SOUHRNNÉ SDĚLENÍ

Možnosti laboratórnej diagnostiky leptospiróz

Perželová J., Jareková J., Kotrbancová M., Špaleková M.

Ústav epidemiológie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, Slovenská republika

SÚHRN

Leptospirózy sú celosvetovo rozšírené zoonózy vyvolané hydrofilnými baktériami rodu *Leptospira*. Človek sa môže infikovať kontaktom s chorým zvieraťom alebo nepriamo pri pobyte v kontaminovanom prostredí (voda, vlhká pôda), v prírodných ohniskách, pri práci alebo pri športových a voľnočasových aktivitách. Leptospirózy môžu prebiehať ako ľahšie chrípke podobné ochorenia alebo ako závažné febrilné stavy (meningitída, pľúcne hemoragie, hepato-renálny syndróm, myokarditida). V práci sa uvádza prehľad laboratórnych diagnostických metód leptospiróz s poukázaním na ich výhody a nevýhody. V praxi sa prednostne využíva sérologická diagnostika, najmä mikroaglutinačný test, ktorý tiež slúži ako konfirmačný test, menej často enzýmová imunoadsorbentná analýza. V priamej diagnostike sa pre rýchlu diagnostiku leptospiróz zavádzajú metódy molekulárnej biológie, najmä polymerázová reťazová reakcia a jej modifikácie, ktoré dokazujú ochorenie už v akútnom štádiu infekcie.

KĽÚČOVÉ SLOVÁ:

leptospirózy – diagnostika – mikroaglutinačný test – enzýmová imunoadsorbentná analýza – polymerázová reťazová reakcia

ABSTRACT

Perželová J., Jareková J., Kotrbancová M., Špaleková M.: Possibilities for laboratory diagnosis of leptospiroses

Leptospiroses are worldwide spread zoonoses caused by hydrophilic bacteria of the genus *Leptospira*. Humans can be infected by contact with an infected animal or indirectly via staying in a contaminated environment (water, wet soil), in natural foci, while working outdoors, or while doing outdoor sport and leisure activities. Leptospirosis may manifest as a mild flu-like illness or in a severe febrile form (meningitis, pulmonary haemorrhage, hepato-renal syndrome, or myocarditis). Presented are the laboratory diagnostic methods for leptospiroses with their advantages and disadvantages. In practice, serological diagnosis by the microscopic agglutination test, which is also a confirmatory test, and, less often, the enzyme-linked immunosorbent assay are used. Methods of molecular biology are being introduced for direct rapid diagnosis of leptospiroses, in particular the polymerase chain reaction and its modifications, which allow the detection of Leptospira infection in acute phase.

KEYWORDS:

Leptospirosis – diagnosis – microscopic agglutination test – enzyme-linked immunosorbent assay – polymerase chain reaction

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 66, 2017, č. 3, s. 140–145

ÚVOD

Leptospirózy sú významné celosvetovo rozšírené prírodne ohniskové zoonózy. Primárne postihujú hospodárske a voľne žijúce zvieratá. Ochorenie vyvolávajú hydrofilné gramnegatívne baktérie rodu *Leptospira* taxonomicky zaradené medzi spirochéty.

Taxonómia leptospír

Rod *Leptospira* patrí do čeľade *Leptospiraceae*. Na základe antigénnej príbuznosti (podľa štruktúry lipopolysacharidov) sú jednotlivé kmene leptospír zaraďované do sérovarov, pričom patogénne kmene leptospír boli zoskupené do druhu *Leptospira interrogans sensu lato* a saprofytické kmene do druhu *L. biflexa sensu lato*. Antigénne blízke sérovary sa tradične spájajú do sérologických skupín, ktoré však nemajú taxonomický význam. Používajú sa pri sérologickej diagnostike ochorenia a najmä pri epidemiologických štúdiách na regionálnej alebo populačnej úrovni [33, 23]. Táto staršia fenotypová klasifikácia bola doplnená genotypovou, ktorá viedla k vytvoreniu 21 genomospecies – druhov leptospír zahrnujúcich všetky kmene rodu *Leptospira* (patogénne aj nepatogénne). S prihliadnutím na ich fylogenézu a patogenitu sa druhy rodu *Leptospira* ďalej delia na 3 podskupiny: patogénne – 9 druhov, nepatogénne – 7 druhov a tzv. prechodné (intermediárne) – 5 druhov. Popísané druhy však nekorešpondujú so sérologickou klasifikáciou [23]. Dnes je známych viac ako 300 sérovarov leptospír zoskupených do 20 sérologických skupín, pričom každý nový izolovaný kmeň by mal byť identifikovaný na úrovni sérovaru a druhu [33, 34]. Na Slovensku boli diagnostikované ochorenia ľudí vyvolané 18 sérovarmi leptospír, ktoré sú zaradené do 11 sérologických skupín [6].

