezí u pacientů s diagnostikovanou leptospirózou bylo od 12 do 62 let, průměrný věk pacienta byl 31 let.

#### **3.2. Laboratorní metody**

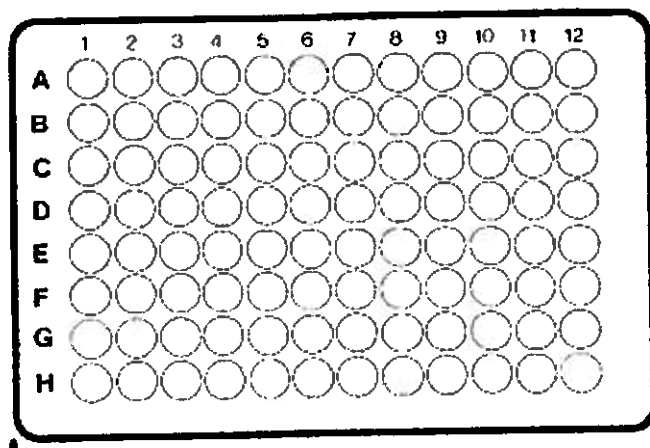
##### **3.2.1. Metoda mikroaglutinace – lýza (MAL)**

Nejčastěji je laboratorní diagnostika leptospirózy prováděna pomocí sérologického vyšetření krevních sér pacientů na přítomnost protilátek proti patogenním leptospirám metodou MAL. Metoda MAL pracuje s živými kmeny leptospir a je využívána, jako kvalitativní i kvantitativní test pro detekci protilátek proti *Leptospira sp.* v krevních sérech pacientů. Metoda současně slouží k jejich určení a zařazení do sérovarů v rámci druhu podle současné taxonomie. Protilátky se objevují asi za 8 dní od počátku onemocnění, v období kdy leptospiry mizí z krevního řečiště a ze všech tkání kromě mozku, očí a ledvin, ve kterých se mohou dále množit. Na průkaz protilátek se odebírá alespoň 5 ml srážlivé krve do suchých sterilních zkumavek a až do provedení vyšetření je uchovávána při teplotě 4 až 10 °C. Sérologické vyšetření se doporučuje opakovat s odstupem 2 – 3 týdnů kvůli sledování titru protilátek.

Vyšetřovaná krevní séra jsou nejprve naředěna v plastickém panelu s jamkami v poměru 1:50 s fosfátovým pufrům (PBS), tj. 20 µl séra a 1 ml PBS. Poté jsou leptospiry v tekutém Korthofově mediu (vybrané antigeny = jednotlivé živé kmeny daných druhů patogenních leptospir) připraveny do jamek mikrotitrační destičky. Z kultivačních zkumavek jsou odsávány antigeny sterilními pipetami, které jsou před použitím ještě vyžihány v plameni. Odsávání

se provádí pomocí pístového nástavce nebo balónku, lze rovněž použít poloautomatickou pipetu a sterilní mikrotitrační špičky. Je odebíráno jen množství bezprostředně nutné do reakce. Pracuje se sterilně v prostoru, který byl předem vyzářen UV lampou. Živé kmeny leptospir jsou kultivovány v Korthofově médiu a pasážovány dle růstu přibližně za 1 až 3 týdny.

Reakce je uskutečňována v mikrotitračních destičkách. První řadu mikrotitrační destičky vždy tvoří negativní kontrola kmenů, což znamená, že je do každé jamky této řady napipetováno místo zředěného krevního séra 50  $\mu$ l PBS. Do dalších jamek v ostatních řadách jsou dávkována séra pacientů naředěná v plastickém panelu nebo ve zkumavkách v poměru 1:50 (t.j. 20  $\mu$ l krevního séra + 1000  $\mu$ l PBS). Séra jsou umístována tedy do vodorovných řad, vždy naředěné krevní sérum od jednoho pacienta do všech 11 jamek jedné vodorovné řady. Poté jsou svisle k sérum přidávány vždy po 50  $\mu$ l jednotlivé antigeny (patogenní leptospiry – 11 sérovarů vyskytujících se na území ČR u člověka, které jsou uvedeny v tab. č. 3). Každé sérum je tedy inkubováno se všemi 11 antigeny základní řady. Destička je následně přikryta a inkubována při 37 °C v termostatu nebo 2 hodiny při laboratorní teplotě.



Obr. č. 4. Mikrotitrační destička



Tab. č. 3. Řada antigenů pro screeningové vyšetření

pořadí Ag	daný antigenní kmen
1.	<i>Leptospira icterohaemorrhagiae</i> Fryšava
2.	<i>L. copenhageni</i> Lebe
3.	<i>L. grippotyphosa</i> P 125
4.	<i>L. grippotyphosa</i> Ž 6
5.	<i>L. sejroe</i> M 84
6.	<i>L. istrica</i> J 20
7.	<i>L. bratislava</i> Jež Bratislava
8.	<i>L. pomona</i> Šimon
9.	<i>L. polonica</i> Poland
10.	<i>L. Sorex</i> – Jalná
11.	<i>L. canicola</i> S 392

Po inkubaci mikrotitrační destičky je proveden odečet výsledku reakce. Pomocí poloautomatické osmikanálové mikrotitrační pipety se špičkami jsou napipetovány kapky sér s příslušným antigenním kmenem na sterilní podložní sklíčko. Odečítá se pomocí mikroskopie v zástinu při zvětšení cca 20 x 10 až 40 x 10. Za pozitivní výsledek reakce je považována mikroaglutinace nebo lýza více než 30% živých leptospir popřípadě kombinaci obou reakcí.

Vyšetřovaná krevní séra, která byla pozitivní v základním ředění v titru 1:100, jsou vyšetřována dále se všemi pozitivními sérotypy do konečného titru, popř. i s dalšími sérotypy téže sérologické skupiny. Provádí se u nich vyšetření tzv. dlouhé řady (titrace). Nejprve je připraveno nové ředění vyšetřovaného pozitivního séra v poměru 1:50 a to je následně ředěno v plastickém panelu geometrickou řadou pomocí PBS (0,5 ml ředěného séra + 0,5 ml PBS).

Stejná ředění séra jsou dávkována do svislých řad mikrotitrační destičky a jednotlivé vyšetřované antigeny do vodorovných řad. Do první svislé řady mikrotitrační destičky se pipetuje 50  $\mu$ l PBS, tato řada pak představuje kontrolu kmene. Poté se opět destička nechá inkubovat za stejných podmínek jako u screeningového vyšetření.

Po inkubaci je opět provedeno hodnocení reakcí. Pokud nejsou leptospiry vůbec aglutinovány, reakce je negativní. Séra pozitivní do vysokých řadění mohou být někdy v základním ředění 1:100 bez aglutinace nebo lýzy, které se mohou objevit až v ředěních vyšších (např. od 1:400). V případě této tzv. negativní zóny (prozóny), zjistí obvykle zkušený pracovník imobilizací leptospir v nejnižších ředěních, v nichž aglutinace a lýza chybí. Podle intenzity se reakce hodnotí od + až do +++. Reakce, v které je naprostá většina leptospir aglutinovaných, a popřípadě i lyzovaných, je hodnocena na +++. Tam, kde je přibližně asi polovina leptospir aglutinovaných a polovina volných je hodnocena na ++ a kde je jen malé množství aglutinací je posuzována: +. Za pozitivní je považována aglutinace na ++ a +++. Za konečný titr se označuje to ředění séra, ve kterém je reakce na ++ či na +++.

Pro záznamy o provedených vyšetřeních a jejich výsledcích jsou vedeny laboratorní knihy pro screeningová vyšetření krevních sér na protilátky proti patogenním leptospirám a pro vyšetření tzv. "dlouhé řady".

### 3.2.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metoda průkazu deoxyribonukleové kyseliny (DNA) patogenních leptospir („home made“) byla vypracována a zavedena do rutinního provozu ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové v roce 2002 ve společné laboratoři molekulárně biologických metod Ústavu klinické mikrobiologie a Ústavu klinické biochemie. Detekce DNA je v této laboratoři prováděna s dosud nejvyšší dosažitelnou citlivostí (validace na 10 leptospir v 1 ml materiálu). Metoda prokazuje všechny v ČR diagnostikované sérovary patogenních leptospir a nedává pozitivní výsledek s leptospirami nepatogenními.

Nejlepším časovým intervalem pro odběr biologických materiálů je období bakteriémie, které nastává 3 až 8 dní po proniknutí leptospir do organismu hostitele (výskyt leptospir v plazmě, poté v moči a likvoru). Pro přímý průkaz leptospir je důležité (pokud lze tuto podmínku dodržet) odebírat všechny typy vzorků před zahájením terapie antibiotiky nebo alespoň co nejdříve po jejím započetí. Biologickým materiálem vhodným pro průkaz DNA leptospir pomocí vyšetření PCR je moč, plazma, likvor a bronchoalveolární laváž (BAL). Na počátku onemocnění je odebírána krev (5 – 10 ml) do zkumavky

s protisrážlivým prostředkem (citrát sodný nebo etylendiamintetraoctová kyselina – EDTA). Heparin se nepoužívá, protože inhibuje PCR reakce. Odběr likvoru se provádí při příznacích postižení mozkových plen (1 – 2 ml). Moč je odebírána po ústupu první akutní fáze v období předpokládaného vylučování leptospir, tj. ke konci prvního týdne onemocnění (předpokládané osídlení ledvin). Vzorek tvoří 15 ml i více čerstvé moči.

