

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Daša PODGORŠEK

**VREDNOTENJE TESTA LEPTOCHECK ZA DOKAZ
SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI LEPTOSPIRAM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Daša PODGORŠEK

**VREDNOTENJE TESTA LEPTOCHECK ZA DOKAZ SPECIFIČNIH
PROTITELES PROTI LEPTOSPIRAM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**EVALUATION OF THE LEPTOCHECK TEST FOR DETECTION OF
SPECIFIC ANTIBODIES AGAINST LEPTOSPIRES**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, in sicer v Laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroze.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je na seji dne 9. junija 2010 odobrila temo diplomske naloge in za mentorico imenovala prof. dr. Evo Ružič - Sabljic, dr. med., ter za recenzentko doc. dr. Darjo Keše, univ. dipl. biol.

Mentorica: prof. dr. Eva Ružič - Sabljic

Recenzentka: doc. dr. Darja Keše

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur Bertok, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Eva Ružič - Sabljic, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: doc. dr. Darja Keše, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Daša Podgoršek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 579.61:579.834.083.33:616.936(043)=163.6
- KG zoonoze/leptospiroza/leptospire/protitelesa/serološki testi/mikroaglutinacijski test/MAT/leptocheck test/klinična diagnostika
- AV PODGORŠEK, Daša
- SA RUŽIČ - SABLJIČ, Eva (mentorica)/KEŠE, Darja (recenzentka)
- KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2010
- IN VREDNOTENJE TESTA LEPTOCHECK ZA DOKAZ SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI LEPTOSPIRAM
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XI, 48 str., 11 pregl., 6 sl., 1 pril., 35 vir.
- IJ sl
- JI sl/en

AI Leptospiroza je najbolj razširjena zoonoza na svetu. Povzročajo jo gibljive spirohete rodu *Leptospira* s kljukasto zavrtimi konci. Poteka lahko kot subklinična okužba ali vročinska bolezen, lahko pa pride do hudih oblik bolezni z zlatenico, akutno ledvično odpovedjo in krvavitvami ter celo do smrtnega izida. Laboratorijska diagnostika leptospiroze temelji predvsem na dokazovanju specifičnih protiteles proti leptospiram, ki se pojavijo približno 7–10 dni po okužbi. Referenčni test je mikroaglutinacijski test (MAT), ki vključuje delo z živimi leptospirami in je zahteven za izvedbo. Izvajati ga morajo izkušeni in usposobljeni strokovnjaki, sicer lahko pride do napačne interpretacije rezultatov ali do laboratorijske okužbe, saj so za izvedbo potrebne žive leptospire. Poleg tega je test tudi precej drag, njegova izvedba pa dolgotrajna. V diplomskem delu smo želeli ugotoviti, ali lahko hitrejši, cenejši in za uporabo enostavnejši test Leptocheck v dnevni laboratorijski diagnostiki nadomesti referenčni MAT in ali bi ga lahko uporabili za nujno laboratorijsko diagnostiko. Z MAT in Leptocheck testom smo testirali 340 vzorcev bolnikov s sumom na leptospirozo, katerih serumski so shranjeni v Laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroze. Rezultate testov smo primerjali ter na podlagi rezultatov ugotovili, da lahko s preprostim Leptocheck testom dokažemo okužbo pri bolnikih s sumom na leptospirozo in da pri tem zgrešimo le malo bolnikov, ter da se Leptocheck test lahko uporablja za nujno diagnostiko okužbe z leptospirami, vendar je potrebno rezultate v rutinskem času potrditi z mikroaglutinacijskim testom.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 579.61:579.834.083.33:616.936(043)=163.6
- CX zoonosis/leptospirosis/*Leptospira*/antibodies/serological tests/microagglutination test/MAT/Leptocheck test/clinical diagnostics
- AU PODGORŠEK, Daša
- AA RUŽIĆ - SABLJIĆ, Eva (supervisor)/KEŠE, Darja (reviewer)
- PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2010
- TI EVALUATION OF THE LEPTOCHECK TEST FOR DETECTION OF SPECIFIC ANTIBODIES AGAINST LEPTOSPIRES
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XI, 48 p., 11 tab., 6 fig., 1 ann., 35 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Leptospirosis is a worldwide zoonosis caused by tightly coiled spirochetes with characteristic hooked ends belonging to the genus *Leptospira*. Clinical presentation in humans varies considerably, ranging from mild influenza-like illness to jaundice, renal failure, bleeding and sometimes also death. Routine diagnosis of leptospiral infection is based on demonstration of specific antibodies with serological tests. In humans, antileptospiral antibodies become detectable between the seventh and the tenth day of illness. Performance of the reference serological test, the microscopic agglutination test (MAT), requires significant expertise and is quite expensive. The aim of our study was to find out if we can prove leptospira infection with a simple Leptocheck test and if we can use it instead of reference microscopic agglutination test. With microscopic agglutination test and Leptocheck test we tested 340 samples that were isolated from patients with clinical manifestations suggestive of leptospirosis. According to our findings we conclude that with simple Leptocheck test we can prove leptospira infection, without missing many patients and that Leptocheck test should be used for emergency cases only, later the sample should be confirmed with a reference microagglutination test.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI RAZISKOVANJA	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 EPIDEMIOLOGIJA IN GEOGRAFSKA RAZŠIRJENOST LEPTOSPIROZE ...	3
2.1.1 Leptospiroza pri živalih	3
2.1.2 Leptospiroza pri ljudeh	3
2.1.3 Leptospiroza v Sloveniji in svetu	5
2.2 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI LEPTOSPIR	5
2.2.1 Sistematska klasifikacija leptospir	5
2.2.2 Morfologija leptospir	7
2.2.3 Antigenska zgradba leptospir	8
2.2.3.1 Lipopolisaharidi	8
2.2.3.2 Proteinski antigeni	8
2.2.3.3 Druge antigenske strukture	9
2.2.4 Struktura genoma leptospir	9

2.2.5	Metabolizem leptospir	10
2.2.6	Gojitev leptospir <i>in vitro</i>	10
2.3	LEPTOSPIROZA	11
2.3.1	Patogeneza in patologija	11
2.3.2	Klinična slika	12
2.3.2.1	Leptospiroza brez zlatenice.....	12
2.3.2.2	Leptospiroza z zlatenico oz. Weilov sindrom.....	13
2.4	LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA LEPTOSPIROZE	13
2.4.1	Osamitev in identifikacija	14
2.4.2	Dokaz DNA.....	14
2.4.3	Serološko dokazovanje.....	15
2.4.3.1	Za rod specifični testi.....	15
2.4.3.1.1	Indirektni hemaglutinacijski test.....	16
2.4.3.1.2	Reakcija vezave komplementa (RVK).....	16
2.4.3.1.3	Encimskoimunski test (EIT)	16
2.4.3.1.4	Leptotek dri dot test	17
2.4.3.1.5	Leptocheck	17
2.4.3.2	Za serovar specifični testi	19
2.4.3.2.1	Makroaglutinacijski test	20
2.4.3.2.2	Mikroaglutinacijski test.....	20
2.4.4	Druge metode dokazovanja leptospir	20
2.5	ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE.....	20
3	MATERIALI IN METODE	22
3.1	MATERIALI	22
3.1.1	Vzorci.....	22

3.1.2	Kulture leptospir, ki jih uporabljamo za mikroaglutinacijski test.....	22
3.1.3	Material in oprema za mikroaglutinacijski test	23
3.1.4	Material in oprema za izvedbo Leptocheck testa	23
3.2	METODE.....	24
3.2.1	Mikroaglutinacijski test	24
3.2.1.1	Kultivacija leptospir za antigen	24
3.2.1.2	Postopek testa mikroaglutinacije	24
3.2.1.3	Vrednotenje testa	25
3.2.1.4	Titracija seruma pri pozitivnih bolnikih	25
3.2.1.5	Vrednotenje testa	25
3.2.1.6	Ponovitev testa.....	25
3.2.2	Leptocheck test	26
3.2.2.1	Potek testa.....	26
3.2.2.2	Vrednotenje testa	26
4	REZULTATI	27
4.1	MIKROAGLUTINACIJSKI TEST.....	27
4.2	LEPTOCHECK TEST.....	33
4.3	PRIMERJAVA OBEH SEROLOŠKIH TESTOV – MIKROAGLUTINACIJSKEGA IN LEPTOCHECK TESTA.....	34
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	36
5.1	RAZPRAVA.....	36
5.2	SKLEPI.....	42
6	POVZETEK.....	43
7	VIRI.....	45
	PRILOGE.....	49

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Rezultati testiranja z mikroaglutinacijskim testom.....	27
Preglednica 2: Prikaz rezultatov ponovnega testiranja z mikroaglutinacijskim testom.....	28
Preglednica 3: Rezultati testiranja bolnikov s sumom na leptospirozo z mikroaglutinacijskim testom glede na delno aglutinacijo.....	28
Preglednica 4: Rezultati testiranja vzorcev seruma bolnikov z mikroaglutinacijskim testom glede na število serovarov pri delni aglutinaciji.....	29
Preglednica 5: Rezultati testiranja vzorcev seruma bolnikov z mikroaglutinacijskim testom glede na pogostost pojavljanja serovarov, pri katerih je bila delna aglutinacija ugotovljena.....	30
Preglednica 6: Rezultati ponovnega testiranja vzorcev seruma bolnikov z mikroaglutinacijskim testom glede na število serovarov pri delni aglutinaciji.....	31
Preglednica 7: Rezultati ponovnega testiranja vzorcev seruma bolnikov z mikroaglutinacijskim testom glede na pogostost pojavljanja serovarov, pri katerih smo ugotovili delno aglutinacijo.....	32
Preglednica 8: Rezultati testiranja vzorcev seruma bolnikov, dobljeni z Leptocheck testom.....	33
Preglednica 9: Rezultati testiranja vzorcev seruma bolnikov, katerih končnega rezultata ni mogoče oceniti.....	34
Preglednica 10: Primerjava rezultatov, dobljenih z mikroaglutinacijskim (MAT) in Leptocheck testom	35
Preglednica 11: Primerjava rezultatov mikroaglutinacijskega in Leptocheck testa glede na delno aglutinacijo.....	35

KAZALO SLIK

Slika 1: Življenjski cikel leptospir v naravi (Faine in sod., 1999).....	4
Slika 2: Taksonomska uvrstitev leptospir (Levett, 2003).....	6
Slika 3: Najnovejša taksonomska uvrstitev leptospir (Ružič-Sabljić, 2002).....	7
Slika 4: Morfologija leptospir (Bharti in sod., 2003).....	8
Slika 5: Leptocheck test.....	18
Slika 6: Prikaz branja rezultatov pri testu Leptocheck	19

KAZALO PRILOG

Priloga A: Rezultati testiranja vzorcev z mikroaglutinacijskim (MAT) testom in
Leptocheck testom

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. Deoxyribonucleic acid)
EMJH	gojišče za kultivacijo leptospir (Ellinghausen McCullough modificirano po Johnson in Harris)
MAT	mikroaglutinacijski test
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase chain reaction)
+	pozitiven rezultat
-	negativen rezultat
+/-	mejni rezultat
/	testiranje oz. ponovno testiranje ni bilo izvedeno

1 UVOD

Leptospiroza je zoonoza, ki jo povzročajo drobno zavite, gibljive spirohete, ki imajo značilno kljukasto zakrivljene konce. Glavni rezervoar leptospir v naravi so glodavci, predvsem podgane in poljske miši. Z leptospirami so okužene tudi številne druge vrste domačih in divjih živali po vsem svetu, ki bakterije izločajo s sečem in tako okužijo polja, travnike, stoječe in tekoče vode. Človek se okuži, ko pride v stik z okuženim okoljem in je le naključni gostitelj. Klinična slika bolezni se lahko kaže na različne načine: od subklinične okužbe, vročinske bolezni do hudih oblik z zlatenico, akutno ledvično odpovedjo in krvavitvami, lahko pa pride tudi do smrtnega izida. Leptospiroza je najbolj razširjena zoonoza na svetu, v Sloveniji pa je endemična v murskosoboški regiji. Visoka incidenca leptospiroze je značilna predvsem za poletne in jesenske mesece (Ružič - Sabljic, 2002).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

V prvi fazi bolezni so leptospire v bolnikovi krvi in likvorju in jih lahko dokažemo neposredno z osamitvijo ali prikazom v telesnih tekočinah. V drugi fazi bolezni, ko bolnik začne izdelovati specifična protitelesa, pa jih lahko dokažemo posredno s serološkimi testi. V tem obdobju bolnik izloča leptospire s sečem, od koder jih lahko tudi osamimo. Dnevna laboratorijska diagnostika temelji na posrednem serološkem dokazovanju specifičnih protiteles proti leptospiram, ki se pojavijo približno 7–10 dni po okužbi. Referenčni test za dokazovanje specifičnih protiteles pri bolnikih s sumom na leptospirozo je mikroaglutinacijski test. Test morajo izvajati izkušeni in usposobljeni strokovnjaki, sicer lahko pride do napačne interpretacije rezultatov ali do okužbe, saj so za izvedbo potrebne žive leptospire (Levett in Whittington, 1998).