Pramene nákazy

Hostiteľskými organizmami leptospír sú domáce a voľne žijúce zvieratá. Z doteraz známych viac ako 160 druhov cicavcov [11] sú najvýznamnejšími rezervoármi hlodavce, hovädzí dobytok, ošípané a psy [4]. Infekcia u zvierat prebieha väčšinou asymptomaticky, môže sa však klinicky prejaviť napr. abortami, spôsobovať sterilitu hovädzieho

proLékaře.cz | 3.11.2026

dobytka a ošípaných [16]. Infikované zvieratá môžu na základe perzistencie leptospír v renálnych tubuloch vylučovať tieto agensy močom do prostredia mesiace alebo až roky (resp. celoživotne). V niektorých regiónoch sveta sa pozoruje určitá selektívna viazanosť niektorých sérovarov leptospír na určité druhy rezervoárov (hlavné rezervoárové zvieratá). Napríklad na Slovensku je hlavným rezervoárovým zvieraťom pre sérovar Grippotyphosa hraboš poľný, pre sérovary Icterohaemorrhagiae a Copenhageni najmä potkan. Ďalšie zvieracie druhy môžu byť potenciálne rezervoáre, napr. pre sérovar Grippotyphosa ryšavky alebo hrdziaky [7]. Na Slovensku boli izolované leptospíry zo 16 druhov zvierat [6].
K prenosu infekcie na človeka dochádza buď priamym, alebo častejšie nepriamym kontaktom s močom infikovaných zvierat v kontaminovanom prostredí (voda, pôda), kde môžu leptospíry prežívať niekoľko mesiacov [14]. Vstupnou bránou infekcie je predovšetkým porušený kožný kryt, sliznica ústnej a nosovej dutiny, spojovky, prípadne sliznica urogenitálneho traktu [24]. Príležitostne sa môže človek nakaziť aj požitím kontaminovanej vody alebo potravín, či inhaláciou kvapôčiek kontaminovaného moču [7]. Človek je veľmi zriedkavo prameňom nákazy [7, 34].

Klinický obraz leptospiróz
Inkubačná doba ochorení je v rozpätí 4–20 dní, zvyčajne 6–8 dní [11]. Leptospirózy môžu prebiehať ako akútna život ohrozujúca hepatitída s renálnou insuficienciou, meningitída až meningoencefalitída, s tvorbou pľúcnych hemoragií až respiračným zlyhaním, hepato-renálnym syndrómom s hemoragiami, prípadne myokarditídou [40]. Ikterická forma s ťažším priebehom ochorenia s febrilitami, splenomegáliou a nefritídou sa vyskytuje asi v 10 %, s letalitou 10–40 %. Najčastejšie ju vyvolávajú leptospíry sérovarov Icterohaemorrhagiae a Copenhageni, známa je ako Weilova choroba [34]. Ľahšie formy leptospiróz pripomínajú chrípku, sú sprevádzané horúčkou, nevoľnosťou, bolesťou hlavy a svalov, hnačkou, kašľom alebo prebiehajú inaparentne. Tieto infekcie sú veľmi často vyvolané leptospírami sérovaru Grippotyphosa. Asi u 10 % pacientov sú prítomné neskoré následky ochorenia, nazývané aj perzistentná humánna leptospiróza [7]. Pre široké spektrum nešpecifických príznakov sa leptospiróza v tropických oblastiach zamieňa za iné ochorenia, napr. hemoragickú horúčku dengue, rickettsiózu alebo maláriu [1].

Výskyt
Odhaduje sa, že vo svete sa vyskytuje ročne viac ako milión prípadov humánnych leptospiróz. Sú veľkým problémom najmä v Latinskej Amerike, juhovýchodnej Ázii a ďalších tropických a subtropických oblastiach [9]. Dôvodom sú klimatické podmienky týchto regiónov, teplé a vlhké prostredie, ktoré umožňujú prežívanie leptospír mimo hostiteľského organizmu [34]. Zvýšené riziko infekcie predstavujú tiež preľudnené mestské oblasti, tzv. slamy, zamorené synantropnými hlodavcami, oblasti po prírodných katastrofách (povodne, cyklóny, obdobie dažďov) a zmena klímy (globálne otepľovanie) [11]. V tropických oblastiach je hlásená incidencia leptospiróz > 10/100 000 obyvateľov, pričom sa výskyt sezónne zvyšuje v daždivých ročných obdobiach [33], v regiónoch s miernym podnebím býva < 0,1–1/100 000 obyvateľov [15].
Na Slovensku nepresahovala incidencia leptospiróz za ostatné roky hlásený výskyt 0,5/100 000 obyvateľov a ochorenia sa vyskytujú už iba sporadicky [27]. Podobne v Českej republike bola v rokoch 1990–2008 zaznamenaná priemerná ročná incidencia leptospiróz 0,4/100 000 [34]. Je to spôsobené najmä znížením rizika profesionálnej expozície u pracovníkov v rastlinnej a živočíšnej výrobe, mechanizáciou poľnohospodárstva a celkovou zlepšenou sanitáciou prevádzok a obydlí (ochrana pred hlodavcami). Na druhej strane voľnočasové aktivity v prírode a expozícia vode (rekreačné aktivity, vodné športy, pitie z horských studničiek a iné), či cestovateľské aktivity do oblastí s vyšším výskytom leptospiróz môžu predstavovať riziko akvirovania infekcie [7].
Počet hlásených humánnych leptospiróz pravdepodobne neodráža ich reálny výskyt. Mnohé, najmä ľahšie infekcie ostávajú nerozpoznané. Príčinou podhodnotenia môže byť aj uvádzanie leptospiróz pod inými diagnózami a nezáujem o ich diagnostiku.