Odebraný klinický materiál se před doručením do laboratoře na vyšetření PCR reakcí uchovává při teplotě cca 5 °C. Materiál nesmí zmrznout. Transport materiálu do laboratoře se provádí je-li to možné do 24 hodin, nejdéle však do 48 hodin po odběru. V případech, kdy vzorky nelze doručit v požadované lhůtě do laboratoře, je možné vzorek zajistit. Moč se zajistí centrifugováním 10 – 15 ml vzorku při 2500 otáček za minutu po dobu 15 minut. Supernatant se odsaje a vzniklý sediment je resuspendován v 0,5 – 1 ml fyziologického roztoku a zamrazen při – 20 °C. Takto upravený vzorek lze do laboratoře odeslat obvyklým způsobem. Odebrané vzorky plazmy či likvoru o objemu 1 – 2 ml je možné vložit do chladničky a poté odeslat do laboratoře.

Nejprve je provedena izolace DNA leptospir z daného vzorku materiálu komerčním kitem QIA amp DNA Mini Kit (250) firmy QIAGEN za použití „tkáňového protokolu“. Amplifikace se poté provádí paralelně z každého vzorku dvěma dvojicemi primerů G1, G2 (detekují DNA genetických druhů *L. interrogans* a *L. borgpetersenii*) a B 64-I, B 64-II (detekují DNA druhu *L. kirschneri*). Do každé reakce jsou vkládány následující kontroly:

- 1) vnitřní inhibiční kontrola (prevence falešně negativního výsledku)
- 2) kontrola analytické citlivosti metody (DNA ze  $10^1$  patogenních leptospir)
- 3) pozitivní kontrola (DNA přibližně  $2 \times 10^2$  leptospir)
- 4) negativní kontrola (prevence falešně pozitivního výsledku)

Produkty amplifikace jsou zviditelňovány na 3% agarovém gelu obarveném ethidium bromidem pomocí elektroforézy a následně se fotograficky zdokumentují.

### 3.3. Dotazníková metoda

Informace pro tuto studii jsme získali pomocí dotazníkové metody. V první fázi jsme se zaměřili na vyhledávání pacientů v laboratorních knihách, které jsou vedeny na pracovišti pro zaznamenávání výsledků testovaných sér pacientů. Séra jsou testována nejdříve screeningovým vyšetřením na protilátky proti patogenním leptospirám a poté pomocí tzv. dlouhé řady (titrace) v parazitologické laboratoři v Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Spádovou oblast pro testování pacientů metodou MAL v této laboratoři tvoří kraj Královehradecký a Pardubický a částečně také kraj Vysočina. Při tomto zpětném dohledávání jsme se zaměřili na pozitivní výsledky tohoto vyšetření u pacientů testovaných v letech 1999 až 2005. Za pozitivní jsme považovali titry 1:200 a vyšší získané metodou dlouhé řady (titrací).

Následně jsme vypracovali dotazník, kontaktovali ošetřující lékaře vyhledaných pacientů a požádali je o spolupráci a vyplnění dotazníků.

Dotazník byl zaměřen na získání důležitých informací o pacientech vztahující se k jejich onemocnění leptospirózou, především na zjištění epidemiologických dat a na klinické a laboratorní ukazatele vyskytující se u pacientů. První část dotazníku se týkala epidemiologických aspektů, které mají souvislost s vyšším rizikem infekce leptospirózy. Mezi tato rizika patří například pobyt v přírodě, práce v zemědělství, kontakt s hlodavci či jinými zvířaty aj. Další částí dotazníku bylo zhodnocení klinických příznaků u pacientů a uvedení určitých laboratorních ukazatelů. U klinických příznaků, které byly v dotazníku jednotlivě vypsány, stačilo pouze poznamenat, zda se u daného pacienta projevíly či neprojevíly (ANO/NE). Bylo samozřejmě možné přesněji specifikovat tyto nebo další příznaky. Závěr dotazníku byl vyhrazen pro vypsání antibiotik či jiných léků, kterými byl pacient léčen.

Celkem jsme rozeslali různým lékařům přibližně 80 dotazníků pro zjištění údajů u 72 pacientů (někteří pacienti byli ošetřováni u více lékařů).

<b>Dotazník – leptospiróza</b>	
<b>Oddělení:</b>	
Pacient: Příjmení:	RČ:
Jméno:	Povolání:
<b>Pobyty v přírodě: ANO NE</b>	
Jak dlouho před prvními příznaky:	Koupání v přírodě:
Kontakt s hlodavci:	Práce při čištění sklepa, kanalizace:
Práce v zemědělství:	Práce na zahrádce:
Kontakt s jinými zvířaty:	Jiná:
<b>Průběh onemocnění:</b>	
Dvoufázový průběh: ANO NE	Hospitalizace v nemocnici:
horečka - naměřená teplota v počátku onemocnění:	
dlouhodobě zvýšené teploty:	
kašel:	bolesti hlavy:
pneumonie:	bolest kloubů:
dyspnoe:	myalgie:
hepatální příznaky:	krvácivost:
oligurie:	překrvení spojivek:
renální příznaky:	srdeční arytmie:
hepatorenální selhávání:	vyrážka:
meningeální příznaky:	uveitis:
ikterus:	zhoršení zraku:
poruchy vědomí:	* krátkodobé (během onemocnění)
alterace mentálního stavu:	* dlouhodobé (po onemocnění)
<b>JINÉ příznaky:</b>	
leukocyty: počet:	diferenciál:
bilirubin: celkový:	přímý:
kreatinin:	
jiné biochemické markery:	
<b>Další vyšetření:</b>	
Léčba antibiotiky - jakými, jak dlouho:	

Zpět se nám vrátilo 33 vyplněných dotazníků s informacemi o jednotlivých pacientech. Tyto informace jsme poté následně zpracovávali podle jednotlivých kategorií. Na počátku jsme rozdělili pacienty na 2 skupiny – pozitivní pacienti, u kterých byla prokázána diagnóza leptospirózy a pacienti negativní, u kterých byla prokázána jiná diagnóza než leptospiróza. Poté jsme se soustředili na skupinu pozitivních pacientů. Zaměřili jsme se nejprve na demografické (rozdělení podle pohlaví, věku) a epidemiologické údaje (hospitalizace, doba hospitalizace, pobyt v přírodě, kontakt s hlodavci aj.). Následně jsme vyhodnotili klinické příznaky, které se u jednotlivých pacientů vyskytovaly.

Získané hodnoty jednotlivých laboratorních markerů jsme posuzovali vždy specificky podle věku a pohlaví daného pacienta, protože laboratorní hodnoty mají většinou různá normální rozmezí právě v závislosti na věku a pohlaví jedince. Sestavili jsme tabulku s normálními laboratorními hodnotami běžně zaznamenaných ukazatelů (tabulka č. 4) a také tabulku s normálními hodnotami diferenciálního rozpočtu leukocytů (tabulka č. 5). Následně jsme pak zařazovali jednotlivé pacienty, u kterých se hodnoty nepohybovaly v tomto povoleném rozmezí.

Všechny získané informace jsme zpracovali do přehledných tabulek či grafů. U některých pacientů nebyly informace zcela úplné, a tak jsme zpracovali pouze uvedené údaje. Většina ze 33 dotazníků se ale vrátila pečlivě vyplněná.

**Tab.č. 4.** Tabulka normálních hodnot vybraných laboratorních ukazatelů  
(zdroj Ústav klinické biochemie a diagnostiky VFN a 1.LF UK)

Laboratorní ukazatel	Věkové rozmezí	Normální hodnoty
<b>UREA (MOČOVINA) mmol/l</b>	0 – 6 týdnů	1,7 – 5,0
	6 týdnů a 1 rok	1,4 – 5,4
	1 – 15 let	1,8 – 6,7
	Muži: 15 – 110 let	2,8 – 8,0
	Ženy: 15 – 110 let	2,0 – 6,7
<b>KREATININ μmol/l</b>	0 – 6 týdnů	12,0 – 48,0
	6 týdnů a 1 rok	21,0 – 55,0
	1 – 15 let	27,0 – 88,0
	Muži: 15 – 110 let	44,0 – 110,0
	Ženy: 15 – 110 let	44,0 – 104,0
<b>BILIRUBIN CELKOVÝ μmol/l</b>	0 – 1 den	0,0 – 38,0
	1 – 2 dny	0,0 – 85,0
	2 – 4 dny	0,0 – 171,0
	3 týdny – 1 rok	0,0 – 29,0
	1 – 110 let	2,0 – 17,0
<b>BILIRUBIN KONJUGOVANÝ μmol/l</b>	10 – 110 let	0,0 – 5,1
<b>ALT (alaninaminotransferáza) μkat/l</b>	0 – 6 týdnů	0,05 – 0,73
	6 týdnů – 1 rok	0,05 – 0,85
	1 – 15 let	0,05 – 0,6
	15 – 110 let	0,1 – 0,78
<b>AST (aspartátaminotransferáza) μkat/l</b>	0 – 6 týdnů	0,38 – 1,21
	6 týdnů – 1 rok	0,27 – 0,97
	1 – 15 let	0,10 – 0,63
	15 – 110 let	0,05 – 0,72