1.2 CILJI RAZISKOVANJA

V diplomskem delu smo želeli ugotoviti specifična protitelesa proti antigenom leptospir pri bolnikih s sumom na leptospirozo z dvema različnima serološkima testoma, mikroaglutinacijskim testom in testom Leptocheck. Rezultate obeh testov smo ovrednotili in jih primerjali med seboj ter poskušali ugotoviti, ali bi lahko hitrejši, cenejši in za uporabo enostavnejši test Leptocheck v dnevni laboratorijski diagnostiki nadomestil

referenčni mikroaglutinacijski test in ali bi ga lahko uporabili za nujno laboratorijsko diagnostiko.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavljamo:

- da bomo z mikroaglutinacijskim testom in testom Leptocheck dokazali specifična protitelesa v serumu bolnika,
- da se rezultati obeh testov ne bodo razlikovali,
- da lahko preprostejši in hitrejši test Leptocheck v nujnih primerih nadomesti referenčni mikroaglutinacijski test.

2 PREGLED OBJAV

Klinično sliko ikterične leptospiroze z ledvično odpovedjo je prvi opisal Adolf Weil leta 1886 v Heidelbergu, čeprav naj bi enak sindrom opisali že nekaj let prej pri delavcih, ki so delali v kanalih. Po njem se še danes imenuje huda oblika leptospiroze – Weilova bolezen (Levett, 2001; Bedernjak, 1993). Inada in Ido pa sta leta 1915 prva opisala povzročitelja bolezni, ko sta leptospire in specifična protitelesa našla v krvi japonskih rudarjev, ki so zboleli za zlatenico. Neodvisno sta leptospiro opisali dve skupini nemških znanstvenikov, ki so spirohete odkrili v krvi gvinejskih prašičev, ki so jih inokulirali s krvjo obolelih nemških vojakov (Levett, 2001).

2.1 EPIDEMIOLOGIJA IN GEOGRAFSKA RAZŠIRJENOST LEPTOSPIROZE

2.1.1 Leptospiroza pri živalih

Leptospiroza je zoonoza, razširjena po vsem svetu (Radšel - Medvešček, 2002). Glavni rezervoar leptospir so glodavci, predvsem miši, podgane, ježi in voluharji. Dober pokazatelj stopnje okuženosti nekega kraja je odstotek okuženih ježev. Z leptospirami so poleg glodavcev okužene tudi domače živali, svinje, govedo, psi in mačke (Palmer, 1998).

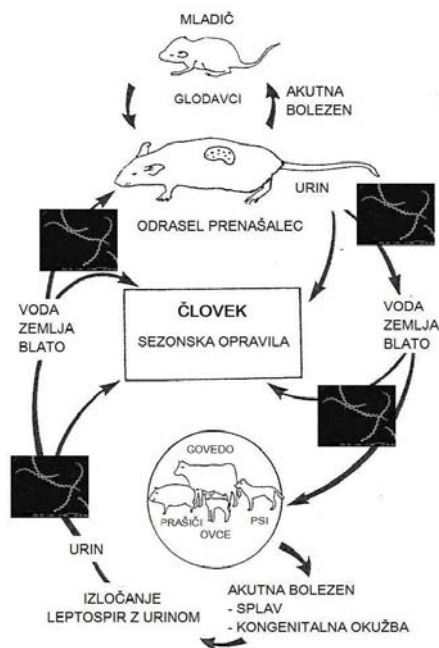
Okužene živali največkrat okužbo preživijo in redko poginejo. Leptospire lahko v okuženi živali ostanejo v ledvičnih tubulih in se izločajo s sečem v okolje, ne da bi povzročile bolezenske spremembe v ledvicah. Trajanje in stopnja leptospirurije je odvisna od gostitelja in serovara, ki je povzročil okužbo (Radšel - Medvešček, 2002). Domače živali lahko po akutni okužbi izločajo leptospire več tednov do več mesecev, glodavci pa celo več kot eno leto. Izločene leptospire preživijo v vlažni zemlji ter v nevtralnih ali rahlo alkalnih vodah več mesecev (Bedernjak, 1993).

Med domačimi živalmi na kmetijah lahko pride do cikličnega prenašanja okužbe. Okužijo se lahko že mladiči, in sicer kongenitalno ali neonatalno, ali pa preko vlažne zemlje, kjer gnezdiijo, se prehranjujejo in gibljejo (Bedernjak, 1993).

2.1.2 Leptospiroza pri ljudeh

Človek se lahko okuži neposredno s stikom z okuženo živaljo (s krvjo, sečem in organi okužene živali) ali posredno z izpostavljenostjo kontaminiranemu okolju. Humani primeri

okužb izhajajo največkrat iz posredne ali neposredne izpostavitve seču okuženih živali. Okužbe zaradi dela z okuženimi tkivi živali, ugrizov živali in uživanja kontaminirane hrane so redkejšje. Človek je končni člen v verigi okužb, prenos s človeka na človeka pa je izredno redek (Radšel - Medvešček, 2002).



Slika 1: Življenjski cikel leptospir v naravi (Faine in sod., 1999)

Leptospire običajno vdrejo v človeško telo skozi poškodovano kožo, intaktno žrelno sluznico ali očesno veznico, verjetno pa lahko prodrejo tudi skozi razmočeno kožo (Ružić - Sabljjić, 2002; Bedernjak in Bedernjak - Bajuk, 2003). V subepitelijske celice vstopijo z endocitozo, kasneje pa preidejo v krvni obtok, kjer se razmnožujejo. S krvjo se raznesejo po telesu, kjer se zadržijo predvsem v jetrih, osrednjem živčevju, skeletnih in srčni mišici, očeh in ledvicah ter povzročajo bolezenske spremembe. Bolezenski znaki se pojavijo od 2 do 20 dni po okužbi, odvisno od števila bakterij, njihove virulence in vstopnega mesta (Radšel - Medvešček, 2002).

Najbolj ogrožene so osebe, zaposlene v kmetijstvu, delavci pri kopanju jarkov, vodovodni delavci, delavci na riževih poljih, rudarji, delavci v klavnicah, veterinarji in vojaki (Ružić - Sabljjić, 2002; Radšel - Medvešček, 2002). Zbolijo osebe vseh starosti. Moški zbolijo 3-krat pogosteje od žensk, kar lahko pripišemo dejstvu, da pogosteje opravljajo fizična dela v

naravi. Zelo pogosto obolevajo otroci in mladostniki, ki se kopajo v jezerih, potokih in rekah. Ena tretjina obolenj je poklicnega izvora, dve tretjini okužb pa lahko pripišemo rekreaciji (Bedernjak, 1993).

Pomemben virulenten dejavnik na začetku okužbe predstavlja gibljivost leptospir oziroma njihova zmožnost premikanja skozi viskozen medij. Opazili so usmerjeno gibanje proti hemoglobinu in ugotovili, da okvaro žilja verjetno povzročajo različni dejavniki: endotoksini celične stene, encimi in toksini, ki se sproščajo iz razpadlih bakterij, hemolizin ... (Bharti in sod., 2003; Ružić - Sabljčić, 2002).

2.1.3 Leptospiroza v Sloveniji in svetu

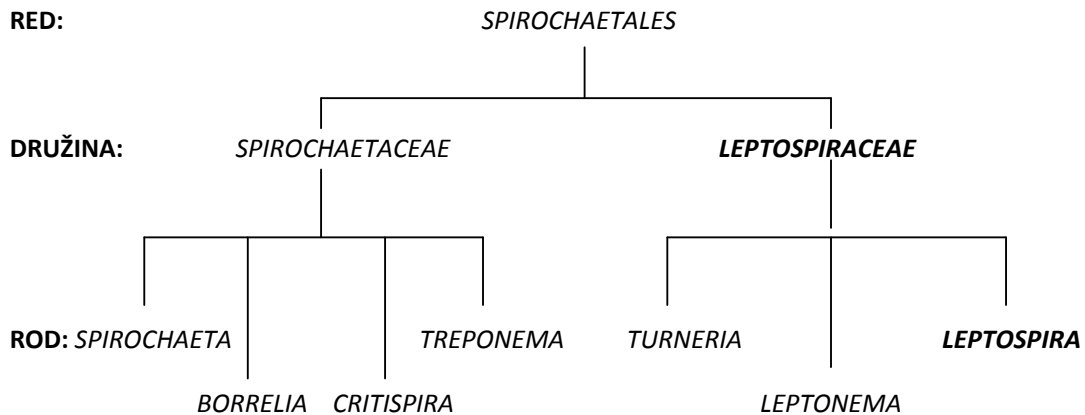
V tropskih in subtropskih predelih se okužbe z leptospirami pojavljajo skozi vse leto (Levett in Whittington, 1998), v manj toplih področjih pa se pojavljajo med toplimi in deževnimi sezonami. V Evropi je leptospiroza prisotna v Avstriji, Italiji, Španiji, Portugalski, Veliki Britaniji, Belgiji, na Nizozemskem, v Romuniji, Rusiji in v južnih predelih nordijskih držav. Bolezen je zelo pogosta tudi v Izraelu, Keniji, Rodeziji, Vietnamu, Peruju in ZDA (Bedernjak, 1993).

V Sloveniji je leptospiroza endemična v štirih pomurskih občinah, in sicer Lendavi, Ljutomeru, Gornji Radgoni in Murski Soboti (Bedernjak, 1993). V zadnjih 10 letih se število okuženih oseb giblje med 4 in 26 na leto. Najbolj izpostavljeni so delavci, ki delajo na polju in v živinoreji pa tudi kopalci. Najpogostejše so okužbe s serovarom *Grippotyphosa* (Ružić - Sabljčić, 2002).

2.2 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI LEPTOSPIR

2.2.1 Sistematska klasifikacija leptospir

Rod *Leptospira* uvrščamo v družino *Leptospiraceae*, kamor sodita še rodova *Leptonema* in *Turneria*, ter v red *Spirochaetales*, kamor je uvrščena še družina *Spirochaetales* z rodovi *Spirocheta*, *Borrelia*, *Cristispira* in *Treponema* (Levett, 2003).



Slika 2: Taksonomska uvrstitev leptospir (Levett, 2003)

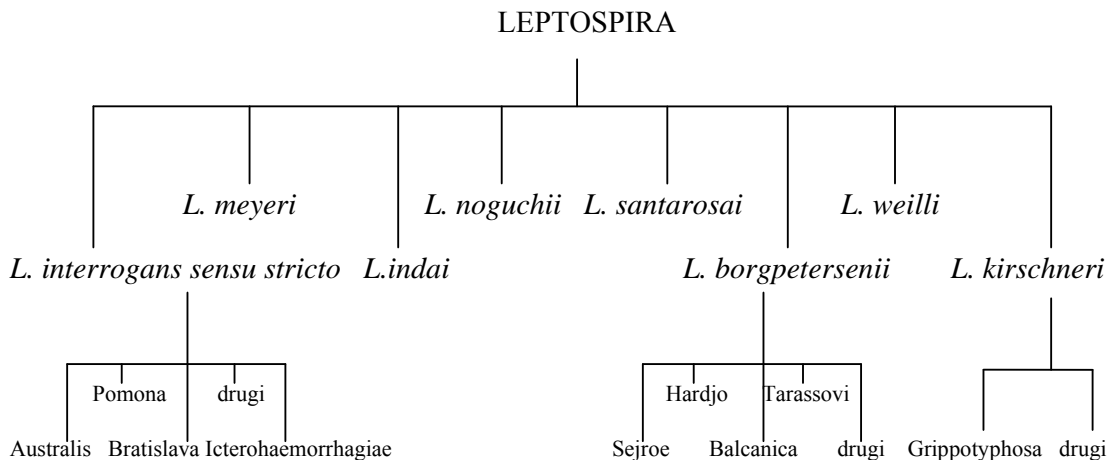
Po klasični sistematiki delimo bakterije iz rodu *Leptospira* v dve vrsti: *Leptospira biflexa* sensu lato (v širokem pomenu) in *Leptospira interrogans* sensu lato. Prva vrsta vključuje nepatogene, večinoma saprofitske bakterije, v vrsto *Leptospira interrogans* sensu lato pa sodijo bakterije, ki so patogene za ljudi in živali. V vrsto *L. interrogans* sensu lato spada 230 različnih serovarov, ki jih uvrščamo v 23 seroloških skupin (Levett, 2003). *Leptospira biflexa* sensu lato vsebuje 65 različnih serovarov, ki so razporejeni v 38 seroloških skupin (Fabrice, 1997).

Klasična klasifikacija razvršča leptospire v serološke skupine in serovare glede na njihove antigenske lastnosti (Fabrice, 1997). Dva seva pripadata različnima serovaroma, če po navzkrižni absorpciji s primernimi količinami heterolognih antigenov ostane v ponovljenih testih 10 % ali več homolognega titra v najmanj enem od dveh serumov (Bedernjak, 2003). Osnovna taksonomska enota leptospir je serovar (Postic, 2000).