LABORATÓRNA DIAGNOSTIKA LEPTOSPIRÓZ

Laboratórna diagnostika leptospiróz a využitie testov sa odvíjajú od dvojfázového priebehu choroby. Počas prvej, akútnej septikemickej fázy (3–10 dní), sa leptospíry nachádzajú v krvi, v likvore a vo väčšine tkanív chorého. V druhej, imúnnej fáze, začínajúcej obyčajne v druhom týždni ochorenia, sa v krvi objavujú protilátky, ktorých stúpajúci titer koreluje s elimináciou leptospír [33]. V súčasnosti sa laboratórna diagnostika leptospiróz opiera predovšetkým o nepriamu sérologickú diagnostiku. V praxi sa však odporúča používať kombináciu aspoň dvoch odlišných testov v závislosti od fázy ochorenia.

Nepriame diagnostické metódy
Nepriame diagnostické metódy, najčastejšie mikroaglutinačný test (MAT) a enzýmová imunoadsorbentná analýza (ELISA) dokazujú prítomnosť špecifických protilátok v krvi, v moči a v likvore pacienta od 5.–7. dňa ochorenia. Protilátky dosahujú maximum v 3.–4. týždni a v nižších titroch môžu pretrvávať aj roky [23].

Mikroaglutinačný test (MAT)
MAT je v súčasnosti základným a referenčným testom pre diagnostiku leptospiróz ľudí a zvierat. Princípom je aglutinačná reakcia riedeného séra pacienta najčastejšie so živými antigénmi rôznych sérovarov leptospír vyhodnocovaná mikroskopicky v tmavom poli [16]. V teste sa súčasne dokazujú protilátky tried IgM aj IgG. Titer protilátok sa stanovuje ako najvyššie riedenie séra, v ktorom aglutinovalo > 50 % leptospír [38]. MAT umožňuje určiť vyvolávajúceho patogéna na úrovni séroskupiny.
Spektrum antigénov použitých v MAT by malo byť čo najširšie a malo by zahŕňať sérovary leptospír, ktoré cirkulujú v danej geografickej oblasti [11]. Na základe zisteného výskytu sérovarov leptospír navrhol Kmety v roku 1957 štandardizovaný MAT pre podmienky Slovenska, neskôr, v rokoch 1978 a 1980 bol ďalej doplnený [5, 18, 20]. Doplnenia umožnili spresnenie sérovarovej diagnostiky pomocou absorpčných testov dôležitej pre účely surveillance a opatrení v spolupráci s veterinárnou službou [7].
Pre stanovenie diagnózy pomocou MAT je potrebné vyšetrenie párových vzoriek v rozpätí 10 dní až 3 týždňov na zachytenie dynamiky tvorby protilátok t. j. minimálne štvornásobného vzostupu titra protilátok v druhej vzorke

proLékaře.cz | 3.11.2026

[33, 34]. V prípade, že nie je pozorovaný vzostup protilátok, môže ísť o protilátky pretrvávajúce z dávnej infekcie. Pri vyšetrení jednej vzorky pacienta nie je teda možné odhaliť falošne pozitívny/negatívny výsledok reakcie. Pre dosiahnutie maximálnej objektívnosti hodnotenia reakcie je tiež potrebná dlhoročná skúsenosť hodnotiaceho [17]. Komplikáciou interpretácie výsledkov MAT môže byť výskyt tzv. spoluaglutinácií v akútnej fáze leptospirózy [30]. Ide o fenomén, keď sérum pacienta reaguje s kmeňmi leptospír viacerých testovaných séroskupín. Včasná vzorka séra môže tiež reagovať s kmeňmi iných séroskupín, kým protilátky proti kauzálnemu agensu sa vytvoria až neskôr. Ide o paradoxnú reakciu [19].
Nevýhodou MAT je, že kmene leptospír musia byť živé a udržiavané preočkovávaním v pravidelných intervaloch, čo je hlavnou prekážkou pre vykonávanie tohto testu v bežných laboratóriách. Na Slovensku sa diagnostika humánnych infekcií pomocou MAT vykonáva len na jednom pracovisku.