<b>ALP</b> (alkalická fosfatáza) $\mu\text{kat/l}$	0 – 6 týdnů	1,2 – 6,3
	6 týdnů – 1 rok	1,4 – 8,0
	1 – 10 let	1,12 – 6,2
	10 – 15 let	1,35 – 7,5
	15 – 110 let	0,66 – 2,2
<b>GMT</b> ( $\gamma$ -glutamyltransferáza) $\mu\text{kat/l}$	0 – 6 týdnů	0,37 – 3,0
	6 týdnů – 1 rok	0,1 – 1,04
	1 – 15 let	0,1 – 0,39
	Muži: 15 – 110 let	0,14 – 0,84
	Ženy: 15 – 110 let	0,14 – 0,68
<b>CRP</b> (C – reaktivní protein) $\text{mg/l}$	0 – 110 let	0,0 – 10,0
<b>LEUKOCYTY</b> $10^9/l$	18 – 20 týdnů	3,37 – 5,03
	23 – 25 týdnů	3,26 – 4,64
	26 – 30 týdnů	3,59 – 5,29
	1 – 3 let	6,0 – 17,5
	4 – 7 let	5,5 – 15,5
	8 – 13 let	4,5 – 13,5
	Dospělí	4,5 – 11,0

Tab. č. 5. Referenční rozmezí diferenciálního rozpočtu leukocytů

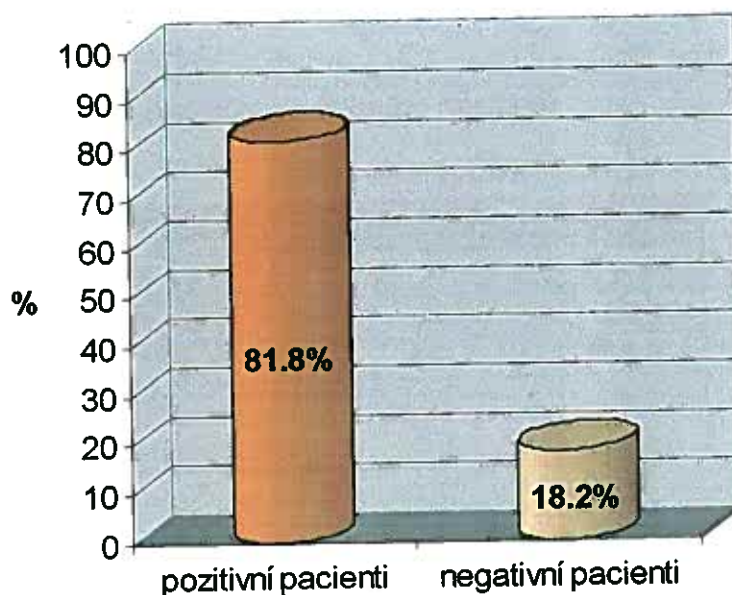
typy leukocytů	věkové rozmezí	normální hodnoty (%)
neutrofilní tyče	do 1 roku	0 - 3
	1 - 16 let	1 - 3
	nad 16 let	1 - 2
neutrofilní segmenty	do 4 let	22 - 34
	5 - 6 let	32 - 46
	7 - 12 let	40 - 56
	13 - 16 let	45 - 58
	nad 16 let	48 - 70
eosinofily	0 - 10 let	1 - 5
	nad 10 let	1 - 6
bazofily	0 - 100 let	0 - 2
lymfocyty	do 1 roku	50 - 72
	1 - 4 roky	42 - 57
	5 - 12 let	30 - 44
	13 - 16 let	27 - 41
	nad 16 let	23 - 45
monocyty	do 10 let	1 - 9
	nad 10 let	2 - 8

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Demografické a epidemiologické aspekty

Celkem jsme v této studii získali a zpracovávali informace o 33 pacientech. Z tohoto počtu nebyla u 6 pacientů (18,2 %) potvrzena diagnóza leptospirózy, ale diagnóza jiná. Tuto skupinku pacientů jsme považovali za negativní. U těchto pacientů byly stanoveny různé diagnózy jako například nemoc jater, febrilní stav nejasné etiologie, gastroenteritis se zvracením a průjmy, impetigo, abscesy jater či chronická hepatitida typu B. U zbývajících 27 pacientů (81,8 %) byla prokázána diagnóza leptospirózy laboratorně i klinicky, pacienty jsme proto považovali za pozitivní případy tohoto onemocnění. U 10 pacientů byla prokázána infekce sérovary *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava a *L. copenhageni* Lebe, původci nejzávažnější formy leptospirózy člověka (Weilovy nemoci).

**Graf č. 1.** Rozdělení pacientů dle pozitivivity na leptospirózu



V následující tabulce č. 6 je patrné zastoupení mužů a žen mezi skupinami pozitivních a negativních pacientů. Celkový počet 27 pozitivních pacientů se skládal z převážné většiny z mužů, kterých bylo 22 (81,5 %) a z 5 žen.



(18,5 %). Mezi negativními pacienty bylo rozložení rovnoměrné - 3 muži (50 %) a 3 ženy (50%).

**Tab. č. 6.** Rozdělení pozitivních a negativních pacientů podle pohlaví

pohlaví	počet pozitivních pacientů	%	počet negativních pacientů	%
muž	22	81,5	3	50
žena	5	18,5	3	50
celkem	27	100	6	100

Průměrný věk pozitivních pacientů byl 31 let. Věkové rozmezí se pohybovalo od 12 let (nejmladší pacient v době onemocnění) až do 62 let, což byl věk nejstaršího zaznamenaného pozitivního pacienta v této studii. Věkové rozložení pacientů s počty a procenty případů v jednotlivých věkových kategoriích je uvedeno v tabulce č. 7. Nejvíce jsme zaznamenali pacientů ve věkové kategorii 21 až 45 let (15 pacientů; 55,6 %) a nejméně v kategorii 61 let a více (1 pacient; 3,7%).

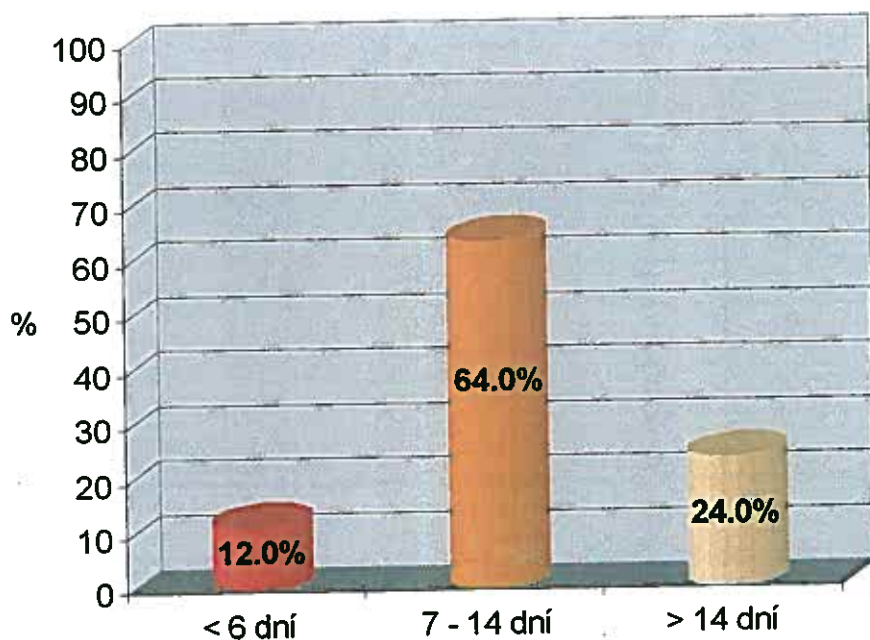
**Tab. č. 7.** Věková charakteristika pozitivních pacientů

věkové rozmezí	počet pacientů	%
< 13 let	2	7,4
13 - 20 let	4	14,8
21 - 45 let	15	55,6
46 - 60 let	5	18,5
61 let a více	1	3,7

Převážná většina, celkem 25 pozitivních pacientů, byla v průběhu onemocnění hospitalizována v nemocnici a průměrná doba hospitalizace byla 13,6 dní. V grafu č. 2 je patrné rozdělení pacientů podle doby hospitalizace v nemocnici, nejvíce pacientů (16 pacientů; 64 %) strávilo v nemocnici 7 až 14 dní, 6 pacientů (24 %) bylo hospitalizováno více než 14 dní a 3 pacienti

(12 %) pouze méně jak 6 dní. Skupinu nejdéle hospitalizovaných jedinců (více než 14 dní) tvořili pouze muži a jejich věkové rozmezí se pohybovalo od 17 do 52 let (věkový průměr této skupiny byl 33 let).