Na molekularnem nivoju pa oznaki serovar in serološka skupina nista točni. V serološki diagnostiki se sicer še vedno uporabljata, saj pojasnujeta povezavo med serovari in živalskim rezervoarjem ter razlike v zemljepisnem pojavljanju posameznih vrst (Radšel - Medvešček, 2002).

Leptospire lahko ustrezno razvrstimo v posamezne vrste le z analizo molekule DNK. Po najnovejši taksonomiji uvrščamo humanopatogene leptospire v 8 vrst: 1. *L. interrogans* sensu stricto (v ozkem pomenu), ki ji pripadajo serovari: Australis, Bratislava,

Icterohaemorrhagiae, Pomona in drugi, 2. *L. borgpetersenii*, ki ji pripadajo serovari: Sejroe, Balcanica, Hardjo, Tarassovi in drugi, 3. *L. kirschneri*, ki ji pripada serovar Grippytyphosa in drugi, 4. *L. indai*, 5. *L. meyeri*, 6. *L. noguchii*, 7. *L. santarosai* in 8. *L. weilli*. Vrste *L. interrogans* sensu stricto, *L. borgpetersenii* in *L. kirschneri* povzročajo vsaj dve tretjini vseh humanih leptospiroz (Ružič - Sabljčić, 2002).



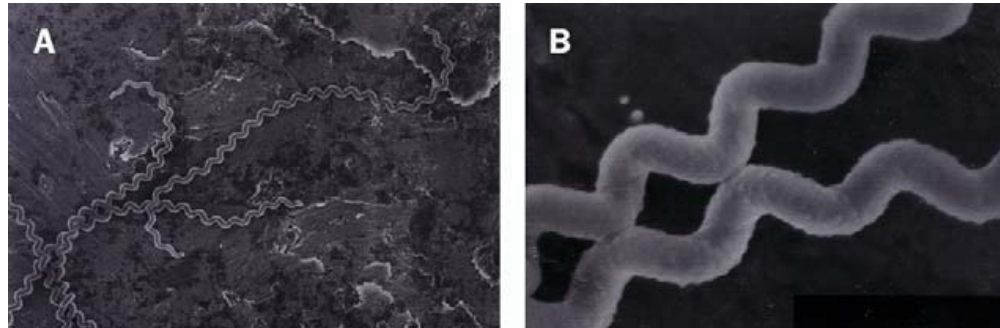
Slika 3: Najnovejša taksonomska uvrstitev leptospir (Ružič-Sabljić, 2002)

Nepatogene leptospire lahko ločimo od patogenih po tem, da nepatogene ne morejo okužiti laboratorijskih živali, medtem ko jih patogene lahko. Ne moremo pa jih ločiti po obliki. Nepatogene leptospire spadajo v vrsto *L. biflexa* sensu lato in so saprofiti. Za saprofitske leptospire je značilna odpornost na zaviralce rasti, kot so bakrovi ioni, anilinska barvila in 8 – azogvanin, rastejo pa tudi pri nižjih temperaturah. Pri razlikovanju med patogenimi in nepatogenimi leptospirami so sicer poglavitne serološke in genetske značilnosti (Bedernjak, 2003).

2.2.2 Morfologija leptospir

Bakterije iz rodu *Leptospira* so tanke, upogljive, vijačno zvite spirohete, dolge od 6 do 20 μm in široke od 0,1 do 0,2 μm . Njihovi konci so pogosto zviti navznoter. Gibljejo se z upogibanjem v smeri vzdolžne osi, s pomočjo dveh bičkov, ki se v periplazemskem prostoru ovijata okoli bakterije. Imajo jedro, citoplazmo, citoplazemsko membrano in zunanji ovoj. Celična stena vsebuje velik delež lipidov in je podobna steni po Gramu negativnih bakterij, vendar pa se leptospire po Gramu in Giemsi slabo obarvajo. Kot rutinska metoda za opazovanje leptospir se zato uporablja mikroskopiranje v temnem

polju. Leptospire so aerobne bakterije. Najdemo jih v površinskih vodah, blatu in vlažni zemlji, kjer lahko preživijo več mesecev. Najbolj uspevajo v vlažnem, toplem okolju z rahlo alkalnim pH-jem (Radšel - Medvešček, 2002; Ružič - Sabljic, 2002; Levett, 2003).



Slika 4: Morfologija leptospir (Bharti in sod., 2003)

2.2.3 Antigenska zgradba leptospir

Leptospire so antigensko zelo heterogene. Njihova površinska struktura se razlikuje glede na to, ali se bakterija nahaja v gostitelju ali v gojišču. Najpomembnejše antigenske strukture pri večini leptospir so ogljikovi hidrati in ne proteini (Levett, 2003).

2.2.3.1 Lipopolisaharidi

Lipopolisaharidni epitopi so eden izmed glavnih antigenov, s katerim reagirajo humani imunoglobulini, ki so odgovorni za opsonizacijo, fagocitozo in imunost. Lipopolisaharidi tako predstavljajo temelj za serološko diagnostiko, ki temelji na aglutinacijski sposobnosti leptospir. Sestavljeni so iz ogljikovih hidratov (54 %), lipidov (12 %), proteinov (5 %) in sladkorjev (arabinoza, ksiloza, ramnoza in drugi) (Isogai in sod., 1986).

2.2.3.2 Proteinski antigeni

V zunanji membrani leptospir so pomembne predvsem tri skupine beljakovin:

- OmpL1 je prva opisana beljakovina zunanje membrane. Je površinska beljakovina v zunanji membrani patogenih leptospir, velik 31 kDa.
- Lipoproteini so na membrano pripeti z maščobnimi kislinami, in sicer na amino konec cisteina. Zunanjo membrano sestavlja najmanj pet različnih lipoproteinov.

Opisani so tudi trije geni (LipL32, LipL36 in LipL41), ki kodirajo gradnike zunanje membrane. Haake in Matsuga (2002) ter Diament in sod. (2002) so ugotovili, da je LipL32 najvažnejši proteinski antigen pri patogenezi humane leptospiroze.

- Periplazemske membranske beljakovine

Med periplazemske membranske beljakovine spada beljakovina P31, ki se pod vplivom uree sprosti iz membrane.

2.2.3.3 Druge antigenske strukture

Pod površino bakterije so nameščene stresne beljakovine. Za laboratorijske živali so citotoksični in letalni glikoproteini, ki vsebujejo velik delež toksičnih lipidov. Diament in sod. (2002) so dokazali, da lahko glikoproteini inducirajo aktivnost monocitov in limfocitov tako in vitro kot ex vivo. Citotoksičen je tudi peptidoglikan leptospir (Masuzawa in sod., 1990). V potek patogeneze so lahko vpleteni tudi drugi toksični dejavniki, vendar pa njihova vloga še ni dokazana (Diament in sod., 2002).

2.2.4 Struktura genoma leptospir

Velikost genoma in organizacijo DNK leptospir so preučevali s pulzno elektroforezo, ki je visoko občutljiva metoda za ločevanje dolgih odsekov nukleinskih kislin (Baril in Saint Girons, 1990).

Genom leptospir je velik približno 5000 kb. Sestavljata ga dve krožni molekuli DNK oz. dva kromosoma – večji kromosom velikosti 4400 do 4600 kb in manjši velikosti 350 kb. Delež gvanina in citozina v DNK molekuli leptospir se giblje med 35 in 41 % in je odvisen od vrste leptospir. Znotraj vrste *L. interrogans* sensu stricto so ugotovili precejšnjo heterogenost in variabilnost, ki se kaže kot sprememba večjih segmentov kromosoma (Faine in sod., 1999; Zuerner in sod., 2001).

Genom Leptospir ima nenavadno razporejene gene rRNA. Pri večini bakterij geni za 5S (rrf) RNA, 16S RNA (rrs) in 23S RNA (rrl) ležijo skupaj in so tako tudi istočasno prepisani. Pri leptospirah pa so geni za rRNA razporejeni po kromosomu in niso prisotni v enakem številu. Genom *L. interrogans* sensu lato ima dvojno kopijo gena za 16S in 23S in le enojno kopijo gena za 5S, ki je zelo ohranjena. Dva gena za 5S rRNA so našli le pri *L. biflexa* sensu stricto. Vsak serovar leptospir ima značilen vzorec restrikcije. Ugotovili so,

da pri elektroforezi obstajajo razlike pri potovanju razrezanih odsekov DNK med patogenimi in saprofitskimi vrstami leptospir (Zuerner in sod., 2001).

Odkrili so tudi prisotnost številnih ponavljajočih se elementov DNK, ki so prisotni v več kopijah in razporejeni po celotnem genomu. Insercijske sekvence, ki so jih našli pri *Leptospira* spp., spadajo v družino IS3, IS5 in IS110. Prehajajo lahko z enega mesta kromosoma na drugo in tako prispevajo k spremembam genoma in genski heterogenosti (Zuerner in sod., 2001).

2.2.5 Metabolizem leptospir

Leptospire so aerobne bakterije, iz katerih so izolirali katalaze, oksidaze in citokrome a, c ter c1. Kot glavni vir dušika uporabljajo amonijeve soli in ureo, niso pa sposobne pridobivanja dušika iz aminokislin (Levett, 2003). Glavni vir ogljika in energije so maščobne kisline, ki pa jih ne morejo sintetizirati po poti de novo (Cacciapouti in sod., 1990). Leptospire nimajo sposobnosti sinteze dolgoveržnih maščobnih kislin iz piruvata ali acetata, temveč jih metabolizirajo preko β -oksidacije. Sintetizirajo lahko samo kratke verige maščobnih kislin. Značilna komponenta leptospir je cis-11-heksadecenojska kislina, ki jo redko najdemo pri drugih bakterijah (Levett, 2003).

2.2.6 Gojitev leptospir *in vitro*

Za gojenje leptospir se uporablja posebno tekoče gojišče z dodanim govejim ali zajčjim serumom, vitaminom B12, včasih pa je dodan tudi pufer (Levett, 2003). Za izolacijo leptospir se uporablja Korthofovo gojišče, ki vsebuje zajčji serum, lahko pa uporabimo tudi EMJH (Ellinghausen McCullough modificirano Johnson in Harris) gojišče z dodanima oleinsko kislino in govejim serumskim albuminom (Babudieri, 1961). Leptospire rastejo zelo počasi, inkubacija traja 6 do 14 dni, lahko pa tudi več kot 4 tedne, odvisno od gojišča. Optimalna temperatura inkubacije je 28–30 °C, optimalen pH pa je med 7,2 in 7,6. Tolerirajo alkalne pogoje do pH 8,4, medtem ko v kislem okolju (pH < 6,5) ne preživijo (Faine in sod., 1999; Levett, 2007).

Leptospire potrebujejo stalen vir kisika, kot izvor energije in ogljika pa uporabljajo dolgoveržne maščobne kisline in ne aminokislin ali ogljikovih hidratov. Vir dušika

predstavljajo amonijeve soli in urea (Bedernjak in Bedernjak - Bajuk, 2003; Faine in sod., 1999; Levett, 2007).

Nepatogene leptospire so sposobne sinteze pirimidinov in purinov, medtem ko patogene leptospire same sintetizirajo le purine in potrebujejo zunanji vir pirimidinov (Levett, 2003).

Za rast potrebujejo leptospire tudi tiamin, vitamin B12, železove ione ali hem, cianokobalamin, kalcijeve in magnezijeve ione, fosfate in sulfate ter sledi manganovih in bakrovih ionov (Levett, 2003).

Pri razlikovanju med patogenimi in nepatogenimi leptospirami nam pomaga tudi temperatura rasti. Minimalna temperatura za rast patogenih leptospir je 13–15 °C, medtem ko nepatogene, saprofitske, v naravi prosto živeče leptospire rastejo pri temperaturi 5–10 °C (Brown in Levett, 1997).

2.3 LEPTOSPIROZA

2.3.1 Patogeneza in patologija

Leptospire z endocitozo aktivno prodirajo v kožo ali sluznico. Od tu prodrejo v krvni obtok, se v krvi razmnožujejo in po nekaj dneh povzročijo splošne simptome bakteriemije. S krvjo se raznašajo po vsem telesu v različne organe (Radšel - Medvešček, 2002).

Pojav protiteles ustavi razmnoževanje leptospir. To se navadno zgodi 3 do 10 dni po vdoru bakterij v telo (Radšel - Medvešček, 2002). Protitelesa so uperjena predvsem proti vrstno specifičnim lipopolisaharidnim epitopom (Isogai in sod., 1986). Leptospir po pojavu protiteles ne moremo več dokazati v krvi, še vedno pa so lahko prisotne v posameznih organih, kjer se zadržijo različno dolgo. Kroničnega klicenoštva pri ljudeh zaradi zdravljenja z antibiotiki ni, leptospirurija pa običajno traja 2 do 4 tedne (Bedernjak, 1993; Radšel - Medvešček, 2002).