Enzýmová imunoadsorbentná analýza (ELISA)
ELISA je vhodný skríningový test pre vyšetrenie veľkého počtu sér v terénnych laboratóriách. Test stanovuje špecifické IgM protilátky často s použitím rodovo špecifického antigénu zo saprofytického kmeňa druhu *L. biflexa* alebo sady antigénov z leptospír rôznych patogénnych sérovarov. Jej senzitívnosť a špecifickosť varíruje v závislosti od použitého kmeňa leptospír, jeho opracovania a zastúpenia leptospiróz podľa vyvolávajúceho sérovaru v danom regióne [8, 12, 13, 33].
Naše prvé skúsenosti s komerčným testom Serion ELISA classic IgM pri vyšetrení sér od 64 pacientov s akútnou leptospirózou dokázali 76,6% citlivosť a 95% špecifickosť testu (tab. 1). Citlivosť kolísala v závislosti od typu leptospirózy, od 100 % pri infekciách vyvolaných leptospírami skupiny Pomona a pri Weilovej chorobe, 70 % a 80 % pri leptospiróze australis a paradoxnej reakcii a 55 %, resp. 58 % pri leptospiróze grippotyphosa, resp. sejroe. Pri zohľadnení proporcií typov leptospiróz u ľudí v SR v rokoch 2003–2012 môžeme predpokladať, že citlivosť ELISA v našich podmienkach by bola asi 80%. Potvrdili sme aj pozorovania iných autorov, že v ELISA sa dokazujú protilátky skôr ako v MAT [32]. Ďalšou výhodou ELISA je jej rýchla a jednoduchá realizovateľnosť v teréne. Jej nevýhodou je, že neumožňuje sérovarovú/séroskupinovú diagnostiku ochorenia a nemá dostatočnú diagnostickú hodnotu pre potvrdenie leptospirózy. Preto sa výsledky ELISA konfirmujú najčastejšie v MAT, prípadne polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) alebo kultiváciou [33].

Tabuľka 1. Citlivosť testu Serion ELISA classic [32]

Table 1. Sensitivity of the Serion ELISA classic test [32]

Leptospiróza	Pozitívne/vyšetrené	Citlivosť v %
Icterohaemorrhagiae/ Copenhageni	10/10	100,0
Grippotyphosa	6/11	54,6
Sejroe	7/12	58,3
Pomona	11/11	100,0
Australis	7/10	70,0
Paradoxná reakcia	8/10	80,0
Spolu	49/64	76,6

Iné testy nepriamej diagnostiky leptospiróz
Ďalšie testy na sérologickú diagnostiku leptospiróz, napr. makroaglutinačný test, testy nepriamej hemaglutinácie, hemolytické testy, nepriama imunofluorescencia, komplement fixačná reakcia a ich rôzne modifikácie sa využívajú ako rýchle, orientačné testy v terénnych laboratóriách, najmä v krajinách s endemickým výskytom leptospiróz. Ich nedostatkom je nižšia citlivosť a/alebo špecifickosť oproti MAT, preto sa v praxi používajú zriedkavejšie [33]. Napríklad v makroaglutinačnom teste sa voľným okom hodnotí miera aglutinácie, pričom ako antigény slúžia tepelne a formaldehydom opracované leptospíry najčastejšie saprofytického druhu *L. biflexa*. Tento test je v porovnaní s MAT rýchlejší, menej technicky náročný, ale je menej špecifický ako MAT, a preto musia byť jeho výsledky konfirmované [33].

Priame diagnostické metódy
Priame diagnostické metódy dokazujú pôvodcu ochorenia v krvi, sére, moči a tkanivách. Využívajú sa v prvých dňoch ochorenia, pred začatím antibiotickej terapie, ktorá môže ovplyvniť citlivosť týchto metód lýzou leptospír [23, 36]. Klasické mikrobiologické testy na dôkaz pôvodcu v biologickom materiáli (kultivácia, biologický pokus na zvierati) sa pre technickú a časovú náročnosť využívajú málo a nahrádzajú ich metódy molekulárnej biológie [10, 16, 21, 22, 30, 35, 37].

Mikroskopický dôkaz
Leptospíry sa ťažko farbia bežnými farbiacimi postupmi, osvedčila sa metóda striebrenia. Pri mikroskopickom vyšetrení sa častejšie využíva vyšetrenie v tmavom poli/vo fázovom kontraste. V natívnom preparáte (krv, moč, likvor, suspenzia tkaniva) sa leptospíry javia ako pohybujúce sa svetlé, tenké, dlhé, špirálovité vlákna so zahnutými koncovými časťami. Pre záchyt aspoň jednej leptospíry v zornom poli musí byť hustota zárodkov minimálne 10^4/ml. Problémom pri odčítaní môžu byť falošne pozitívne výsledky (pseudoleptospíry – fibrinózne vlákna) ako aj falošná negativita [11]. Mikroskopický dôkaz leptospír ako jediný test pre diagnostiku leptospiróz nestačí pre nízku citlivosť a špecifickosť testu [31].