**Graf č. 2.** Délka (ve dnech) hospitalizace pacientů



Nejčastějšími udávanými epidemiologickými daty souvisejícími s vyšším rizikem expozice leptospirózy u této skupiny pacientů byl pobyt v přírodě, který byl zaznamenán u 17 pacientů (63,0 %), dále kontakt s hlodavci u 10 pacientů (37,0 %) a rovněž kontakt s jinými zvířaty u 9 pacientů (33,3 %). Při kontaktu s jinými zvířaty se většinou jednalo o kontakt s domácími mazlíčky (psi, kočky) či s užitkově chovaným zvířectvem (králíci, slepice, ovce, krávy). Za rizikovou činnost při pobytu v přírodě můžeme považovat vodáctví, protože u 4 mladých mužů z této skupiny pacientů se nemoc projevila po absolvování vodáckého soustředění a u jednoho muže po sjíždění řeky Radbuzy. S tímto úzce souvisí i další riziko expozice patogenním leptospirám, a to je koupání v přírodě, které bylo zaznamenáno u 8 pacientů (29,6%). Přírodní vodní zdroje totiž mohou být kontaminovány močí infikovaných zvířat nebo jiným způsobem.

Mezi další popsaná epidemiologická rizika můžeme zařadit práci v zemědělství (7 pacientů; 25,9 %) a práci na zahrádce (5 pacientů; 18,5 %). Dále můžeme jako možné riziko uvést práci v jiném rizikovém prostředí, která

byla uvedena u 3 pozitivních pacientů (11,1 %). Za práci v rizikovém prostředí jsme považovali např. úklid v drůbežárně, stavění zdi v potoce či vyklízení staré chalupy. V následující tabulce č. 8 jsou shrnuty jednotlivé epidemiologické aspekty.

**Tab. č. 8.** Zaznamenané epidemiologické ukazatele

epidemiologické ukazatele	počet	%
hospitalizace v nemocnici	25	92,6
pobyt v přírodě	17	63,0
koupání v přírodě	8	29,6
práce v zemědělství	7	25,9
práce na zahrádce	5	18,5
práce v jiném rizikovém prostředí	3	11,1
kontakt s hlodavci	10	37,0
kontakt se zvířaty	9	33,3

U některých pacientů se často vyskytovalo několik epidemiologických rizik najednou. Jako nejčastější kombinaci můžeme uvést pobyt v přírodě spojený s koupáním v přírodě a kontakt s hlodavci, která se byla popsána celkem u 7 pacientů (26 %). Dále byla u 5 pacientů (18,5 %) zaznamenána kombinace práce v zemědělství a kontakt se zvířaty a u 2 pacientů (7,4 %) pak spojení práce na zahrádce a kontakt se zvířaty. Kombinace jsou uvedeny v tabulce č. 9.

**Tab. č. 9.** Kombinace epidemiologických rizik u pacientů

typ kombinace	počet pacientů	%
pobyt v přírodě + koupání v přírodě + kontakt s hlodavci	7	26,0
práce v zemědělství + kontakt se zvířaty	5	18,5
práce na zahrádce + kontakt se zvířaty	2	7,4
pobyt v přírodě + kontakt se zvířaty + kontakt s hlodavci	2	7,4

## 4.2. Klinické příznaky

Horečka se vyskytovala u většiny pacientů, projevila se u 25 pacientů (92,6 %). Dalšími často zaznamenanými projevy u této skupiny pozitivních pacientů byly: bolest hlavy (18 pacientů; 66,7 %), hepatální příznaky (18 pacientů; 66,7 %). Dlouhodobě přítomné zvýšené teploty, bolest svalů, bolest kloubů a nauzea a zvracení se shodně vyskytovaly u 13 pacientů (48,1 %). Mezi další manifestované příznaky lze řadit alterace mentálního stavu, respirační symptomy, kašel, třesavka a zimnice, renální a meningeální příznaky aj. Pouze u 3 pacientů byly popsány srdeční symptomy jako je přechodná sinusová bradykardie, lehká bradykardie a trikuspidální insuficience či dilatace komor s insuficiencí cípových chlopní. Všechny klinické symptomy a projevy jsou uvedeny v tabulce č. 10.

**Tab. č. 10.** Souhrn vyskytujících se klinických příznaků u pacientů

příznaky	počet	%
horečka	25	92,6
dlouhodobě zvýšené teploty	13	48,1
bolest hlavy	18	66,7
bolest svalů	13	48,1
bolest kloubů	13	48,1
třesavka, zimnice	7	25,9
nauzea, zvracení	13	48,1
respirační symptomy	8	29,6
kašel	7	25,9
hepatální příznaky	18	66,7
ikterus	3	11,1
renální příznaky	9	33,3
oligurie	2	7,4
hepatorenální selhávání	4	14,8
alterace mentálního stavu	10	37,0
poruchy vědomí	6	22,2
meningeální příznaky	8	29,6
srdeční symptomy	3	11,1
vyrážka	2	7,4
překrvení spojivek	2	7,4
uveitida a jiné oční komplikace	2	7,4
krvácivost	4	14,8
hepatosplenomegálie	4	14,8

U většiny pacientů se samozřejmě vyskytovalo několik ze zmíněných klinických příznaků najednou, proto jsme se pokusili vymezit některé častější kombinace těchto příznaků. Velice často se projevovaly u pacientů hepatální příznaky společně s nauzeou a zvracením (12 pacientů, tj. 44,4 %). Horečka spojená s bolestí svalů a kloubů byla u 11 pacientů (40,7 %). U všech pacientů (9 pacientů, tj. 33,3 %), u kterých se vyskytovaly renální příznaky byly současně uvedeny i hepatální příznaky. U 6 pacientů (22,2 %) byla zaznamenána kombinace horečky, bolesti hlavy a kašle. Některé z vyskytujících se kombinací klinických projevů jsou shrnuty v tabulce č. 11.

**Tab. č. 11.** Kombinace klinických příznaků u pacientů

typ kombinace	počet pacientů	%
hepatální příznaky + nauzea, zvracení	12	44,4
teplota + bolest svalů + bolest kloubů	11	40,7
renální příznaky + hepatální příznaky	9	33,3
alterace mentálního stavu + meningeální příznaky + dlouhodobě zvýšená teplota	7	25,9
dlouhodobě zvýšená teplota + hepatální příznaky	7	25,9
teplota + bolest hlavy + kašel	6	22,2

U pacientů s hepatálními příznaky (18 pacientů) byly společně zaznamenány některé laboratorní ukazatele. Především u většiny těchto pacientů byly zvýšené hodnoty aminotransferáz (ALT, AST), a to shodně u 12 pacientů (66,7 %) a dalších enzymů (GMT, ALP). Hladiny C – reaktivního proteinu a kreatininu byly zvýšené u 9 pacientů s hepatálními příznaky (50 %). U 6 pacientů s těmito příznaky byl zvýšený celkový bilirubin, u 3 pacientů bilirubin přímý a u 7 pacientů byl zaznamenán zvýšený počet leukocytů.

Celkem u 8 pacientů z 9 (88,9 %), u kterých byly popsány renální příznaky, byla naměřena zvýšená plazmatická koncentrace kreatininu, což je důsledek

poškození normální funkce ledvin. Dále se téměř u všech těchto pacientů vyskytovala zvýšená aktivita enzymů ALT, AST, ALP a GMT.

#### 4.3. Laboratorní ukazatele

Všechny sledované laboratorní parametry jsme vyhodnocovali u každého pacienta zvlášť, podle sestavených tabulek (tabulky č. 4 a č. 5 jsou uvedeny v části 3. Materiál a metody) obsahující přehled normálních fyziologických hodnot jednotlivých parametrů. Nejobvyklejším laboratorním projevem u této skupiny pacientů byla zvýšená aktivita enzymu ALT (alaninaminotransferáza), která se vyskytovala u 18 pacientů (66,7 %) a zvýšená aktivita enzymu AST (aspartátaminotransferáza), což bylo zaznamenáno u 17 pacientů (63,0 %). Zvýšená koncentrace C – reaktivního proteinu byla u 17 pacientů (63,0 %) a u 14 pacientů (51,9 %) byla zvýšená koncentrace kreatininu. Častými laboratorními příznaky byly dále zvýšený počet leukocytů, zvýšená koncentrace močoviny, celkového bilirubinu a zvýšená aktivita ALP (alkalická fosfatáza) a GMT ( $\gamma$  - glutamyltransferáza).

U 23 pacientů (85,2 %) se vyskytovaly určité abnormality v diferenciálním rozpočtu leukocytů. Nejčastěji se objevoval zvýšený počet neutrofilních tyčů a snížený počet lymfocytů (oba příznaky u 18 pacientů, tj. 66,7 %). U některých pacientů byl zaznamenán snížený nebo zvýšený počet neutrofilních segmentů (12 pacientů, tj. 44,4 %). Pouze u 5 pacientů (18,5 %) byl zvýšený počet monocytů. Sledované laboratorní parametry jsou všechny shrnuty v tabulce č. 12.