Glede na patogenezo bi lahko leptospirozo uvrstili v skupino bolezni z difuzno okvaro ožilja. Največje patološke spremembe se pojavijo na epitelu žil difuzno po vsem telesu. Okvare verjetno povzročajo različni dejavniki: endotoksin celične stene, encimi, toksini, ki

se sproščajo iz liziranih leptospir, hemolizin, ki ga tvorijo leptospire, in lipidi celične stene (Isogai in sod., 1986; Ružič - Sabljic, 2002).

Pri leptospirozi je najbolj izražena nagnjenost h krvavitvam, ki so lahko lokalne ali pa razširjene v več organov in so posledica močno razširjenih okvar kapilarnega endotelija. Zaradi krvavitev v vitalne organe ali zaradi njihove obsežnosti lahko pride tudi do smrti. V številnih organih pa se lahko pojavijo žariščne krvavitve, ki privedejo tudi do odpovedi funkcije različnih organov (Radšel - Medvešček, 2002; Sinkovič, 1996).

Zaradi leptospiroze lahko pride do ledvične odpovedi, ki je posledica poškodb tubulov in nekroze tubularno endotelijskih celic. V hudih primerih se lahko kot rezultat dehidracije in krvavitev pojavita hipovolemija in hipotenzija. Poškodbe pljuč so posledica krvavitev v pljuča. Leptospiroza se pogosto kaže z meningitisom v klinični in subklinični obliki. Pogoste so še krvavitve očesa, bolečine v mišicah, motnje srca zaradi krvavitev ter prizadetost centralnega živčnega sistema (Bedernjak, 1993).

2.3.2 Klinična slika

Klinična slika leptospiroze je zelo pestra in spremenljiva (Bedernjak, 1993; Smits in sod., 1999). Najbolj je izražena nagnjenost h krvavitvam, ki so lahko lokalne ali razširjene v več organov in so posledica močno razširjenih okvar kapilarnega endotelja. Pri približno 90 % bolnikov okužba poteka kot sistemska bolezen, ki se pozdravi spontano. Lahko pa pride do težjega kliničnega poteka z zlatenico, akutno ledvično odpovedjo, krvavitvami in večorgansko odpovedjo – Weilov sindrom (Pal in Prelog, 2003; Radšel - Medvešček, 2002; Ružič - Sabljic, 2002). Klinična slika bolezni ni odvisna od serovara – vsak serovar lahko povzroči tako lažjo kot težjo obliko bolezni (Bedernjak in Bedernjak - Bajuk, 2003).

Bolezen poteka v dveh fazah, akutni ali septični in imunski fazi. Septična faza bolezni traja približno teden dni, sledi ji imunska faza, v kateri pride do tvorbe protiteles in izločanja bakterij z urinom (Levett, 2007).

2.3.2.1 Leptospiroza brez zlatenice

Ta oblika se razvije v 85–90 % primerov leptospiroze. Okužba navadno poteka subklinično kot kratkotrajno vročinsko stanje. Prva septična faza bolezni se začne nenadno, z vročino,

mrzlico, glavobolom in bolečinami v mišicah in trebuhu. Ti simptomi trajajo od 4 do 7 dni (Levett, 2001). V tej fazi so bakterije prisotne v krvi in likvorju. Po pojavu aglutinizirajočih protiteles IgM leptospire izginejo iz krvi in likvorja. Začne se druga, imunska faza, ki traja od 4 do 30 dni. Humoralni imunski odziv bolnika je usmerjen na epitope stranskih verig lipopolisaharidov, ki spodbujajo tvorbo protiteles IgM in kasneje IgG (Radšel - Medvešček, 2002). Za to obdobje je značilen serozni meningitis, pojavljajo se lahko tudi konjunktivalne sufuzije s krvavitvami ali brez njih, fotofobija, otrdelost mišic, bolečine v očeh, adenopatija in hepatosplenomegalija (Radšel - Medvešček, 2002). Po pojavu protiteles leptospire sicer izginejo iz krvi in likvorja, različno dolgo pa se še lahko zadržijo v posameznih organih, zaradi česar lahko pride do kasnejših zapletov (Levett, 2007). Izločanje leptospir s sečem traja pri človeku, ki ni bil zdravljen z antibiotikom, običajno od 2 do 4 tedne (Bedernjak, 1993).

2.3.2.2 Leptospiroza z zlatenico oz. Weilov sindrom

Ikterična leptospiroza je hujša oblika bolezni z zelo hitrim potekom, kjer septična in imunska faza nista ločeni. Bolezen poteka zelo različno – poleg splošnih znakov in simptomov, značilnih za neikterično obliko, so za Weilovo bolezen značilni še znaki jetrne odpovedi, akutne ledvične odpovedi, hemoragičnega pnevmonitisa in srčnih aritmij (Bedernjak, 1993; Radšel - Medvešček, 2002). Možne so še krvavitve v možganih, nadledvični žlezi in srcu, ki so lahko za človeka usodne. Zaradi hudih krvavitev v pljuča lahko nastopi dihalna stiska. Ta oblika bolezni ima najvišjo smrtnost. Smrt lahko nastopi tudi zaradi obsežnih krvavitev v druge organe (Bedernjak in Bedernjak - Bajuk, 2003). Smrtnost zaradi Weilove bolezni je še vedno velika, in sicer od 5 do 40 % (Radšel - Medvešček, 2002).

2.4 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA LEPTOSPIROZE

Pri diagnostiki leptospiroze nam je velikokrat v pomoč epidemiološka anamneza, in sicer: poznavanje razširjenosti leptospir in možnost izpostavitve bolnika okužbi (Ružič - Sabljic, 2002). Na leptospirozo je potrebno pomisliti pri bolnikih s hudimi glavoboli, bolečinami v mišicah, vročino in pri ljudeh, ki so poklicno ali rekreacijsko izpostavljeni leptospiram

(Radšel - Medvešček, 2002). Tudi aseptični meningitis lahko pomeni okužbo z leptospirami (Palmer, 1988).

S pomočjo epidemioloških podatkov lahko ob zgodnjih kliničnih znakih in simptomih bolezni izključimo druge bolezni, ki potekajo z vročino, kot so: malarija, tifus, toksični šok, rumena mrzlica, bruceloza, akutna vnetja trebušnih organov itn. (Sinkovič in sod., 1996; Levett in Whittington, 1998).

Humano leptospirozo dokažemo z izolacijo bakterije iz telesnih tekočin, z dokazom zvišanja titra specifičnih protiteles v serumu ali z dokazom DNK leptospir (Adler in sod., 1980; Levett, 2003; Levett, 2007).

2.4.1 Osamitev in identifikacija

Vzorci za osamitev leptospir odvezamo pred antibiotičnim zdravljenjem in jih kultiviramo v Korthofovem gojišču. Ustrezna vzorca v prvi fazi bolezni sta kri in likvor, v drugi fazi bolezni pa lahko leptospire izoliramo iz bolnikovega seča (Ružič - Sabljic, 2002). Kužnino v ustrezno gojišče cepimo že ob bolniku ter cepljeno kulturo nato inkubiramo vsaj 6 tednov pri 28 °C. Pomembno je, da cepimo čim več vzorcev iste kužnine. Enkrat tedensko je potrebno kapljico kulture pregledati z mikroskopiranjem v temnem polju (Postic in sod., 2000).

Osamitev leptospir se zaradi nekaterih pomanjkljivosti, kot so zahtevnost, nizka občutljivost in časovna zamudnost, le redko uporablja v klinični diagnostiki, pomembno vlogo pa igra pri epidemioloških študijah. Osamljeni sevi leptospir iz kliničnih vzorcev so ključni pri potrditvi okužbe (Wuthiekanun in sod, 2007).

2.4.2 Dokaz DNA

Za dokazovanje leptospirine DNK najpogosteje uporabljamo verižno reakcijo s polimerazo, ki ima pomembno vlogo zlasti pri zgodnjem odkrivanju leptospiroze, pred pojavom protiteles (Ooteman in sod., 2006; Levett, 2007). Hitra diagnoza ima za zdravljenje leptospiroze velik pomen, saj je zdravljenje z antibiotiki na začetku bolezni uspešnejše (Levett, 2007). Metoda je visoko občutljiva in specifična. DNA leptospir lahko izoliramo iz različnih kužnin, kot so: serum, urin, likvor in tkiva (Levett in sod., 2005;

Smythe in sod., 2002). Slabosti metode PCR so visoka cena in zahtevnost metode ter njena slaba dostopnost v številnih državah, kjer je leptospiroza endemična (Levett, 2007; Plank in Dean, 2000).

2.4.3 Serološko dokazovanje

V vsakdanji klinični praksi se za dokazovanje leptospiroze običajno uporabljajo serološke metode. Primerni kužnini za serološko diagnostiko sta nativna kri in serum. Protitelesa se v serumu in krvi bolnika pričnejo pojavljati šele 7 do 10 dni po pojavu simptomov, zato je za serološko diagnostiko priporočljiv odvzem parnih serumov v razmiku od 10 do 14 dni, saj na ta način ovržemo možnost, da so dokazana specifična protitelesa posledica stare okužbe (Levett, 2007; Pal in Prelog, 2003). Nivo protiteles narašča do konca tretjega tedna bolezni, nato začne padati (Babudieri, 1961; Levett, 2007). Protitelesa so lahko v telesnih tekočinah prisotna tudi več let po okužbi. Tako kot pri vseh imunskih odzivih pride tudi tu do tvorbe protiteles razredov IgM in IgG (Levett, 2003).

Protitelesa, ki se pojavijo po okužbi, so specifična za serovar leptospir, ki je okužbo povzročil, zato je pomembno, da poznamo najpogostejše serovare na določenem geografskem področju in jih vključimo v test mikroaglutinacije z živimi leptospirami (Ružič - Sabljic, 2002).

Testi, ki se uporabljajo za določevanje protiteles proti leptospirnim antigenom v serumu bolnika, so lahko specifični za rod ali za posamezni serovar (Palmer, 1988).

2.4.3.1 Za rod specifični testi

Za rod specifični testi so pozitivni ne glede na to, kateri serovar je okužbo povzročil, saj vsebujejo veliko število antigenov, ki so skupni mnogim leptospiram.

Med za rod specifične teste spadajo:

- indirektni hemaglutinacijski test (IHA)
- reakcija vezave komplementa (RKV)
- encimsko imunski test (EIT)

- lateks test (Leptotek dri dot)
- Leptocheck

2.4.3.1.1 Indirektni hemaglutinacijski test

Pri indirektni hemaglutinaciji se uporabljajo človeški eritrociti skupine 0, ki so senzibilizirani s specifičnimi antigeni *L. biflexa* sensu lato, sev Patoc I. Če so v bolnikovem serumu prisotna protitelesa, pride do aglutinacije eritrocitov, rezultat testa je pozitiven. Kadar pa v bolnikovem serumu ni protiteles, se eritrociti zberejo na dnu epruvete, kjer pride do nastanka eritrocitnega gumba. V tem primeru je rezultat testa negativen. Z indirektno hemaglutinacijo dokazujemo celokupna protitelesa in ne protiteles posameznega razreda (Avšič - Županc, 1998).

2.4.3.1.2 Reakcija vezave komplementa (RVK)

Za izvedbo RVK potrebujemo dva ločena sistema. Prvi, indikatorski sistem sestavljajo ovčji eritrociti, kunčja protitelesa (IgG) proti ovčjim eritrocitom (hemolizin) in komplement. Drugi, testni sistem sestavljata serum, v katerem ugotavljamo prisotnost protiteles in bakterijski antigen. V prvi fazi reagirajo bakterijski antigen, specifična serumska protitelesa in komplement. Kadar v preiskovanem serumu ni specifičnih protiteles, ostane komplement nevezan, zato se v drugi fazi, ko dodamo indikatorski sistem, aktivira ob vezavi z imunskim kompleksom hemolizina in ovčjih eritrocitov. Kadar pa so v serumu protitelesa, se komplement porabi v prvem delu testa, eritrociti ostanejo nepoškodovani in se sesedejo na dno mešanice v obliki eritrocitnega gumba. Z RVK ne moremo dokazati posameznih razredov protiteles, temveč dokažemo celokupna protitelesa. Ta test se uporablja predvsem za ugotavljanje imunskega stanja bolnika (Avšič - Županc, 1998).

2.4.3.1.3 Encimskoimunski test (EIT)

Pri encimskoimunskem testu izbrani bakterijski antigen vežemo na trden nosilec, ki je po navadi mikrotitrna ploščica z vdolbinicami, nato pa dodamo bolnikov serum. Po končani inkubaciji speremo nevezana protitelesa in na nastale komplekse antigen – protitelo vežemo sekundarna protitelesa, ki so označena z encimom (alkalna fosfataza ali hrenova

peroksidaza). Sledi spiranje nevezanih sekundarnih protiteles z raztopino za spiranje. Po spiranju dodamo substrat (npr. paranitrofenilfosfat), ki zaradi delovanja encima spremeni barvo. Iz količine razgrajenega substrata sklepamo na količino protiteles v primarnem imunskem kompleksu. Intenzivnost barve, ki je sorazmerna količini protiteles v serumu, merimo spektrofotometrično. S tem testom lahko poleg protiteles IgG dokaj hitro in zanesljivo določimo tudi protitelesa IgM, ki so zelo pomemben pokazatelj akutne okužbe (Avšič - Županc, 1998; Adler in sod., 1980).