Kultivačný dôkaz
Kultivácia leptospír z krvi, moču alebo likvoru je náročná a pre rutinnú diagnostiku sa málo používa. Vzorky je nutné odobrať v akútnom štádiu ochorenia a kultivovať 1–3 mesiace v tekutom alebo polotuhom médiu pri teplote 28–30 °C. Používa sa komerčná pôda EMJH (Ellinghausen, McCullough, Johnson, Harris) alebo Korthofova pôda obohatená o čerstvé králičie sérum (8–10 % v/v). Hodnotí sa rast po 3–7 dňoch a po 14 a 21 dňoch, resp. 3 mesiacoch. Na potlačenie rastu iných baktérií sa do média pridávajú rifampicín, neomycín, actidione alebo 5-fluorouracil [11].

Biologický pokus na zvierati
Biologický pokus na zvierati patrí spolu s kultiváciou medzi najstaršie laboratórne metódy dôkazu leptospír. Morčatám alebo škrečkom sa intraperitoneálne inokuluje krv alebo moč pacienta. Pri manifestnej infekcii zvieraťa sa odoberá peritoneálna tekutina, krv, pečeň alebo obličky a vyšetrujú sa mikroskopicky v tmavom poli a kultivačne. Biologický pokus sa odporúča vykonať najmä v prípade kontaminovaných vzoriek alebo pri vzorkách

proLékaře.cz | 3.11.2026

s nízkou koncentráciou leptospír [38]. V súčasnosti sa pre svoju finančnú a časovú náročnosť takmer nepoužíva.

Diagnostika pomocou metód molekulárnej biológie

Techniky molekulárnej biológie využívajúce amplifikáciu DNA umožňujú dôkaz infekcie už v prvých dňoch ochorenia, a tým cielenú a včasnú terapiu pacienta [36]. Najpoužívanejšou je PCR a jej modifikácie (real-time PCR a iné), ktoré umožňujú dokázať DNA leptospír v biologickom materiáli a odlíšiť DNA patogénnych leptospír od nepatogénnych sérovarov [26]. Tieto metódy detegujú DNA leptospír v prvých 5–10 dňoch ochorenia v krvi a likvore [2], po týždni aj v moči, v obličkách a pečeni, ešte pred vytvorením špecifických protilátok [16, 25].

Pre diagnostiku pomocou PCR je dôležitý výber génov a primerov patogénnych leptospír. Najčastejšie používanými sú gény *lig*, *lipL32/hap1*, *lipL21*, *lipL32* a *lipL41*. Citlivosť PCR varíruje. V štúdii Browna et al. [10] bola PCR senzitívnejšia ako kultivácia (68 % oproti 48 %), v iných štúdiách bola PCR menej citlivá ako MAT [2]. Zlyhanie diagnostiky pomocou PCR môže byť spôsobené slabou alebo krátko trvajúcou leptospirémiou v prvej fáze ochorenia, odberom vzoriek v neskorom období infekcie alebo po začatí antibiotickej terapie, ktorá vedie k rýchlemu poklesu počtu leptospír v krvi.

Real-time PCR dosahuje vyššiu citlivosť ako konvenčná PCR a nie je natoľko ovplyvnená inhibičnými faktormi. Jej detekčný limit sa pohybuje na úrovni 10–100 buniek/ml krvi alebo moču [33]. Cieľovými génmi sú napr. gény *lipL32*, *secY* alebo gény pre 16S rRNA a 23S rRNA. Najčastejšie je cieľovým génom *lipL32*, kódujúci lipoproteín vonkajšej membrány buniek, ktorý je takmer identický pre najvýznamnejšie patogénne sérovary leptospír [29]. Real-time PCR sa zatiaľ využíva najmä vo veterinárnej praxi na odhalenie vylučovania alebo nosičstva leptospír u zvierat, pričom sa štandardne (preventívne a pri reprodukčných stratách) vyšetruje moč hovädzieho dobytka a obličky ošípaných [38]. Nevýhodou tejto metódy je, že nedokazuje sérovary [11, 33].

Ďalšími metódami založenými na amplifikácii úseku DNA sú izotermické metódy, ktoré môžu byť alternatívou ku PCR [2]. Izotermická amplifikácia prebieha pri konštantnej teplote 60–65 °C a vyhodnocuje sa odčítaním miery zákalu alebo fluorescencie vzorky. Cieľovými génmi sú *lipL41* alebo *rrs*. Detekčný limit tejto metódy je 2–100 buniek/reakčná zmes, špecifickosť tejto metódy je relatívne nízka [33]. Tieto metódy nie sú náročné na technické vybavenie, a tak sa využívajú najmä v rozvojových krajinách.