Pouze u 4 pacientů (14,8 %) bylo v záznamech uvedeno provedené rentgenové vyšetření hrudníku, při kterém byly zjištěny určité abnormality. Na rentgenových snímcích pacientů bylo zjištěno pomocí tohoto vyšetření například disperzní skvrnitě zastínění levé plíce, rozsáhlá infiltrace obou plicních křídel či počínající bronchopneumonie bazálně vlevo.

Tab. č. 12. Laboratorní hodnoty pacientů s leptospirozou

sledované parametry	počet pacientů	%
zvýšené leukocyty	11	40,7
zvýšená urea	8	29,6
zvýšený kreatinin	14	51,9
zvýšený celkový bilirubin	9	33,3
zvýšený přímý bilirubin	5	18,5
zvýšený CRP	17	63,0
zvýšená ALT	18	66,7
zvýšená AST	17	63,0
zvýšená ALP	10	37,0
zvýšená GMT	11	40,7
abnormality v diferenciálním rozpočtu leukocytů	23	85,2

Laboratorní diagnostika leptospirózy byla u všech pacientů prováděna pomocí metody MAL (screeningové vyšetření a titrace). U všech 27 pacientů byl výsledek testování pozitivní, u jednotlivých pacientů byly diagnostikovány různé sérotypy *Leptospira spp.* (u některých pacientů i více sérotypů). Nejčastějšími prokázanými sérotypy byly *L. grippotyphosa* P 125 a *L. grippotyphosa* Ž 6, které se vyskytovaly u 13 pacientů (48,1 %), dále *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava a *L. copenhageni* Lebe, které se vyskytovaly u 10 pacientů (37,0 %). Tabulka č. 13 uvádí shrnutí jednotlivých sérotypů stanovených metodou MAL. Někteří pacienti reagovali pozitivně v této reakci současně s více kmeny leptospir. Počet pozitivních pacientů proto neodpovídá počtu pozitivních reakcí s jednotlivými kmeny. *L. polonica* Poland, *L. sorex-jalná*, *L. canicola* S 392 nebyly diagnostikovány u žádného z pacientů studované skupiny.

Tab. č. 13. Diagnostikované sérotypy leptospir u pacientů

sérotyp	počet	%
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> Fryšava	10	37,0
<i>L. copenhageni</i> Lebe	10	37,0
<i>L. grippotyphosa</i> P 125	13	48,1
<i>L. grippotyphosa</i> Ž 6	13	48,1
<i>L. sejroe</i> M 84	5	18,5

<i>L. istrice</i> J 20	8	29,6
<i>L. bratislava</i> Jež Bratislava	1	3,7
<i>L. pomona</i> Šimon	1	3,7

Nejčastěji byly jako nejvyšší stanoveny u jednotlivých pacientů titry 1:800 (u 6 pacientů tj. 22,2 %) a 1:1 600 (u 5 pacientů tj. 18,6 %). Tabulka č. 14 uvádí přehled nejvyšších diagnostikovaných titrů u pacientů. Celkem bylo u všech 27 pacientů provedeno 66 vyšetření pomocí metody MAL (titrace), což odpovídá v průměru 2,4 vyšetření na 1 pacienta. Největší počet vyšetření u jednoho pacienta bylo 7 a u 13 pacientů byla prováděna metoda dlouhé řady pouze jednou.

**Tab. č. 14.** Nejvyšší stanové hladiny titrů protilátek

hladina titru	počet	%
1 : 200	3	11,1
1 : 400	4	14,8
1 : 800	6	22,2
1 : 1 600	5	18,6
1 : 3 200	4	14,8
1 : 6 400	4	14,8
1 : 12 800	1	3,7

#### 4.4. Léčba

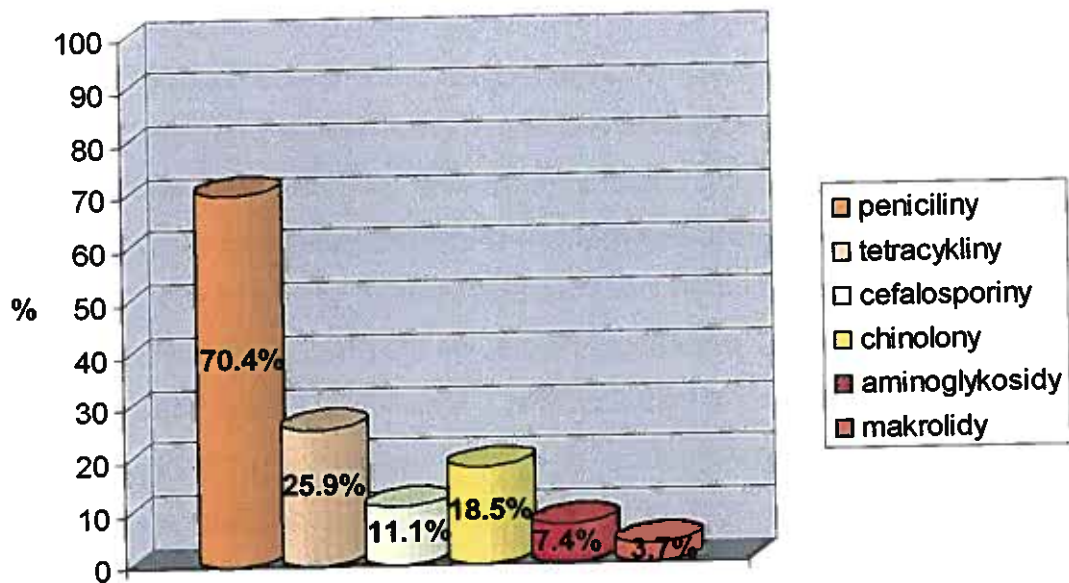
Z celkového počtu bylo 19 pacientů (70,4 %) léčeno antibiotiky penicilínové skupiny (Prokainpenicilin, Augmentin, Pendepon, Amoksiklav, Ampicilin aj.), 7 pacientů (25,9 %) tetracyklinovými antibiotiky (Doxycyklin, Deoxymykoin, Doxyhexal, Doxybene), 5 pacientů (18,5 %) užívalo chinolony (Ciprinol, Ciprofloxacín, Ciphin), 3 pacienti cefalosporiny (Ceftriaxon, Cefuroxín, Lendacin), 2 pacienti (7,4 %) aminoglykosidy (Gentamicin, Streptomycin) a pouze 1 pacient (3,7 %) byl léčen makrolidovými antibiotiky. Přehled nejčastěji užívaných skupin antibiotik je znázorněn v grafu č. 3.

Mezi nejvíce užívané jednotlivé přípravky patřil Prokain penicilin a Augmentin (oba u 7 pacientů), Pendepon (5 pacientů), Penicilin (4 pacienti) a Deoxymykoin



(3 pacienti). Ostatní přípravky byly podávány u 2 pacientů nebo pouze 1 pacientovi.

**Graf č. 3.** Rozdělení užívaných skupin antibiotik



## 5. DISKUZE

Leptospiróza je typická zoonóza (nákaza přenosná ze zvířat na člověka) s přírodní ohniskovostí, jejíž výskyt je v klimatických podmínkách České republiky sporadický a specifická nemocnost se pohybuje kolem 0,3 případu na 100 000 obyvatel (v roce 1963 to bylo ještě 1,8/ 100 000). V roce 1997 zaznamenali u nás epidemiologové zvýšení počtu sérologicky diagnostikovaných a hlášených onemocnění oproti roku 1996 (před povodněmi) na trojnásobek (0,9/ 100 000). Dvě třetiny případů onemocnění z našeho území se vyskytovaly v zaplavených oblastech Moravy a Slezska. V roce 1998 došlo u nás k dalšímu výraznému zvýšení počtu onemocnění leptospirózou, a to pětinasobnému oproti normální epidemiologické situaci, to je 1,6/ 100 000 obyvatel. V uplynulých letech se v důsledku klimatických změn stále častěji setkáváme s řadou lokálních povodní, a to i v různých obdobích roku a na různě velkém území naší republiky. Riziko leptospirózy je tak u nás stále aktuální (46).

Záměrem této studie bylo pokusit se určit u dané skupiny pacientů s leptospirózou výskyt nejčastějších epidemiologických rizik a laboratorních a klinických příznaků. Klinické příznaky a základní laboratorní parametry jsou většinou nespecifické, proto je pro lékaře důležitá při stanovení diagnózy i epidemiologická a pracovní anamnéza postiženého člověka (46). Pro určení definitivní diagnózy je následně potřebná izolace leptospir nebo potvrzení přítomnosti DNA patogenních leptospir metodou PCR. Protože výsledky kultivace trvají 4 týdny a více, jsou pro laboratorní diagnostiku leptospirózy preferovány sérologické metody a metoda PCR (12).

Leptospiróza je zaznamenávána převážně u dospělých mužů. Většina prevalenčních typů studií potvrzuje tento fenomén, že muži ve věkovém rozmezí 20 až 40 let jsou postiženi tímto onemocněním mnohem více než ženy (24). Ve studii provedené v Turecku bylo ve skupině pacientů více než 80 % mužů a věkový průměr se pohyboval kolem 47 let (12), v další tvořili muži téměř 88 % ze všech sledovaných pacientů (11). Rovněž ve studii provedené v Brazílii bylo téměř 80 % pacientů mužského pohlaví (průměrný věk byl 36 let) (23). V našem případě také převládala mužská populace pacientů (81,5 %) nad ženskou a průměrný věk pozitivních pacientů byl 31 let.