Slabost testa je, da obstaja možnost lažno negativnih rezultatov, saj je v testu zajet le en sev, navadno je to Patoc I, ki včasih ne veže vseh specifičnih protiteles, ki nastanejo pri okužbi z drugimi serovari (Winslow in sod., 1997).

Dokaz specifičnih protiteles IgM lahko ovira tudi revmatoidni faktor v serumu bolnika, ki največkrat sodi v razred protiteles IgM. Posledica tega so bodisi lažno negativni ali lažno pozitivni rezultati. Zato je vzorce seruma potrebno predhodno obdelati z absorbensom za revmatoidni faktor (Avšič - Županc, 1998).

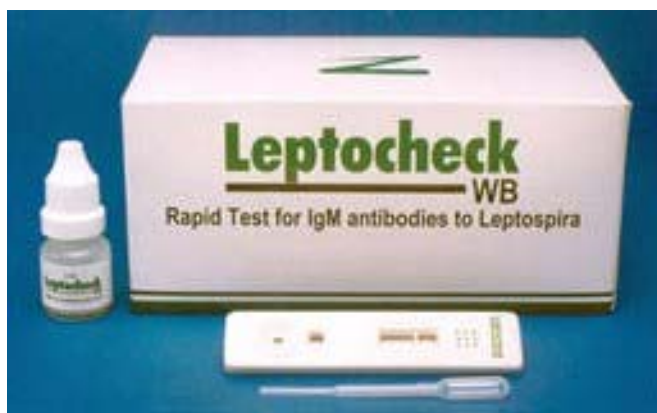
2.4.3.1.4 Leptotek dri dot test

Leptotek je preprost aglutinacijski test za detekcijo specifičnih celokupnih protiteles proti leptospirininim antigenom v človeškem serumu. Test je sestavljen iz testnega lističa s pritrjenimi modrimi lateksnimi delčki, na katere je vezan leptospirin antigen, sev Patoc I. Test temelji na vezavi specifičnih protiteles proti leptospirininim antigenom v serumu bolnika na antigene leptospir. Rezultat je granularna aglutinacija, ki je vidna s prostim očesom. Kapljico seruma pustimo na testnih lističih 30 sekund. Če v serumu bolnika ni prisotnih specifičnih protiteles, ostane modra suspenzija homogena (Smits in sod., 1999; Smits in sod., 2000).

2.4.3.1.5 Leptocheck

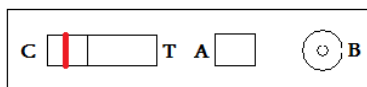
Leptocheck je kvalitativen, hitri, imunokromatografski test. Z njim dokazujemo protitelesa IgM, ki so usmerjena proti leptospirininim antigenom. Gre za kvalitativen test, ki temelji na uporabi imunokromatografije. Test poteka na membrani, ki je vgrajena v plastično ploščico. Vzorec, ki ga želimo testirati (kri ali serum), nanese na membrano in dodamo

pufer, ki omogoča potovanje vzorca po membrani. Protitelesa IgM iz preiskovanega vzorca (če je ta pozitiven) reagirajo s konjugatom, ki ga sestavljajo s koloidnim zlatom označena zajčja protitelesa IgG proti človeškim protitelesom IgM. Nastane imunski kompleks, ki se premika naprej po membrani do testnega okenca T, kjer se veže z za rod specifičnimi leptospirnimi antigeni, vezanimi na membrano. Ob vezavi na antigene nastane rdečevijolično obarvana črtica, kar pomeni pozitiven rezultat. Če te črtice ni, je rezultat negativen. Če v serumu bolnika ni protiteles IgM, potujejo zajčja protitelesa neovirano naprej po membrani in se v kontrolnem okencu C vežejo s protitelesi proti zajčjim protitelesom IgG, ki so vezana na membrani. Nastanejo rdečevijolično obarvani kompleksi, ki se kažejo kot rdečevijolična črtica v okencu C. Kontrolna črtica služi za potrditev veljavnosti testa.

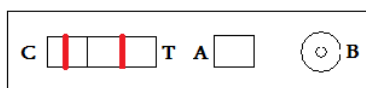


Slika 5: Leptocheck test

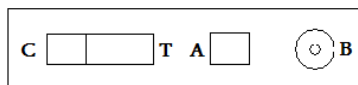
Pozitiven rezultat



Negativen rezultat



Neveljaven rezultat



Slika 6: Prikaz branja rezultatov pri testu Leptocheck

C = kontrolno okence, T = testno okence, A = okence za nanos vzorca, B = okence za nanos pufra

2.4.3.2 Za serovar specifični testi

Za serovar specifične teste je značilno, da protitelesa iz seruma bolnikov reagirajo le s serovari iste serološke skupine, ki je povzročila okužbo. Ti testi so serološko specifični, mednje pa prištevamo aglutinacijske teste:

- makroaglutinacijski test z mrtvimi leptospirami
- mikroaglutinacijski test z živimi leptospirami

2.4.3.2.1 Makroaglutinacijski test

Za izvedbo testa se uporabljajo mrtve leptospire, inaktivirane s formalinom. Rezultate odčitamo s prostim očesom, zaradi česar je ta metoda tudi manj občutljiva od mikroaglutinacijskega testa. Nižji so tudi aglutinacijski titri. S tem testom določamo skupna protitelesa (Palmer, 1998).

2.4.3.2.2 Mikroaglutinacijski test

Serum bolnika inkubiramo s posameznimi serovari sveže kulture leptospir. Serovare izberemo glede na epidemiološko sliko določenega geografskega področja (Bedernjak, 1993). Po inkubaciji mikroskopiramo kapljico suspenzije. Če so v serumu bolnika prisotna protitelesa, pride do aglutinacije leptospir, lahko tudi do lize, v temnem polju pa vidimo skupke leptospir. S tem testom določamo celokupna protitelesa (Ružič - Sabljč, 2002).

Serum bolnika se rutinsko testira na 8 serovarov, ki so na določenem geografskem področju najbolj pogosti. V primeru, da serum bolnika aglutinira le sev serološke skupine Semarang serovar Patoc, ki ga obravnavamo kot rod specifičnega, pomeni, da pri bolniku obstajajo nekakšna protitelesa in je potrebno, da serum bolnika testiramo še na naslednjih 7 serovarov leptospir (Radšel - Medvešček, 2002). Če v test ne vključimo ustreznega serovara leptospir, lahko pride do lažno negativnega rezultata.

2.4.4 Druge metode dokazovanja leptospir

Poleg zgoraj naštetih metod lahko za dokaz leptospiroze uporabimo še direktno preiskavo v temnem polju z imunofluorescenco ali s svetlobnim mikroskopom po ustreznem barvanju (Levett, 2007). Preparate lahko obarvamo s karbolfuksinom, po Giemsi ali z metodo srebrnenja. Leptospirozo lahko dokažemo tudi z biološkim poizkusom na budrah (Bedernjak in Bedernjak - Bajuk, 2003). Saengjaruk in sod. (2002) so razvili test, ki omogoča detekcijo antigena leptospir v urinu s pomočjo protiteles.

2.5 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE

Leptospire so zelo občutljive za penicilin in tetracikline. Za zdravljenje se uporablja kristalni penicilin v odmerku 2 milijona i.e. Omenjeni antibiotik se daje intravenozno, 7

dni, na štiri ure (Levett, 2003). Raziskave so pokazale, da je intravenozno zdravljenje s penicilinom učinkovito tudi pri hudih in poznih oblikah bolezni, z amoksicilinom in tetraciklini pa zdravimo srednje hude in lažje oblike bolezni (Radšel - Medvešček, 2002).

Bolnike, ki so alergični na peniciline, se zdravi s tetraciklini. Tako dosežemo znižanje telesne temperature, izboljšanje splošnega počutja in preprečimo nastanek meningitisa. Pri odpovedi ledvic, krvavitvah in zlatenici je zelo pomembno nadomeščanje tekočine in elektrolitov (Bedernjak, 1993).

Pri leptospirozi je zgodnje antibiotično zdravljenje zelo pomembno in igra bistveno vlogo pri ozdravitvi. Zato moramo začeti z zdravljenjem pri vsakem utemeljenem sumu na leptospirozo. Za zdravljenje je zelo pomembno tudi redno spremljanje bolnikovega stanja in sprotno simptomatsko zdravljenje. Bolniki s hudim potekom leptospiroze so nameščeni na oddelkih za intenzivno nego (Bedernjak, 1993).

Popolno izkoreninjenje leptospiroze je nemogoče, lahko pa s cepljenjem preprečimo bolezen pri živalih in posledično tudi izločanje leptospir v okolje (Levett, 2003).

Drugi preventivni ukrepi, ki jih uporabljamo pri preprečevanju leptospiroze, so: redno izvajanje deratizacije, sprotna drenaža urina v hlevih, izločanje bolnih živali iz hlevov, prostori za shranjevanje hrane morajo biti ustrezno grajeni in zaprti, pri delu je potrebno nositi zaščitne obleke in obuvala ter se izogibati plavanju v potokih, jezerih in rekah (Bedernjak, 1993; Krauss in sod., 2003).

3 MATERIALI IN METODE

Z mikroaglutinacijskim in Leptocheck testom smo testirali 340 vzorcev seruma, ki so bili odvzeti 255 bolnikom s sumom na leptospirozo v letu 2000 in v letih od 2003 do 2009. Pri testiranju z testom Leptocheck smo naredili več ponovitev, mikroaglutinacijski test pa smo izvedli le enkrat, razen v primerih, ko so se rezultati obeh testov precej razlikovali in smo mikroaglutinacijski test ponovili ter vanj vključili tudi serotipe 9, 10, 11, 14 in 15, ki se sicer ne uporabljajo v dnevni laboratorijski diagnostiki.

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci

Z mikroaglutinacijskim (MAT) in testom Leptocheck smo testirali 340 vzorcev seruma 255 bolnikov iz zbirke Laboratorija za diagnostiko borelioz in leptospiroze, ki deluje v okviru Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Pri vseh bolnikih je obstajal klinični sum na leptospirozo, ki so ga postavili na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja Kliničnega centra Ljubljana ter v infekcijskih oddelkih drugih slovenskih bolnišnic (Maribor, Celje, Novo mesto, Murska Sobota).

3.1.2 Kulture leptospir, ki jih uporabljamo za mikroaglutinacijski test

Za izvedbo mikroaglutinacijskega testa smo uporabili 13 od 15 serovarov leptospir, ki jih v Laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroze uporabljajo v diagnostične namene. Serovara 12 in 13 v času izvedbe našega laboratorijskega dela nista bila na voljo, zato jih v test nismo vključili.

SEROLOŠKA SKUPINA	SEROVAR	SEV
1. GRIPPOTHYPHOSA	Grippotyphosa	Moskva V
2. CANICOLA	Canicola	Hond Utrecht IV
3. SEJROE	Sejroe	M84
4. POMONA	Pomona	Pomona
5. CYNOPTERI	Cynopteri	3522C
6. ICTERHAEMORRHAGIAE	Copenhageni	Wijnberg

7. SEMARANGA	Patoc	Patoc 1
8. AUSTRALIS	Australis	Ballico
9. AUTUMNALIS	Autumnalis	Akiyami A
10. PYROGENES	Pyrogenes	Salinem
11. BATAVIAE	Bataviae	Van Tienen
12. TARRASOVI	Tarassovi	Mitis Johnson
13. BALLUM	Castellanis	Castellon 3
14. PANAMA	Panama	CZ 214 K
15. JAVANICA	Javanica	Veldart Batavia 46

3.1.3 Material in oprema za mikroaglutinacijski test

- gojišče EMJH za kultivacijo leptospir (Difco™)
- raztopina EMJH v fosfatnem pufru (Difco™)
- fosfatni pufer
- sterilna fiziološka raztopina
- mikrotitrirna ploščica
- polavtomatske pipete z nastavki
- epruvete in stojalo
- inkubator
- mikroskop, ki omogoča mikroskopiranje v temnem polju

3.1.4 Material in oprema za izvedbo Leptocheck testa

- test Leptocheck WB (Zephyr Biomedicals, Goa, India)
- polavtomatska pipeta
- pufer, ki omogoča enakomerno porazdelitev vzorca po membrani
- stresalnik

- stojala
- štoparica

3.2 METODE

3.2.1 Mikroaglutinacijski test

3.2.1.1 Kultivacija leptospir za antigen

V 5 mL svežega gojišča nacepimo 0,5 mL kulture leptospir in inkubiramo 5 dni pri temperaturi 28 °C. Če je rast leptospir po 5. dnevu zadostna, leptospire hranimo v temi na sobni temperaturi in jih precepljamo vsake 3 do 4 tedne. Rast leptospir se kontrolira z mikroskopiranjem v temnem polju. Za uspešno izveden mikroaglutinacijski test morajo biti leptospire dobro gibljive, srednje velike ter se ne smejo združevati v skupke.