Málo využívanou je aj metóda in situ hybridizácie so značením celého genómu rádioaktívnym izotopom alebo biotínom alebo špecifických segmentov DNA ako sond na dôkaz infekcie z vitálnych ako aj post mortem tkanív [2]. Pre väčšie diagnostické využitie by bola vhodná špecifická rekombinantná sonda (próba) na dôkaz infekcií vyvolaných celým rodom *Leptospir*a.

V tabuľke 2 sú uvedené výhody a nevýhody najbežnejšie používaných metód v diagnostike leptospiróz.

Identifikácia leptospír sérologickými a molekulárno-biologickými metódami

Identifikácia sa vykonáva pomocou absorpcie s imúnnymi sérami, monoklónovými protilátkami na základe reakcií s povrchovými lipopolysacharidovými antigénmi alebo novšími molekulárno-biologickými metódami.

Hybridizačné metódy, ktoré na základe homológie DNA-DNA určovali leptospíry, sú dnes už nahradené sekvenčnými analýzami [2].

Pre epidemiologické účely sa osvedčila typizácia leptospír pomocou metódy DNA analýz, resp. DNA fragmentov získaných štiepením restrikčnou endonukleázou (metóda BRENDA) [2]. Podobne ako táto metóda aj metóda southern blot hybridizácia a aj ribotypizácia potvrdili divergenciu molekulárnych a sérologických metód pri typizácii leptospír.

Zavedenie techník založených na sekvenovaní prispelo ku poznaniu fylogenézy a evolúcie leptospír na základe určitých charakteristík rRNA kódujúcich génov, pričom najviac sa využíva *rrs* gén.

Pulzná gélová elektroforéza (PFGE) s databázou referenčných DNA fragmentov je vhodná pre určenie veľkých fragmentov DNA a štúdium veľkých a malých replikónov genómu leptospír. Dobrá rozlišovacia schopnosť predurčuje PFGE ako doplňujúcu metódu ku sérotypizácii [2]. Vzhľadom na to, že nerozlišuje všetky sérovary leptospír, nemôže úplne nahradiť sérologickú identifikáciu.

Typizačné metódy využívajúce techniky založené na PCR zahŕňajú jednak techniky len na identifikáciu leptospír (využívajú napr. repetitívne a inzerčné elementy, fragmenty DNA po aplikácii restrinkčného enzýmu na amplifikáciu a iné) alebo na ich detekciu a aj typizáciu [2]. Murgia et al. [28] a Woo et al. [39] použili PCR cielenú na *rrs* a *rrl* sekvencie na rozlíšenie patogénnych a saprofytárnych leptospír a ďalšie štúdie boli vykonané s PCR založenou na dôkaze *rrs* sekvencií a detekcii leptospír na úrovni rodu a species [2]. PCR produkty s dôkazom leptospír v klinických vzorkách sú následne podrobené

Tabulka 2. Výhody a nevýhody diagnostických testov používaných na detekciu leptospír

Table 2. Advantages and disadvantages of the diagnostic tests for the detection of *Leptospira* spp.

Test	Výhody	Nevýhody
Mikroskopia v tmavom poli	vizualizácia leptospír	nedostatočne senzitívna a špecifická; na záchyt 1 bunky v zornom poli je nutná koncentrácia 10^4 buniek/ml
ELISA IgM	najrozšírenejšie používanie	falošná pozitivita; IgM protilátky môžu v krvi pretrvávať roky
MAT	„zlatý štandard“	nižšia citlivosť v počiatočnej fáze ochorenia; technická náročnosť kvôli udržiavaniu živých leptospír
PCR a jej modifikácie	detekcia DNA leptospír v sére a moči pacientov	finančne náročné reagencie; nemožná sérovarová identifikácia

(upravené podľa [11])
(adapted by [11])

proLékaře.cz | 3.11.2026

sekvenácii alebo ďalším metódam, napr. analýze MRSP (mapped restriction site polymorphism) alebo PCR-RFLP (restrinction fragment lenght polymorphism), PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism analysis) a PCR-LSSP (low stringency single primer). Obe posledné typizačné metódy sú schopné identifikovať sérovary, ale sú veľmi komplikované a prácne, a tak nemajú širšie použitie.

Ďalšou metódou využívajúcou PCR je MLVA (multiple-locus variable number of tandem repeats analysis). Pre vykonanie MLVA je potrebné vedieť VNTR (variabile number of tandem repeats) prítomných v genóme leptospír. Doteraz však bol sekvenovaný genóm len štyroch patogénnych kmeňov *L. interrogans* a *L. borgpetersenii*, čo limituje použitie metódy. Ukazuje sa, že metóda by bola vhodná pre epidemiologické vyšetrovania najmä v oblastiach s vysokou endemicitou nakoľko dobre rozlišuje sérovary a séroskupiny leptospír, čo je potrebné na hodnotenie cirkulácie patogénov a významu ich klonov pri vzniku epidémií.