Vyšší poměr mužů k ženám se obvykle vztahuje k určitým zaměstnáním a činnostem, které většinou vykonávají pouze muži a k rizikovým faktorům chování (24). Větší výskyt u mužů souvisí nejspíš s jejich častějším pobytem v přírodě (aktivity ve volném čase, zaměstnání aj.), kde mohou snáze přijít do kontaktu s původci tohoto onemocnění, neboť leptospiry mohou být přítomny v kontaminované vodě, půdě či jinde.

Studie provedená ve Francii hodnotí epidemiologické aspekty leptospirózy v rozvinutých zemích, kde bývá onemocnění stále více spojováno s aktivitami provozovanými ve volném čase než při činnostech v zaměstnání. Oděrky na kůži, kanoistika, kontakt s hlodavci a bydliště na venkově byly popsány jako nezávislé rizikové faktory spojené s leptospirózou. Riziko onemocnění spojené s kanoistikou zde bylo vysoké, především kvůli delší expoziční periodě (kanoisté tráví dlouhou dobu ve vodě nebo blízko vody) a kvůli vyššímu riziku přenosu spojeného s poraněním kůže nebo s náhodným polknutím kontaminované vody (31). Významným epidemiologickým faktorem je, že vodu uvádí v anamnéze téměř 40 % ze všech hlášených pacientů, a to především během koupání, sportování, práci ve vodě, kanalizaci a podobně (46).

V naší studii jsme zaznamenali jako nejvíce rizikové epidemiologické faktory rovněž především činnosti spojené s volným časem. Jednalo se hlavně o různé formy pobytu v přírodě (vodácké soustředění, stanování, pobyt na chalupě aj.), dále kontakt s hlodavci a jinými zvířaty či koupání v přírodních vodních zdrojích. Pobyt v přírodě spojený s koupáním a kontakt s hlodavci byl shodně uveden u několika pacientů, kteří se zúčastnili vodáckého soustředění na umělém kanále v České Vrbné, kde bylo zaznamenáno přemnožení hlodavců. Po absolvování soustředění se u těchto jedinců projevilo horečnaté onemocnění, které bylo později diagnostikováno jako leptospiróza. Kontakt s vodou a hlodavci byl rovněž popsán u pacienta, který stavěl zeď v potoce, ve kterém se vyskytovali potkani. Zmiňovaný muž se při této činnosti poranil na noze o hřebík, což ještě zvýšilo riziko onemocnění.

S aktivitami ve volném čase a s plaváním v přírodě či s kontaktem s vodou v přírodě souvisí i několik dalších studií. V jedné studii se zaměřili na propuknutí leptospirózy mezi atlety a trvale žijícími obyvateli po triatlonu konajícím se ve Springfieldu (Illinois). Triatlonu předcházely silné deště, které pravděpodobně zvýšily kontaminaci jezera Springfield patogenními leptospirami. Mezi atlety

bylo hlavním rizikovým faktorem onemocnění leptospirózou pozření jezerní vody při plavání pobyt v ní (30). U atletů účastnících se soutěže Eco-Challenge 2000 na Borneu, u kterých se po absolvování této akce projevila leptospiróza, byly za pravděpodobné rizikové faktory rozvoje onemocnění označeny plavání v řece Segama, polknutí této říční vody či jízda na kajaku a kontakt pokožky s vodou (38).

Dále byly popsány velké epidemie leptospirózy v Latinské Americe a v Karibské oblasti po hurikánech, tropických bouřích a záplavách (30). Epidemie onemocnění v Nikaragui v roce 1995 byla dalším názorným příkladem, jak jsou rozsáhlé záplavy spojené s propuknutím této infekční choroby (45). Také v České republice stoupal počet hlášených a diagnostikovaných případů onemocnění po různě rozsáhlých povodních, které v poslední době celkem pravidelně postihují území naší republiky. Výskyt leptospirózy v roce 2000 (rok po povodních v severovýchodních Čechách) byl 6x vyšší. Kontakt s jakýmkoliv přírodním zdrojem vody, který je kontaminován patogenními leptospirami, lze proto označit za jedno z epidemiologických rizik přenosu této infekce.

U některých lidí bývá přítomno několik epidemiologických rizik najednou, které souvisejí s vyšší pravděpodobností onemocnění touto infekcí. Velká část obyvatel ale prozatím neví o možném riziku leptospirózy, bylo by proto vhodné upozornit na toto rizikové chování.

Přesto je ovšem leptospiróza významným rizikem u některých specifických profesí (31). Pravděpodobně 30 – 50 % všech případů tohoto onemocnění u lidí je způsobeno vystavením se infekci při zaměstnání. Mezi hlavní rizikové skupiny zaměstnanců patří farmáři a lidé pracující v zemědělství, veterináři, pracovníci na jatkách, instalatéři, horníci, rybáři, pracovníci v kanalizacích a také vojáci (25). Určité profese s sebou jednoznačně přináší větší riziko přenosu a nákazy leptospirózou (12).

V naší sledované skupině pacientů lze určitě za rizikovější zaměstnání označit práci v zemědělství, která byla u několika pacientů zaznamenána (např. ošetřovatelka dojníc, údržbář v drůbežárně, řidič v zemědělském družstvu atd.). Riziko této profese je většinou spojeno s přemnožením hlodavců v těchto zemědělských objektech, se kterými pak zaměstnanci mohou přicházet do kontaktu. Ve studii provedené v Turecku tvořili více jak polovinu pacientů

farmáři a lidé zaměstnaní v zemědělství (lidé pracující s půdou), menší část pak představovali rybáři (12). V jiné studii uvedlo 56 % pacientů pracovní expozici (11).

Jedna ze studií se právě zabývá propuknutím leptospirózy mezi vojenskými branci v Peru. Několik dnů po výcvikovém kurzu bylo více než 40 % těchto branců hospitalizováno kvůli akutnímu horečnatému onemocnění, které bylo později určeno jako leptospiróza. Nejčastějšími klinickými příznaky u těchto vojáků byly horečka, myalgie a bolest hlavy. Různé vojenské operace vyžadují často delší pobyt v přírodním prostředí a tím se samozřejmě zvyšuje riziko přenosu leptospirózy. Rovněž studie dlouhotrvající horečky mezi vojáky v jižním Vietnamu prokázala, že 20 % bylo vyvoláno leptospirami (36).

Klinická prezentace leptospirózy se často u jednotlivých případů výrazně liší a může zahrnovat řadu nespecifických symptomů, kvůli kterým je možné diagnózu leptospirózy snadno zaměnit za jiné horečnaté onemocnění (např. chřipka) (30). Většina případů leptospirózy má mírnější průběh (14). Nástup onemocnění je většinou náhlý, s velkými bolestmi hlavy, myalgií, pocitem nachlazení a vysokou horečkou. Stále méně se manifestuje žloutenka a srdeční selhávání (35). Ve studii uskutečněné v Turecku zjistili, že se u pacientů nejčastěji objevovaly respirační symptomy (72,1%), bolesti svalů (65,7 %) a nauzea a zvracení (65,3 %). V jiné sérii onemocnění byly nejobvyklejšími příznaky horečka, myalgie a bolest hlavy (36). V naší studii převažoval u pacientů výskyt horečky, bolesti hlavy a hepatální příznaky. Časté byly rovněž dlouhodobě zvýšené teploty, bolesti svalů a kloubů, nauzea a zvracení. Jen minimálně byl se vyskytoval ikterus a srdeční abnormality.

Horečka, pocit nachlazení, bolest hlavy, myalgie, anorexie, nauzea, zvracení a vyčerpání jsou obvykle charakteristické pro akutní leptospirózu. Tyto příznaky byly potvrzeny studií na Havaji, kde právě horečka, bolest hlavy, nauzea, zvracení a myalgie byly nejčastěji zaznamenanými symptomy (5). Frekvencovaný výskyt těchto uvedených příznaků je možné potvrdit i v naší provedené studii.

Velice často bývají popisovány u tohoto onemocnění také různé projevy související s plicními komplikacemi. Plicní postižení je většinou mírné a u dospělých jedinců je charakteristické mírnou hemoptýzou či nálezy na rentgenových snímcích hrudníku (7). Respirační symptomy a kašel se v naší

skupině pacientů manifestovaly téměř u 30 %, ale pouze u 14,8 % pacientů byly zachyceny abnormality na rentgenovém vyšetření. V jiných studiích ale bývají rentgenové abnormality objevovány u 11 až 60 % pacientů (11). V sérii pozorovaných anikterických případů v Číně, měla více než polovina pacientů respirační symptomy a 67 % mělo rentgenové abnormality (25).

Renální insuficience bývá zaznamenávána u většiny případů leptospirózy a tyto příznaky mají různou intenzitu závažnosti. Dupont a kol. ve své studii označili oligurii za jeden z rizikových faktorů úmrtnosti u leptospirózy (11). Renální příznaky se projevily u 9 pacientů naší studované skupiny a u 2 pacientů byla uvedena oligurie.