3.2.1.2 Postopek testa mikroaglutinacije

V veliko epruveto damo 960 µL fiziološke raztopine in 40 µL seruma ter tako dobimo razredčino seruma 1 : 25.

Kulturo leptospir pripravimo tako, da damo v veliko epruveto 1 ml fiziološke raztopine in 1 ml kulture leptospir ter stresamo na stresalniku.

V prvo vdolbinico mikrotitrirne ploščice damo 50 µL pripravljene kulture leptospir. V drugo vdolbinico damo 25 µL seruma, razredčenega 1 : 25, in 25 µl kulture leptospir ter tako dobimo razredčino seruma 1 : 50. V tretjo vdolbinico pa odpipetiramo 25 µL fiziološke raztopine, 25 µL seruma (redčenega 1 : 25) in 50 µL pripravljene kulture leptospir. Premešamo in 50 µL odstranimo. Razredčina v tretji vdolbinici je tako 1 : 100.

Tako pripravljene vzorce na mikrotitrirni ploščici inkubiramo 45 minut do 1 ure pri temperaturi 37 °C. Po končani inkubaciji na objektno stekelce nakapljamo 10 µL vzorca iz vsake vdolbinice. Rezultat odčitamo v temnem polju pri 160-kratni povečavi.

3.2.1.3 Vrednotenje testa

Test lahko označimo kot pozitiven, kadar je zlepljenih ali liziranih več kot 50 % leptospir. Rezultat testa je mejni, če je 50 % leptospir zlepljenih, 50 % pa je prostih. Kadar pa je zlepljenih manj kot 50 % leptospir, je test negativen.

Bolnika obravnavamo kot serološko pozitivnega, kadar serum aglutinira 50 % leptospir pri razredčini 1 : 100. Tak serum redčimo do razredčine 1 : 12800 (lahko tudi več) in ga naprej testiramo s tistimi serovari leptospir, pri katerih smo ugotovili aglutinacijo pri titru 100.

Zapišemo tudi delno aglutinacijo, ugotovljeno pri titru 50.

3.2.1.4 Titracija seruma pri pozitivnih bolnikih

V prvo vdolbinico mikrotitrirne ploščice odpipetiramo 50 μ L pripravljene kulture leptospir, ki služi kot kontrola. V naslednjih osem vdolbinic damo 25 μ L fiziološke raztopine. V drugo vdolbinico damo 25 μ L seruma, redčenega 1 : 25, in tako dobimo razredčino 1 : 50. Iz druge vdolbinice prenesemo 25 μ L v tretjo vdolbinico, premešamo in redčimo naprej do konca, 25 μ L vsebine iz zadnje vdolbinice pa zavržemo. V vdolbinice od 2 do 9 dodamo še 25 μ L kulture leptospir. Razredčine seruma v posamezni vdolbinici mikrotitrirne ploščice so: kontrola, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400, 1 : 800, 1 : 1600, 1 : 3200, 1 : 6400 in 1 : 12800. Inkubiramo 45 min. do ene ure pri 37 °C, nato pa reakcijo odčitamo v temnem polju pri 160-kratni povečavi.

3.2.1.5 Vrednotenje testa

Test vrednotimo tako kot osnovni presejalni test. Določimo najvišji titer protiteles, pri katerem še ugotovimo aglutinacijo leptospir. V test je vključenih več serovarov leptospir, okužbo pa povzroča tisti, ki ima najvišji titer protiteles. Ostali ga spremljajo zaradi navzkrižnosti. Zabeležimo tudi delne aglutinacije pri tistih titrih in serovarih, pri katerih smo jih opazili.

3.2.1.6 Ponovitev testa

Ponovitev testa izvedemo enako, kot je opisano v postopku testa mikroaglutinacije. Vrednotimo ga tako, kot je opisano pod oznako Vrednotenje testa. Ponovitev smo izvedli

pri vzorcih, kjer so se rezultati testiranja z mikroaglutinacijskim in testom Leptocheck preveč razlikovali. Naredili smo največ dve ponovitvi.

3.2.2 Leptocheck test

3.2.2.1 Potek testa

Komponente testa pred uporabo izpostavimo sobni temperaturi. Ko embalažo testa odpremo, ga moramo takoj uporabiti, saj kasneje ni več uporaben. S polavtomatsko pipeto ali priloženo mikrobiološko zanko prenesemo 10 μ L vzorca v okence, označeno s črko A. V okence, označeno z B, dodamo 5 kapljic pufru in inkubiramo 15 min. na sobni temperaturi. Nato iz testnega okenca T odčitamo rezultat.

3.2.2.2 Vrednotenje testa

V primeru negativnega rezultata se v kontrolnem okencu C pojavi rdeča črtica, testno okence pa je prazno. Kadar je rezultat pozitiven, vidimo rdečo črtico tudi v testnem okencu T. Če je črtica v testnem okencu zelo slabo vidna, rezultat označimo kot mejni +/- . V primeru, da se črtica ne pojavi v nobenem od okenc (niti v C, niti v T), je test neveljaven. Vzorec moramo ponovno testirati.

4 REZULTATI

4.1 MIKROAGLUTINACIJSKI TEST

Z mikroaglutinacijskim testom je bilo pozitivnih 157/340 (46,2 %) vzorcev. Od tega je bilo 75/157 (47,8 %) vzorcev pozitivnih na en serovar leptospir, 82/157 (52,2 %) pa je bilo hkrati pozitivnih na več različnih serovarov leptospir, kot je prikazano v preglednici 1. Serološka pozitivnost se največkrat pojavi na serovare 3 – Sejroe (59-krat), 7 – Patoc (41-krat) in 8 – Australis (57-krat), medtem ko je na serovar 4 – Pomona pozitivnih le 12 vzorcev.

Preglednica 1: Rezultati testiranja z mikroaglutinacijskim testom

Mikroaglutinacijski test		Število vzorcev	
Pozitiven	Na en serovar	75 (22,1 %)	157 (46,2 %)
	Na več serovarov	82 (24,1 %)	
Negativen		183 (53,8 %)	
Skupaj		340 (100 %)	

Serovar, ki je povzročil okužbo, smo opredelili pri 137/157 (87,3 %) vzorcih, pri ostalih 20/157 (12,7 %) pa nam to ni uspelo, saj smo določili enako visoke titre na več serovarov. Najvišji titer, 1 : 102400, se je pojavil pri serovarih 2 – Canicola in 6 – Icterohaemorrhagiae. Z visokim titrom, več kot 1 : 12800, se pojavljajo tudi serovari 2 – Canicola, 3 – Sejroe in 7 – Patoc.

Vzorci, ki so se po rezultatih obeh testiranj (mikroaglutinacijski in Leptocheck test) preveč razlikovali, smo ponovno testirali z mikroaglutinacijskim testom. Ponovno smo testirali 54/157 (34,4 %) prvotno pozitivnih in 36/183 (19,8 %) prvotno negativnih vzorcev, kot kaže preglednica 2. Pri prvotno pozitivnih vzorcih smo za ponovno testiranje uporabili serovare 9–11 in 14–15, vzorce, ki pa so bili pri prvem testiranju negativni, smo ponovno testirali s serovari 1–11 in 14–15.

Pri ponovni izvedbi mikroaglutinacijskega testa smo ugotovili, da je 14/54 (25,9 %) prvotno pozitivnih ponovno testiranih vzorcev pozitivnih tudi na serovare 9–11 in 14–15. Ostali ponovno testirani prvotno pozitivni vzorci so bili negativni ali pa smo zaznali delno

aglutinacijo. Enega od vzorcev je zmanjkalo, zato ponovnega testiranja nismo opravili. Pri ponovnem testiranju 36/183 (19,7 %) prvotno negativnih vzorcev pa smo odkrili vzorec, ki je bil pri drugem testiranju pozitiven. Testiranje smo zato še enkrat ponovili in rezultat je bil vnovič pozitiven. Ostali prvotno negativni vzorci so bili pri ponovnem testiranju negativni ali pa je bila prisotna delna aglutinacija (tudi tu smo testiranje še enkrat ponovili).

Preglednica 2: Prikaz rezultatov ponovnega testiranja z mikroaglutinacijskim testom

Rezultat prvega testiranja		Število ponovno testiranih vzorcev	Rezultat drugega testiranja
Pozitivni 157 (46,2 %)		s serovari 9–11 in 14–15 54 (15,9 %)	Pozitivni 14 (4,1 %)
			Negativni 40 (11,8 %)
Negativni 183 (53,8 %)		s serovari 1–11 in 14–15 36 (10,6 %)	Pozitivni 1 (0,3 %)
			Negativni 35 (10,3 %)
Skupaj	340 (100 %)		90 (26,5 %)

Pri večini pozitivnih vzorcev smo ugotovili delne aglutinacije v razredčinah 1 : 50, ki so se pojavile tudi pri manjšem številu negativnih vzorcev. Delna aglutinacija je bila prisotna pri 111 (32,6 %) pozitivnih in 24 (7,1 %) negativnih vzorcih. Porazdelitev vzorcev z delno aglutinacijo je prikazana v preglednici 3.

Preglednica 3: Rezultati testiranja bolnikov s sumom na leptospirozo z mikroaglutinacijskim testom glede na delno aglutinacijo

MIKROAGLUTINACIJSKI TEST		ŠTEVILO VZORCEV	
Pozitivni	Ni delne aglutinacije	46 (13,5 %)	157 (46,2 %)
	Delna aglutinacija	111 (32,6 %)	
Negativni	Ni delne aglutinacije	159 (46,8 %)	183 (53,8 %)
	Delna aglutinacija	24 (7,1 %)	
Skupaj		340 (100 %)	

Delna aglutinacija na en testiran serovar se je pojavila pri 24 vzorcih, na dva testirana serovara pri 59, na tri testirane serovare pri 33 vzorcih, pri 16 vzorcih pa je bila vidna delna aglutinacija na štiri testirane serovare in pri 1 vzorcu na pet testiranih serovarov. Rezultati so prikazani ločeno za pozitivne in negativne vzorce v preglednici 4.

Preglednica 4: Rezultati testiranja vzorcev seruma bolnikov z mikroaglutinacijskim testom glede na število serovarov pri delni aglutinaciji

Rezultat prvega testiranja MAT	Število serovarov pri delni aglutinaciji	Število vzorcev z delno aglutinacijo (titer 50)
pozitiven	Reakcija na 1 serovar	14
	Reakcija na 2 serovara	49
	Reakcija na 3 serovare	30
	Reakcija na 4 serovare	15
	Reakcija na 5 serovarov	1
	Reakcija na 6 serovarov	0
	Reakcija na 7 serovarov	0
	Reakcija na 8 serovarov	0
negativen	Reakcija na 1 serovar	10
	Reakcija na 2 serovara	10
	Reakcija na 3 serovare	3
	Reakcija na 4 serovare	1
	Reakcija na 5 serovarov	0
	Reakcija na 6 serovarov	0
	Reakcija na 7 serovarov	0
	Reakcija na 8 serovarov	0

Delno aglutinacijo pri titru 50 smo največkrat ugotovili na serovare 2 – Canicola (73-krat), 7 – Patoc (65-krat) in 6 – Icterohaemorrhagiae (33-krat) pri pozitivnih vzorcih ter na serovara 6 – Icterohaemorrhagiae (16-krat) in 7 – Patoc (16-krat) pri negativnih vzorcih. Rezultati so prikazani v preglednici 5.

Pri enem od negativnih vzorcev smo pri prvem testiranju opazili delno aglutinacijo pri titru 100 na serovar 8 – australis, kot je razvidno iz priloge A.

Preglednica 5: Rezultati testiranja vzorcev seruma bolnikov z mikroaglutinacijskim testom glede na pogostost pojavljanja serovarov, pri katerih je bila delna aglutinacija ugotovljena

Rezultat prvega testiranja MAT	Oznaka serovara	Pogostost pojavljanja
pozitiven	1 – Grippytyphosa	14-krat
	2 – Canicola	73-krat
	3 – Sejroe	25-krat
	4 – Pomona	16-krat
	5 – Cynopteri	25-krat
	6 – Icterohaemorrhagiae	33-krat
	7 – Semarang	65-krat
	8 – Australis	15-krat
negativen	1 – Grippytyphosa	3-krat
	2 – Canicola	4-krat
	3 – Sejroe	3-krat
	4 – Pomona	1-krat
	5 – Cynopteri	1-krat
	6 – Icterohaemorrhagiae	16-krat
	7 – Semarang	16-krat
	8 – Australis	1-krat

Tudi pri ponovnem testiranju vzorcev, kjer smo prvotno testirane pozitivne vzorce testirali na serovare 9–11 in 14–15 ter prvotno negativne vzorce na serovare od 1–11 ter 14–15, smo opazili reakcijo delne aglutinacije. Pri 17 vzorcih se je delna aglutinacija pojavila tudi na več različnih serovarov. Rezultate prikazuje preglednica 6, ločeno glede na rezultate prvega in drugega testiranja.