Multilokusová sekvenčná typizácia (MLST) je genotypizačná metóda na identifikáciu pôvodu leptospír, u ktorých sa pozoruje pomerne častý horizontálny prenos DNA, a tak typizácia pomocou viacerých lokusov genómu leptospír je presnejšia. Niekoľko schém využitia viacerých lokusov rôznych génov bolo podkladom pre vytvorenie identifikačných databáz. Prvá z nich využila šesť lokusov troch génov (dva z nich kódujúce proteíny vonkajšej membrány a *rrs*) na identifikáciu všetkých patogénnych leptospír a bola podkladom databázy so sekvenciami takmer 300 kmeňov [3].

Metóda MLST sa ukazuje pre prax ako užitočný nástroj pre zachytenie diverzity kmeňov leptospír, ako aj na poznanie ich evolúcie a geografickej distribúcie. Táto metóda sa v súčasnosti javí ako najdôležitejšia metóda v genotypizácii týchto baktérií.

Počas ostatnej dekády boli analyzované sekvencie celého genómu vybraných druhov rodu *Leptospira*. Porovnávacia genomika odhalila jednak veľkú odlišnosť genómu leptospír od iných patogénnych spirochét, ale aj jeho veľkú plasticitu [2].

ZÁVER

Diagnostika leptospiróz klasickými metódami využíva najmä sérologické metódy, mikroaglutinačný test, prípadne ELISA, zriedka kultiváciu. Dôkaz špecifických protilátok a kultivačné vyšetrenie neumožňujú stanoviť diagnózu včas ešte počas akútnej fázy ochorenia, keď je manažment liečby rozhodujúci. Veľkým prínosom sú preto rýchle testy molekulárnej biológie na dôkaz DNA leptospír, najmä tie, ktoré využívajú PCR a jej modifikácie. Identifikácia leptospír je dôležitá pre epidemiologické analýzy, určenie prameňov nákazy, stanovenie rizika infekcie a následných opatrení. Identifikácia leptospír v našich podmienkach sa vykonáva fenotypovou sérotypizáciou pomocou skupinových sér a krížovými absorpčnými testami. Metódy MLST a analýza sekvencie celého genómu leptospír sa v súčasnosti javia ako najdôležitejšie metódy na genotypizáciu týchto baktérií, vyžadujú si však špecializované laboratóriá. Všetky tieto vyšetrenia sú podkladom pre precíznu surveillance leptospiróz.

LITERATÚRA

1. Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, et al. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. *PLoS One*, 2009; 4(9): e7093.
2. Ahmed A, Grobusch MP, Klatser PR, et al. Molecular Approaches in the Detection and Characterization of *Leptospira*. *J Bacteriol Parasitol*, 2012;3(2): 1–12.
3. Ahmed N, Devi SM, Valverde ML, et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2006;5: 28.
4. Azizi S, Tajbakhsh E, Hajimirzaei MR, et al. Evaluation of „white-spotted kidneys" associated with leptospirosis by polymerase chain reaction based *LipL32* gene in slaughtered cows. *J S Afr Vet Assoc*, 2012; 83(1): 69.
5. Bakoss P, Kmety E. K významu vysycovacích testov v sérotypovej diagnostike leptospírových ochorení u ľudí. *Čs. epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*, 1980; 29(3): 165–170.
6. Bakoss P, Macháčová E, Jareková J. Výsledky surveillance humánnych leptospiróz, Slovensko 1986–2005. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 2007; 56(3): 140–149.
7. Bakoss P. Leptospirózy. In: Bazovská S, et al. Špeciálna epidemiológia. Bratislava: Vydavateľstvo UK, prvé vydanie; 2007. s. 340, ISBN 978-80-223-2301-70.
8. Blacksell SD, Smythe L, Phetsouvanh R, et al. Limited diagnostic capacities of two commercial assays for the detection of Leptospira immunoglobulin M antibodies in Laos. *Clin Vaccine Immunol*, 2006;13(10): 1166–1169.
9. Boonsilp S, Thaipadungpanit J, Amornchai P, et al. Molecular detection and speciation of pathogenic *Leptospira spp. in blood from patients with culture-negative leptospirosis. BMC Infect Dis*, 2011; 11: 338.
10. Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, et al. Evaluation of polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol*, 1995;43(2): 110–114.
11. Budihal SV, Perwez K. Leptospirosis diagnosis: competancy of various laboratory tests. *J Clin Diagn Res,* 2014;8(1): 199–202.
12. Desakorn V, Wuthiekanun V, Thanachartwet V, et al. Accuracy of a commercial IgM ELISA for the diagnosis of human leptospirosis in Thailand. *Am J Trop Med Hyg*, 2012; 86(3): 524–527.
13. Effler PV, Bogard AK, Domen HY, et al. Evaluation of eight rapid screening tests for acute leptospirosis in Hawaii. *J Clin Microbiol*, 2002;40(4): 1464–1469.
14. Esfandiari B, Pourshafie MR, Gouya MM, et al. An epidemiological comparative study on diagnosis of rodent leptospirosis in Mazandaran Province, northern Iran. *Epidemiol Health*, 2015;37: e2015012.
15. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2015. Leptospirosis. Stockholm: ECDC; 2016.
16. Fearnley C, Wakeley PR, Gallego-Beltran J, et al. The development of a real-time PCR to detect pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue. *Res Vet Sci*, 2008;85(1): 8–16.
17. Honarmand HR, Abdollahpour G, Eshraghi SS. Comparison of Two ELISA Methods for the Laboratory Diagnosis of Acute Leptospirosis. *Iran J Med Sci*, 2010;35(2): 116–121.
18. Kmety E, Bakoss P. K otázke voľby antigénov do mikroaglutinačnej reakcie pri leptospirózach. *Čs. Epidemiol Mikrobiol Imunol,* 1978;27(5): 247–252.
19. Kmety E. Betrachtungen zum Problem der paradoxen Reaktion und deren Bedeutung in der Serodiagnostik einiger Leptospirosen. I. Orig., *Zbl. Bakt. Hyg*, 1957 b;170(4): 597–608.
20. Kmety E. Návrh na štandardnú metódu aglutinolyzínovej reakcie pri leptospirózach. *Čs. epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*, 1957;6(6): 372–377.
21. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, et al. Detection of pathogenic