Jako významné faktory u leptospirózy, které mohou zapříčinit smrt byly zaznamenány: alterace mentálního stavu, hladina draslíku (hyperkalémie), věk nad 37 let, renální a respirační insuficience, dyspnoe, zvýšený počet leukocytů, určité abnormality na elektrokardiogramu (EKG) a alveolární infiltráty na rentgenovém snímku hrudníku (12). Uváděná úmrtnost mezi případy leptospirózy se většinou pohybuje v rozmezí 4 až 10 %, ale v některých případech bývá i vyšší (11). Tato vysoká variabilita v úmrtnosti může být způsobena nepřítomností standardizovaných diagnostických kritérií a odlišnou závažností klinických projevů (12). Dalším faktorem, který může ovlivnit závažnost onemocnění a tedy i úmrtnost, je doba rozpoznání a diagnostikování onemocnění od nástupu prvních příznaků choroby.

Výsledky obecných laboratorních vyšetření mohou také částečně přispět k diagnostice leptospirózy, ale většinou se jedná o nespecifické ukazatele, které mohou signalizovat i jiné onemocnění. Jaterní testy většinou uvádějí zvýšené hladiny aminotransferáz (ALT, AST), bilirubinu a alkalické fosfatázy. Obvykle se vyskytuje i zvýšený počet leukocytů a v důsledku poškození renální funkce může být zvýšena plazmatická koncentrace kreatininu (25). U skupinky námi sledovaných pacientů jsme zachytili u většiny převážně zvýšení ALT, AST, kreatininu, C - reaktivního proteinu a také zvýšený počet leukocytů. Výsledky obecných laboratorních vyšetření mohou pouze pomoci naznačit možnou diagnózu; ale je třeba, aby byly podpořeny výskytem klinických příznaků, včasným provedením PCR vyšetření a následně také laboratorní diagnostikou metodou MAL.

Důvody v rozdílech závažnosti leptospirózy zůstávají neobjasněné. Nebyl potvrzen žádný vztah mezi závažností onemocnění a sérotypem daného patogena. Sérotyp *icterohaemorrhagiae* byl objeven u většiny komplikovanějších případů pacientů, u kterých se projevovalo selhání ledvin nebo jater, zatímco meningeální formy onemocnění byly mnohem častěji spojovány se sérotypem *grippotyphosa* nebo *canicola* (11). V naší studii převládaly sérotypy *L. grippotyphosa* P 125 a *L. grippotyphosa* Ž 6, které byly oba nalezeny u celkem 13 pacientů a pak následovaly sérotypy *L. icterohaemorrhagiae* Fryšava a *L. copenhageni* Lebe (oba u 10 pacientů). Studie ve Francii zaznamenala jako nejčastější původce onemocnění u sledované skupiny pacientů sérotypy *L. icterohaemorrhagiae* (37 % případů) a *L. grippotyphosa* (30 % případů), ostatní sérotypy byly méně frekventované. (19b) V jiné studii byl rovněž jako nejčastěji stanovený sérotyp byl označen *L. icterohaemorrhagiae* (12).

Ačkoliv brzký počátek antibiotické terapie zkracuje trvání horečky, renálního selhání a dobu hospitalizace, bohužel však bylo prokázáno, že nesnižuje úmrtnost (11). Okamžité podání penicilinových antibiotik, které bude založené pouze na klinickém podezření leptospirózy, v případech kdy není dostupná rychlá laboratorní diagnostika, může přesto zachránit život nebo alespoň snížit závažnost projevů onemocnění (42). U více jak 70 % pacientů naší studie byla podávána antibiotika penicilínové skupiny, která se užívají k léčbě leptospirózy nejvíce a jsou s nimi nejlepší zkušenosti. Rovněž ve studii provedené Esenem a kol. bylo téměř 80 % pacientů léčeno penicilínovými antibiotiky a léčba trvala v průměru asi 9 dní (12).

Především kvůli velké antigenní heterogenitě mezi různými sérovary leptospir, nebyla ještě vyvinuta univerzální účinná vakcína pro humánní použití. Existují pouze sérovar specifické leptospirové vakcíny, které poskytují jen krátkodobou imunitu (38). Francie je jednou z mála evropských zemích, kde je povoleno užívat inaktivovanou vakcínu proti sérotypu *L. icterohaemorrhagiae* u osob vykonávajících určité specifické profese. Toto očkování je třeba obnovovat každé 2 roky. Kromě toho je u osob s předpokládanou expozicí možné použít jako prevenci chemoprofylaxi doxycyklinem (31).

Tato studie byla zaměřena na získání epidemiologických, klinických a laboratorních informací, které souvisejí s onemocněním leptospirózou a které

jsme mohli nejčastěji objevit u skupiny sledovaných pacientů. Při diagnostice leptospirózy by bylo vhodné propojit všechny tyto oblasti a jistě by pak docházelo ke snížení počtu případů, kdy je diagnóza leptospirózy zaměněna za diagnózu jinou. Před definitivním určením diagnózy by bylo vhodné zaměřit se také na získání epidemiologické anamnézy, která může často pomoci nemoc odhalit. Velice důležité je samozřejmě doplnit a potvrdit diagnózu nejčastěji sérologickým vyšetřením na přítomnost protilátek proti patogenním leptospirám. Správné určení původce onemocnění je významné také z hlediska epidemiologického, neboť na základě diagnózy leptospirózy provede hygienická služba v ohnisku příslušná opatření k ochraně osob a popřípadě zvířat (hospodářská zvířata, domácí atd.). K výše uvedeným opatřením patří například deratizace, užití ochranných pomůcek pro pracovníky v zemědělských podnicích a při práci v přírodě.



## 6. ZÁVĚR

Provedená studie umožnila zhodnotit epidemiologické, klinické a laboratorní výsledky u skupiny sledovaných pacientů ze spádové oblasti Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Při stanovení konečné diagnózy by bylo vhodné propojit všechny tyto aspekty.

Zjistili jsme, že je velice důležité při stanovení diagnózy zabývat se epidemiologickými rizikovými faktory, které se u pacientů často vyskytují a bývají i hlavní příčinou vzniku infekce. Lidé často pobývají v přírodě a vykonávají zde různé aktivity související převážně s volným časem. Při těchto činnostech přicházejí do kontaktu s vodou, půdou či jinými materiály, které mohou být kontaminované patogenními leptospirami a jsou tedy zdrojem infekce. Převážná většina pacientů z naší skupiny uváděla různé formy pobytu v přírodě (vodácké soustředění, stanování aj.), kontakt s vodou a kontakt s hlodavci či jinými zvířaty. Za rizikové zaměstnání z hlediska infekce leptospirózou lze v této skupině pacientů označit práci v zemědělství.

Klinické příznaky tohoto onemocnění bývají často nespecifické, jak bylo potvrzeno i v naší studii. Mezi nejčastěji zaznamenané klinické projevy v naší skupině pacientů patří horečka, dlouhotrvající zvýšené teploty, hepatální příznaky, bolesti hlavy, bolesti kloubů, myalgie, nauzea a zvracení. Často byly popisovány také respirační symptomy a kašel.

Z hodnot obecných laboratorních ukazatelů se nejčastěji objevovaly zvýšené hladiny aminotransferáz (ALT, AST), C – reaktivního proteinu, kreatininu a také zvýšený počet leukocytů. Jedná se sice o nespecifické laboratorní ukazatele, které se mohou projevovat i při jiných onemocněních, ale přesto je důležité brát je v úvahu při diagnostice leptospirózy.

Diagnózu tohoto onemocnění je po propojení epidemiologických, klinických a laboratorních aspektů důležité potvrdit specifickými laboratorními vyšetřeními. V současné době se nejvíce používá sérologická metoda MAL pro stanovení protilátek proti patogenním leptospirám nebo metoda PCR pro průkaz DNA patogenních leptospir. Pro pozitivní vývoj a léčbu onemocnění, především u závažných forem leptospirózy, je podstatné odhalit přítomnost infekce co nejdříve po nástupu klinických příznaků.

Výsledky retrospektivní studie, která hodnotila všechny uvedené aspekty infekce patogenními leptospirami a onemocnění leptospirozou budou proto publikovány v některém odborném časopise v České republice.

## **7. SEZNAM LITERATURY**

1. Adler H., Vonstein S., Deplazes P., Stieger C., Frei R.: Prevalence of *Leptospira* spp. in various species of small mammals caught in an inner-city area in Switzerland. *Epidemiol Infect*, 2002, 128: 107-109.
2. Bal A.E., Gravekamp C., Hartskeerl R., De Meza-Brewster J., Korver H., Terpstra W.J.: Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol*, 1994, 32(8): 1894-1898.
3. Barocchi M., Ko A., Ramos Ferrer S., Tucunduva Faria M., Reis M., Riley L.: Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni and its application to PCR-based differentiation of *Leptospira* serogroups. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(1): 191-195.
4. Bharadwaj: Leptospirosis – a reemerging disease ? *Indian J Med Res*, 2004, 120: 136-138.
5. Bharti A.R, Nally J.E, Ricaldi J.N, Matthias M.A, Diaz M.M, Lovett M.A, Levett P.N, Gilman R.H, Willig M.R, Gotuzzo E., Vinetz J.M and Peru – United States Leptospirosis Consortium: Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Infect Dis*, 2003, 3(12): 757-771.
6. Bolin C.A., Koellner P.: Human-to-human transmission of *Leptospira interrogans* by milk. *J Infect Dis*, 1988, 158(1): 246-247.
7. Bowsher B., Callahan Ch.W., Person D., Ruess L.: Unilateral leptospiral pneumonia and cold agglutinin disease. *Chest*, 1999, 116: 830-832.
8. Brenner D., Kaufmann A., Sulzer K., Steigerwalt A., Rogers F., Weyant R.: Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Inter J System Bacteriol*, 1999, 49: 839-858.