Preglednica 6: Rezultati ponovnega testiranja vzorcev seruma bolnikov z mikroaglutinacijskim testom glede na število serovarov pri delni aglutinaciji

Rezultat prvega in drugega testiranja MAT	Število serovarov pri delni aglutinaciji	Število vzorcev z delno aglutinacijo (titer 50)	
1. pozitiven	Reakcija na 1 serovar	16	
	Reakcija na 2 serovara	5	
	Reakcija na 3 serovare	0	
	Reakcija na 4 serovarov	1	
	Reakcija na 5 serovarov	1	
1. negativen	Reakcija na 1 serovar	5	
	Reakcija na 2 serovara	3	
	Reakcija na 3 serovare	3	
	Reakcija na 4 serovare	2	
	Reakcija na 5 serovarov	0	
	2. negativen	Reakcija na 6 serovarov	0
		Reakcija na 7 serovarov	1
		Reakcija na 8 serovarov	0
		Reakcija na 9 serovarov	0
		Reakcija na 10 serovarov	0
		Reakcija na 11 serovarov	0
		Reakcija na 12 serovarov	0
		Reakcija na 13 serovarov	0
1. negativen			
2. pozitiven	reakcija na 3 serovare	1	

Delno aglutinacijo smo največkrat ugotovili na serovare 9 – Autumnalis, 10 – Pyrogenes in 14 – Panama pri pozitivnih vzorcih in na serovare 9 – Autumnalis, 4 – Pomona in 8 – Australis pri negativnih vzorcih, kot je prikazano v preglednici 7.

Preglednica 7: Rezultati ponovnega testiranja vzorcev seruma bolnikov z mikroaglutinacijskim testom glede na pogostost pojavljanja serovarov, pri katerih smo ugotovili delno aglutinacijo

Rezultat prvega in drugega testiranja MAT	Oznaka serovara	Pogostost pojavljanja	
1. pozitiven	9 – Autumnalis	12-krat	
	10 – Pyrogenes	8-krat	
	11 – Bataviae	3-krat	
	14 – Panama	7-krat	
	15 – Javanica	5-krat	
2. pozitiven	1 – Grippytyphosa	3-krat	
	2 – Canicola	3-krat	
	3 – Sejroe	1-krat	
	4 – Pomona	6-krat	
	5 – Cynopteri	1-krat	
	6 – Icterohaemorrhagiae	3-krat	
	7 – Semarang	2-krat	
	8 – Australis	5-krat	
	9 – Autumnalis	8-krat	
	10 – Pyrogenes	2-krat	
	11 – Bataviae	0-krat	
	14 – Panama	1-krat	
	15 – Javanica	0-krat	
	1. negativen	1 – Grippytyphosa	1-krat
	2. pozitiven	2 – Canicola	1-krat
4 – Pomona		1-krat	

Pri ponovnem testiranju vzorcev, ki so bili po prvem testiranju negativni, smo pri dveh vzorcih opazili delno aglutinacijo tudi pri titru 100. Delna aglutinacija se je pojavila na dva testirana serovara, in sicer: serovar 5 – Cynopteri ter serovar 8 – Australis, kot je razvidno iz priloge A.

4.2 LEPTOCHECK TEST

S testom Leptocheck smo vsak vzorec testirali najmanj dvakrat. Protitelesa IgM smo dokazali v 117/340 (34,4 %) vzorcih, 12/340 (3,5 %) vzorcev pa je imelo mejni rezultat, kar smo označili kot +/- . Pri 15/340 (3,5 %) vzorcih so bili rezultati ponovitev tako različni, da končne ocene rezultata testa nismo mogli podati. Rezultate prikazuje preglednica 8.

Preglednica 8: Rezultati testiranja vzorcev seruma bolnikov, dobljeni z Leptocheck testom

Leptocheck test	Protitelesa IgM
Pozitiven	117 (34,4 %)
Mejni	10 (3,5 %)
Negativen	198 (58,2 %)
Ni mogoče oceniti	15 (4,4 %)
Skupaj	340 (100 %)

Vseh 15 vzorcev, pri katerih končnega rezultata nismo mogli oceniti, smo izključili iz nadaljnje primerjave. Vsak od vzorcev je bil s testom Leptocheck testiran večkrat, vendar so se rezultati testiranja, ki so prikazani v preglednici 9, tako razlikovali, da se ni bilo mogoče odločiti, ali je končni rezultat testiranja določenega vzorca pozitiven ali negativen ali mejni, zato smo ga označili kot »rezultata ni mogoče oceniti«.

Preglednica 9: Rezultati testiranja vzorcev seruma bolnikov, katerih končnega rezultata ni mogoče oceniti

Zaporedna številka vzorca	Številka in leto vzorca	Rezultat testiranja z Leptocheck testom
84	459/05	-, +, -, +/-, -
91	3882/05	-, +/-, +, -, +/-
95	9791/05	+, -, +/-, -
117	4708/06	-, -, +, +/-, -
125	12610/06	-, +/-, -, +, +
126	1590/07	-, +/-, -, +/-
137	9694/07	-, +/-, +, -
148	6939/08	-, +, +/-, -
152	8109/08	-, +/-, +
194	3491/08	+, -, +/-, -, -
207	4087/08	+, -, +, -, +/-
243	6262/08	+, -, +/-, +/-, +
258	7196/08	+, -, +/-, -, +/-
263	7608/08	+, -, -, +, +/-
323	12627/08	+, -, +/-, -

4.3 PRIMERJAVA OBEH SEROLOŠKIH TESTOV – MIKROAGLUTINACISJKEGA IN LEPTOCHECK TESTA

Pri testiranju z mikroaglutinacijskim testom je bilo 157/340 (46,2 %) vzorcev pozitivnih, medtem ko je testiranje s testom Leptocheck dalo 117/340 (34,4 %) pozitivnih rezultatov. S testom Leptocheck nismo mogli oceniti končnega rezultata pri 9 (2,7 %) vzorcih, ki so bili z mikroaglutinacijskim testom pozitivni, 7 (2,1 %) vzorcev pa je imelo mejni rezultat (+/-). Enak rezultat (+ ali -) smo dobili pri 98/340 pozitivnih in 155/340 negativnih vzorcih, skupaj 253/340 (74,4 %), kar predstavlja delež ujemanja obeh testov. Primerjavo rezultatov prikazuje preglednica 10.

Preglednica 10: Primerjava rezultatov, dobljenih z mikroaglutinacijskim (MAT) in Leptocheck testom

Mikroaglutinacijski test	Leptocheck test				Skupaj
	Pozitiven	Negativen	Mejni	Ni mogoče oceniti	
Pozitiven	98 (28,8 %)	43 (12,7 %)	7 (2,1 %)	9 (2,7 %)	157 (46,2 %)
Negativen	19 (5,6 %)	155 (45,6 %)	3 (0,9 %)	6 (1,8 %)	183 (53,8 %)
Skupaj	117 (34,4 %)	198 (58,2 %)	10 (2,9 %)	15 (4,4 %)	340 (100%)

Delno aglutinacijo pri testu mikroaglutinacije smo zaznali pri 111 (32,7 %) pozitivnih in 24 (7,1 %) negativnih vzorcih. Od 111 pozitivnih vzorcev z delno aglutinacijo jih je bilo 69 (20,3 %) pozitivnih s testom Leptocheck (preglednica 3). Med 24, z mikroaglutinacijskim testom negativnimi vzorci z delno aglutinacijo, jih je bilo s testom Leptocheck pozitivnih 7 (2,1 %). Rezultate prikazuje preglednica 11.

Preglednica 11: Primerjava rezultatov mikroaglutinacijskega in Leptocheck testa glede na delno aglutinacijo

Mikroaglutinacijski test		Leptocheck test					
		Pozitivni	Negativni	Mejni	Ni rezultata	Skupaj	
Pozitivni	delna aglutinacija	69 (20,3 %)	35 (10,3 %)	2 (0,6 %)	5 (1,5 %)	111 (32,7 %)	157 (46,2 %)
	ni delne aglutinacije	29 (8,5 %)	8 (2,4 %)	5 (1,5 %)	4 (1,2 %)	46 (13,5 %)	
Negativni	delna aglutinacija	7 (2,1 %)	15 (4,4 %)	1 (0,3 %)	1 (0,3 %)	24 (7,1 %)	183 (53,8 %)
	ni delne aglutinacije	12 (3,5 %)	140 (41,2 %)	2 (0,6 %)	5 (1,5 %)	159 (46,8 %)	
Skupaj		117 (34,4 %)	198 (58,2 %)	10 (2,9 %)	15 (4,4 %)	340 (100 %)	

Kadar so se rezultati obeh testov razlikovali oziroma ko smo dobili kombinacije pozitiven–negativen ali mejni ali rezultata ni mogoče določiti, smo vzorce ponovno testirali z mikroaglutinacijskim testom. Ponovno smo testirali tudi nekatere vzorce z različnimi rezultati ponovitev testa Leptocheck. Vsi rezultati ponovitev razen enega so se ujemali s prvotnimi rezultati. Eden izmed prvotno negativnih vzorcev z delno aglutinacijo pri titru 100 na serovar 8 – Australis je bil pri ponovnem testiranju pozitiven. Testiranje z mikroaglutinacijskim testom smo ponovili še enkrat, vendar je bil rezultat ponovno pozitiven.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo primerjali rezultate seroloških testiranj mikroaglutinacijskega testa ter testa Leptocheck. Referenčni mikroaglutinacijski test je visoko specifičen tako za sveže infekcije kot tudi za že prebolele okužbe (Radšel - Medvešček, 2002). Uvrščamo ga med za serovar specifične teste. Z njim lahko določimo serovar, ki je povzročil okužbo, ter višino titra protiteles (Palmer, 1988). Okužbo lahko povzročijo antigensko različni serovari vrste *L. interrogans* sensu lato zato za samo izvedbo testa uporabljamo različno število serovarov leptospir, odvisno od epidemiološke slike določenega geografskega področja (Bedernjak, 1993). Slaba lastnost testa je zelo zahtevna, dolgotrajna in nevarna izvedba, za katero potrebujemo primerno usposobljeno osebje (Winslow, 1997). Zato smo v nalogi želeli ugotoviti, ali lahko s hitrim, cenovno ugodnim in predvsem za uporabo preprostim testom Leptocheck zanesljivo dokažemo okužbo pri bolnikih s kliničnim sumom na leptospirozo. Njegova prednost v primerjavi z mikroaglutinacijskim testom je v hitri in enostavni izvedbi, saj na ustrezni okenci na testni napravi nakapljamo ustrezno količino pufra in vzorca ter po 15 minutah inkubacije odčitamo rezultat. Slaba stran testa je, da z njim ne moremo določiti serovara, ki je povzročil okužbo, niti ne moremo določiti višine titra protiteles. Problemi se pojavijo tudi pri odčitavanju rezultatov, posebej kadar je črtica v testnem okencu slabo vidna in se odločamo med pozitivnim in mejnim rezultatom oziroma med mejnim in negativnim rezultatom.

Z namenom, da bi potrdili oziroma ovrgli naše delovne hipoteze, smo z obema testoma testirali 340 vzorcev seruma 255 bolnikov s sumom na leptospirozo. Sum na leptospirozo je bil postavljen pri bolnikih z akutno prizadetostjo jeter in ledvic, kar je značilno tako za leptospirozo kot tudi za okužbe z drugimi mikroorganizmi. Vsak vzorec smo testirali vsaj enkrat z mikroaglutinacijskim testom in vsaj dvakrat s testom Leptocheck. Večino vzorcev smo s testom Leptocheck testirali večkrat, nekatere tudi petkrat, da bi ugotovili, kakšna je ponovljivost testa. V primeru, da so se rezultati ponovitev testiranj posameznega vzorca preveč razlikovali med seboj, smo ponovili tudi mikroaglutinacijski test.

Pri testiranju z mikroaglutinacijskim testom smo protitelesa proti leptospirnim antigenom dokazali v 157 primerih, v 183 primerih pa je bil rezultat negativen (preglednica 1). Vzrok za velik delež negativnih vzorcev je verjetno v tem, da še ni prišlo do tvorbe protiteles, ki navadno nastanejo 7–10 dni po okužbi; možno je tudi, da bolniki sploh niso okuženi z leptospirami, ampak z drugimi mikroorganizmi in je potrebno vzrok za zdravstvene težave iskati s širšo paleto testov. Obstaja tudi možnost, da je bolnik okužen s serovarom leptospire, ki ga nismo vključili v testiranje, in je to vzrok za negativen rezultat. Do takšne okužbe lahko pride, če bolnik potuje v druga endemična področja, za katera so značilni drugi serovari.