proLékaře.cz | 3.11.2026

leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol*, 2005;54(Pt 1): 45–49.
22. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*, 2001;14(2): 296–326.
23. Levett PN. Systematics of *Leptospiraceae.* In: Adler B, et al. Leptospira and Leptospirosis. Current Topics in Microbiology and Imunology. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, Vol. 387; 2015. s. 11-20, ISBN 978-3-662-45058-1.
24. Luchini D, Meacci F, Oggioni MR, et al. Molecular detection of *Leptospira interrogans* in human tissues and environmental samples in a lethal case of leptospirosis. *Int J Legal Med*, 2008;122(3): 229–233.
25. Marvanová T, Kodym P. Laboratorní diagnostika leptospirózy. *Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie (SZU, Praha)*, 2013;22(6): 204–205.
26. Merien F, Portnoi D, Bourhy P, et al. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett*, 2005;249(1): 139–147.
27. Ministerstvo pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR. *Leptospira* spp. In: Správa o zoonózach, alimentárnych nákazách a nákazách z vody v Slovenskej republike za rok 2015. vydalo Ministerstvo pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR; 2016, s. 50-53. ISBN 978-80-89738-08-3.
28. Murgia R, Riquelme N, Baranton G, et al. Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic *Leptospira* occurring in water. *FEMS Microbiol Lett*, 1997;148: 27–34.
29. Murray GL. The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. *Vet Microbiol*, 2013;162(2–4): 305–314.
30. Ooteman MC, Vago AR, Koury MC. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *J Microbiol Methods*, 2006;65(2): 247–257.
31. Palmer SR, Soulsby L, Torgerson PR, et al. Oxford textbook of Zoonoses. New York: Oxford University Press, Inc.; 2011.
32. Perželová J, Jareková J, Špaleková M. Využitie komerčného testu ELISA na skrining akútnych leptospiróz. XX. Červenkove dni preventívnej medicíny, Tále, 27. – 29. 4. 2015, zborník abstraktov vydaný online, s. 22, ISBN 978-80-971836-8-4.
33. Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect*, 2013;43(1): 1–9.
34. Smetana J, Čermáková Z, Boštíková V, et al. Leptospiróza v České republice a možnosti laboratorní diagnostiky. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*, 2010;59(4): 159–167.
35. Smythe LD, Smith IL, Smith GA, et al. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect. Dis*, 2002; 2: 13.
36. Villumsen S, Pedersen R, Borre MB, et al. Novel TaqMan® PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: pit-falls of in silico validation. *J Microbiol Methods*, 2012;91(1): 184–190.
37. Wangroongsarb P, Yaseang S, Petkanjanapong W, et al. Applicability of Polymerase Chain Reaction to Diagnosis of Leptospirosis. *J Trop Med Parasitol*, 2005;28: 43–47.
38. WHO, ILS. Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. Malta: World Health Organization; 2003. s. 109, ISBN 92-4-154589-5.
39. Woo TH, Smythe LD, Symonds ML, et al. Rapid distinction between *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* by PCR amplification of 23S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol Lett*, 1997;150(1): 9–18.
40. Yasouri SR, Moghadam RG, Ghane M. Identification of Pathogenic and Saprophytic *Leptospira* spp. from the Rice Fields of Tonekabon Township Using PCR Technique. *Advanced Studies in Biology*, 2013;5(10): 437–445.

Do redakce došlo dne 28. 9. 2016.

Adresa pro korespondenci:

RNDr. Jana Perželová
Ústav epidemiológie
Lekárska fakulta Univerzity Komenského
Špitálska 24
813 72 Bratislava
Slovenská republika
e-mail: jana.perzelova@fmed.uniba.sk