9. Carvalho J.E., Moraes I.N., Ferreira A., Gomes R., Dalston M., Silva J.: Study of bronchoalveolar lavage in leptospirosis patients with pulmonary involvement. 2003
10. Čermáková Z., Plíšková L., Ryšková O., Prausová P., Prášil P., Hanovcová I.: Originální metoda polymerázové řetězcové reakce (PCR) v diagnostice leptospirózy. Lék Zpr LF UK HK, 2004, 49(5-6): 207-213.
11. Dupont H., Dupont-Perdrizet D., Perie J., Zehner-Hansen S., Jarrige B., Daijardin J.: Leptospirosis: Prognostic factors associated with mortality. Clin Infect Dis, 1997, 25: 720-724.
12. Esen S., Sunbul M., Leblebicioglu H., Eroglu C., Turan D.: Impact of clinical and laboratory findings on prognosis in leptospirosis. Swiss Med Wkly, 2004, 134: 347-352.
13. Fernandes M.: Leptospirosis. [www.medstudents.com.br/dip/dip1.htm](http://www.medstudents.com.br/dip/dip1.htm)
14. Granito A., Ballardini G., Fusconi M. Volta U., Muratori P., Sambri v., Battista G., Bianchi F.: A case of leptospirosis simulating colon cancer with liver metastases. World J Gastroenterol, 2004, 10(16): 2455-2456.
15. Green-McKenzie J.: Leptospirosis in humans. [www.emedicine.com/emerg/topic856.htm](http://www.emedicine.com/emerg/topic856.htm), 2005.
16. Harkin K.R., Roshto Y., Sullivan J.: Clinical application of a polymerase chain reaction assay for diagnosis of leptospirosis in dogs. J Am Vet Med Assoc, 2003, 222 (9): 1224-1229.
17. Harkin K.R., Roshto Y., Sullivan J., Purvis T., Chengappa M.: Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospire in dogs. J Am Vet Med Assoc, 2003, 222 (9): 1230-1233.

18. Hickey P.W., Demers D.: Leptospirosis.  
[www.emedicine.com/ped/topic1298.htm](http://www.emedicine.com/ped/topic1298.htm), 2003.
19. Chappel R.J., Goris M., Palmer M., Hartskeerl R.A.: Impact of proficiency testing on result of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(12): 5484-5488.
20. Cheng F.W.T., Leung T.F., Lee N., Yap F., Hui J., Fok T.F., Ng P.C.: Fever, pulmonary haemorrhage and acute renal failure in a young girl. *Hong Kong Med J*, 2005, 11(5): 408-410.
21. Chmela J., Mazánek L., Příza M.: Doma chovaný potkan nakazil Weilovou nemocí své dva chovatele. *CEM*, 2001, 11(4): 168-170.
22. Kapla J.: Prognóza leptospirózy bývá příznivá. *Lék listy*, 2004, 8: 26.
23. Ko A., Reis M., Dourado C., Johnson W., Riley L., and the Slavador Leptospirosis Study Group: Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *The Lancet*, 1999, 354: 820-825.
24. Laras K., Van C., Bounlu K., Tien N., Olson J., Thongchanh S., Anh T., Loan H., Punjabi N., Khiem H., An U., Insisiengmay S., Watts D., Beecham J., Corwin A.: The importance of leptospirosis in southeast Asia. *Am J Trop Med Hyg*, 2002, 67(3): 278-286.
25. Levett P.N.: Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*, 2001, 14(2): 296-326.
26. Levett P.N., Branch S., Whittington C., Edwards Ch., Paxton H.: Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. *Clin Diagn Labor Immunol*, 2001, 8(2): 349-351.
27. Leptospirosis review. [www.acc.co.nz/wcm001/groups/external-ip/documents/internet/wcm000719.pdf](http://www.acc.co.nz/wcm001/groups/external-ip/documents/internet/wcm000719.pdf)

28. Maldonado F., Portier H., Kisterman J.-P.: Bilateral facialis palsy in a case of leptospirosis. *Scand J Infect Dis*, 2004, 36: 386-387.
29. Mérien F., Amouriaux P., Perolat P., Baranton G., Saint Girons I.: Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol*, 1992, 30(9): 2219-2224.
30. Morgan J., Bornstein S., Karpati A., Bruce M., Bolin C., Austin C., Woods Ch., Lingappa J., Langkop C., Davis B., Graham D., Proctor M., Ashford D., Bajani M., Bragg S., Shutt K., Perkins B., Tappero J. for the Leptospirosis Working Group: Outbreak of Leptospirosis among Triathlon Participants and Community Residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clin Inf Dis*, 2002, 34: 1593-1599.
31. Nardone A., Capek I., Baranton G., Campese Ch., Postic D., Vaillant V., Liénard M., Desenclos J.-C.: Risk factors for leptospirosis in metropolitan France : Results of a national case-control study, 1999 – 2000. *Clin Inf Dis*, 2004, 39: 751-753.
32. Natarajaseenivasan K., Vijayachari P., Sugunan A.P., Sharma S., Seghal S.C.: Leptospiral proteins expressed during acute and convalescent phases of human leptospirosis. *Indian J Med Res*, 2004, 120: 151-159
33. Panicker J.N., Mammachan R., Jayakumar R.V.: Primary neuroleptospirosis. *Postgrad Med J*, 2001, 77: 589-590.
34. Rathinam S.R.: Ocular leptospirosis. *Curr Opin in Ophthalmol*, 2002, 13: 381-386.
35. Rathinam S.R., Rathman S., Selveraj S., Dean D., Nozik R.A., Namperumalsamy P.: Uveitis associated with an epidemic outbreak of leptospirosis. *Americ J Ophthalmol*, 1997, 124(1): 71-79.

36. Russell K., Gonzales M., Watts M., Lagos-Figueroa R., Chauca G., Ore M., Gonzales J., Moron C., Tesh R., Vinetz J.: An outbreak of leptospirosis among Peruvian military recruits. *Am J Trop Med Hyg*, 2003, 69(1): 53-57.
37. Sambasiva R., Naveen G., Bhalla P., Agarwal S.K.: Leptospirosis in India and the rest of the world. *Braz J Infect Dis*, 2003, 7(3): 178-193.
38. Sejvar J., Bancroft E., Winthrop K., Bettinger J., Bajani M., Bragg S., Shutt K., Kaiser R., Marano N., Popovic T., Tappero J., Ashford D., Mascola L., Vugia D., Perkins B., Rosenstein N., and the Eco-Challenge Investigation Team: Leptospirosis in „Eco-Challenge“ athletes, Malaysian Borneo, 2000. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(6): 702-707.
39. Smythe L., Smith I., Smith G., Dohnt M., Symonds M., Barnett L., McKay D.: A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect Dis*, 2002, 2: 13.
40. Šebek J.: Leptospiróza – po celém světě rozšířené a nebezpečné onemocnění psů a lidí.
41. Tremli F., Pejčoch M., Holešovská Z.: Small mammals – natural reservoir of pathogenic leptospire. *Vet Med Czech*, 2002, 47(10-11): 309-314.
42. Trevejo R., Rigau-Pérez J., Ashford D., McClure E., Gonzáles C., Amador J., Reyes J., Gonzales A., Zaki S., Shien W., McLean R., Nasci R., Weyant R., Bolin C., Bragg S., Perkins B., Spiegel R.: Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage – Nicaragua, 1995. *J Infect Dis*, 1998, 178: 1457-1463.
43. Truccolo J., Serais O., Merien F., Perolat P.: Following the course of human leptospirosis: evidence of a critical threshold for the vital prognosis using a quantitative PCR assay. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 204(2): 317-321.

44. Vijayachari P., Hartskeerl R.A., Sharma S., Natarajaseenivasan K., Roy S., Terpstra W.J., Sehgal S.C.: A unique strain of *Leptospira* isolated from a patient with pulmonary haemorrhages in the Andaman Islands: a proposal of serovar portblairi of serogroup Sehgal. *Epidemiol Infect*, 2004, 132: 663-673.
45. Vinetz J.M: Leptospirosis. *Current Opinon in Inf Dis*, 2001, 14: 527-538.
46. Zítek K.: Leptospirózy – zdravotní riziko po povodních. *Temp Medic*, 2002, 11 (9): 36-37.
47. Zítek K.: Surveillance leptospirózy rok po povodních. 1999, 8(4): 143-146.