Pozitivni rezultat z mikroaglutinacijskim testom smo največkrat ugotovili pri serovarih 3 – Sejroe, 8 – Australis, 7 – Semarang in 6 – Icterohaemorrhagiae. V Pomurju, kjer je leptospiroza endemska bolezen, okužbo najpogosteje povzročajo serovari Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae in Sejroe, kar smo v nalogi tudi potrdili (Bedernjak, 1993). Najvišji pozitiven titer, 1 : 102400, ki smo ga opazili pri vzorcu 71 (priloga A), se je pojavil pri serovarih Canicola in Icterohaemorrhagiae. Tudi test Leptocheck je pokazal pozitiven rezultat. Pri petih vrcih pa smo opazili visok titer, >1 : 12800, pri serovarih Canicola, Sejroe in Semarang. Pri testiranju s testom Leptocheck sta bila dva izmed petih vzorcev pozitivna, pri ostalih treh je bil rezultat negativen.

Približno polovica pozitivnih vzorcev, 82/157 (24,1 %), je bila hkrati pozitivna na več različnih serovarov leptospir (preglednica 1). Do tega pride zaradi navzkrižnih reakcij protiteles s podobnimi antigeni. Kadar se pojavijo visoki titri (>100) na več različnih serovarov, najvišji titer opredeli, s katerim serovarom se je bolnik okužil, drugi titri pa predstavljajo navzkrižne reakcije. Če bi želeli to potrditi, bi morali leptospire iz bolnikove kužnine izolirati, jim določiti serovar ter ugotoviti, ali serovar z najvišjim titrom pri mikroaglutinacijskem testu sovпада s serovarom, ki smo ga izolirali pri bolniku. Ta postopek je zahteven za izvedbo, zato povzročitelja okužbe opredelimo glede na serovar, ki smo ga določili z mikroaglutinacijskim testom.

V 20 primerih serovara, ki je povzročil okužbo, nismo uspeli opredeliti, saj je bil titer protiteles enak pri različnih serovarih. Če bi v tem primeru želeli določiti serovar, ki je povzročil okužbo, bi bilo potrebno vzorce večkrat ponovno testirati v različnih časovnih

presledkih, saj imunski sistem s časom dozoreva. Po okužbi se v bolnikovem serumu najprej pojavijo protitelesa IgM, nato pa še protitelesa IgG, ki najvišjo raven dosežejo po treh do štirih tednih in se v serumu ohranijo zelo dolgo, lahko tudi vse življenje (Avšič - Županc, 1998). Z dozorevanjem in odzivanjem imunskega sistema na leptospirin antigen bi se sčasoma (po več testiranjih) pokazal serovar, ki je okužbo dejansko povzročil, navzkrižne reakcije pa bi zbledele.

Pri 111 (32,6 %) pozitivnih in 24 (7,1 %) negativnih vzorcih je prišlo do pojava delne aglutinacije (preglednica 3). Pri pozitivnih vzorcih se je reakcija delne aglutinacije največkrat pojavila na serovare Canicola, Semarang in Icterohaemorrhagiae, pri negativnih pa na serovara Icterohaemorrhagiae ter Semarang (preglednica 5). Tako pri pozitivnih kot tudi pri negativnih vzorcih smo opazili delno aglutinacijo na več serovarov hkrati.

Eden izmed negativnih vzorcev, vzorec številka 284 (priloga A), je imel pri prvem testiranju z mikroaglutinacijskim testom delno aglutinacijo pri titru 100, in sicer na serovar Australis. Pri omenjenem vzorcu je bila vidna tudi delna aglutinacija pri titru 50 na serovar Semarang (priloga A). Isti vzorec smo čez teden dni ponovno testirali in dobili pozitiven rezultat 1 : 200 na serovar Australis ter delne aglutinacije pri titru 50 na serovare Grippytyphosa, Canicola in Pomona (priloga A). Zaradi razlike med prvim in drugim testiranjem smo vzorec isti dan testirali še tretjič. Rezultat je bil enak rezultatu drugega testiranja, torej pozitiven na serovar Australis. Vzorec smo testirali tudi s testom Leptocheck. Testiranje smo ponovili 4-krat in dobili 1 pozitiven ter 3 negativne rezultate in končni rezultat ocenili kot negativen. Lahko da je do razlike med prvim in ponovnim testiranjem prišlo zaradi slabe ali prestare kulture leptospir, ki je bila uporabljena pri prvi izvedbi mikroaglutinacijskega testa, zato leptospire niso bile dobro gibljive ali pa so se združevale v skupke in so bile neenakomerno porazdeljene po kulturi, zaradi česar je bila namesto popolne aglutinacije vidna le delna aglutinacija. Možno je tudi, da so bila neenakomerno porazdeljena protitelesa v testiranem vzorcu in je to vzrok, da je bila pri prvem testiranju vidna samo delna aglutinacija.

Delne aglutinacije nastanejo zaradi navzkrižne reaktivnosti protiteles, nespecifične vezave serumskih protiteles proti drugim antigenom s serovari leptospir ter kot posledica

avtoimunskih bolezni. O navzkrižni reaktivnosti govorimo, kadar antigeni vežejo protitelesa, ki so nastala kot odgovor na drug antigen, ki ima podobne ali delno enake antigenske determinante.

Cilj naše naloge je bil, da primerjamo rezultate obeh seroloških testov med seboj. Zato smo vse vzorce testirali še s testom Leptocheck. Rezultati testa Leptocheck, ki za razliko od mikroaglutinacijskega testa, ki dokazuje skupna protitelesa IgM in IgG, dokazuje le protitelesa IgM, so prikazani v preglednici 8.

Testiranje s testom Leptocheck je dalo 117 (34,3 %) pozitivnih, 198 (58,2 %) negativnih in 12 (3,5 %) mejnih rezultatov (preglednica 8). Pri 15 (4,4 %) vzorcih končnega rezultata zaradi različnih rezultatov testiranja nismo uspeli določiti (preglednica 8). Izvajanje testa Leptocheck je precej enostavno in hitro, le v posameznih primerih smo imeli nekaj težav z oceno končnega rezultata, saj je bila testna črtica zelo slabo vidna ali pa so bili rezultati ponovitev tako različni, da končnega rezultata nismo mogli podati.

V primeru, da se je črtica komaj videla oziroma se je videla le pri določeni svetlobi in pod določenim kotom, smo rezultat označili kot mejni (+/-). Vzorce s takšnim rezultatom prvega testiranja smo nato še večkrat ponovno testirali in na podlagi rezultatov ponovnih testiranja skušali oceniti končni rezultat. Pri 12 vzorcih pa so tudi ponovna testiranja pokazala mejni rezultat, zato smo pri teh vzorcih tudi končni rezultat označili kot mejni in ponovno izvedli še testiranje z mikroaglutinacijskim testom. Slaba vidljivost testne črtice je verjetno posledica nizke koncentracije protiteles IgM v preiskovanih serumih. Vzorci so bili večkrat zamrznjeni in odmrznjeni, kar bi lahko povzročilo razpad protiteles in predstavljalo vzrok za nizko koncentracijo protiteles v serumu ter posledično tudi vzrok za slabo vidljivost testne črtice. Eden izmed vzrokov za nizko koncentracijo protiteles v serumu je lahko tudi vzorec, vzet v času nastajanja protiteles, ko jih v serumu še ni veliko, ali pa vzorec, vzet precej časa po okužbi, ko njihova raven spet pade. Šibka črtica lahko nastane tudi kot posledica navzkrižnih protiteles.

Končnega rezultata nismo mogli podati pri 15 (4,4 %) vzorcih (preglednica 8 in 9). Kot primer lahko vzamemo vzorec številka 207 (preglednica 9), kjer smo po petih testiranjih dobili naslednje rezultate: +, -, +, - in +/- . Pri testiranju z mikroaglutinacijskim testom je bil vzorec negativen brez delne aglutinacije. Zaradi tako različnih rezultatov testa

Leptocheck smo vzorec dvakrat ponovno testirali z mikroaglutinacijskim testom in v obeh primerih je bil rezultat enak rezultatu prvega testiranja. Morda je do tako neenotnih rezultatov prišlo zaradi neenakomerne porazdelitve protiteles po vzorcu.

Izvedba mikroaglutinacijskega testa je precej draga, zapletena, dolgotrajna, dokaj subjektivna, zahteva stalno zalogo leptospir, povzroči lahko okužbe laboratorijskih delavcev, pri prevelikem številu kliničnih vzorcev pa sta vprašljiva tudi sama izvedba in natančnost testa. Zaradi naštetih razlogov so nastale številne študije oziroma primerjave različnih seroloških testov s testom mikroaglutinacije. V eni izmed študij so ugotovili, da imata encimskoimunski in leptotek dri dot test številne prednosti pred referenčnim mikroaglutinacijskim testom. Lažje ju je izvajati, za izvedbo ne potrebujemo drage laboratorijske opreme in tako izkušenih strokovnjakov, rezultat dobimo mnogo prej kot pri mikroaglutinacijskem testu, kar je izrednega pomena v diagnostiki leptospiroze in pomembno vpliva na začetek zdravljenja (Smits in sod. 2000). Tudi Winslow in sod. (1997) so v svoji študiji ugotovili, da je encimskoimunski test primeren presejalni test, ki naj bi se uporabljal v diagnostične namene za diagnostiko akutne leptospiroze z naknadno potrditvijo pozitivnega rezultata z mikroaglutinacijskim testom.

V naši nalogi smo primerjali mikroaglutinacijski test in test Leptocheck. Ugotovili smo, da z mikroaglutinacijskim testom določimo nekoliko več okužb z leptospirami, kar smo tudi pričakovali, saj mikroaglutinacijski test dokazuje tako protitelesa IgM kot tudi IgG, test Leptocheck pa samo protitelesa IgM.

Protitelesa proti leptospiranim antigenom smo z mikroaglutinacijskim testom dokazali v 157 vzorcih (preglednica 1), z Leptocheck testom pa v 117 vzorcih (preglednica 8). Od 157 vzorcev, ki so bili pozitivni z mikroaglutinacijskim testom jih je bilo s testom Leptocheck pozitivnih 98 (preglednica 10). Do takšne razlike je verjetno prišlo zaradi že zgoraj omenjenega dejstva, da z Leptocheckom določamo le protitelesa IgM, medtem ko mikroaglutinacijski test določa poleg protiteles IgM tudi protitelesa IgG in tako zajame več pozitivnih bolnikov. Vzorci, ki smo jih uporabili pri testiranju, so bili večkrat zamrznjeni in odmrznjeni, kar je verjetno povzročilo razgradnjo nekaterih protiteles in tako zmanjšalo njihovo koncentracijo. Nižja koncentracija protiteles IgM tako privede do manjšega števila s testom Leptocheck pozitivnih vzorcev, število vzorcev, pozitivnih z mikroaglutinacijskim

testom, pa je večje. Možno je tudi, da so bili vzorci za testiranje vzeti toliko časa po okužbi, da so protitelesa IgM že izginila, protitelesa IgG pa so še bila prisotna in tako je bil pozitiven le mikroaglutinacijski test, test Leptocheck pa negativen.

V 19 primerih so bili vzorci pozitivni s testom Leptocheck ter negativni z mikroaglutinacijskim testom (preglednica 10). Zaradi razlike v rezultatu med obema testoma smo testiranje z mikroaglutinacijskim testom ponovili, vendar je bil rezultat tudi po ponovnem testiranju negativen. Do razlike v rezultatu je verjetno prišlo zaradi pojava navzkrižne reaktivnosti, kjer protitelesa proti drugemu antigenu reagirajo z leptospirinskim antigenom, vezanim na membrano v testu, in povzročajo lažno pozitiven rezultat. Možno je tudi, da je bil mikroaglutinacijski test negativen, bolniki pa so bili okuženi z serovarom, ki v testiranje z mikroaglutinacijskim testom ni bil vključen, saj smo za testiranje uporabili le 14 za Slovenijo značilnih serovarov. Epidemioloških podatkov o možni okužbi bolnikov na katerem izmed drugih kontinentov nismo imeli.

V nalogi nas je zanimalo, če lahko uporabimo test Leptocheck namesto mikroaglutinacijskega testa v dnevni laboratorijski diagnostiki. V tem primeru ne bi zajeli tistih vzorcev oz. bolnikov, ki so bili z mikroaglutinacijskim testom pozitivni, z Leptocheck pa negativni. Tako bi dobili 43 (12,7 %) lažno negativnih rezultatov (preglednica 10). Napačen oz. lažno pozitiven rezultat bi dobili tudi pri 19 (5,6 %) vzorcih, ki so bili z mikroaglutinacijskim testom negativni, test Leptocheck pa je pokazal pozitiven rezultat (preglednica 10). Težave pri diagnostiki pa bi nam predstavljali vzorci, pri katerih končnega rezultata ni možno oceniti, saj pri teh vzorcih ni možno ugotoviti, ali je bolnik okužen z leptospirami ali ne, ter vzorci, ki imajo mejni rezultat. Na podlagi teh ugotovitev lahko rečemo, da bi se test Leptocheck lahko uporabljal kot presejalni test za nujno laboratorijsko diagnostiko, vendar referenčnega mikroaglutinacijskega testa v dnevni laboratorijski diagnostiki leptospiroze ne more nadomestiti, saj bi bilo potrebno rezultate potrditi z mikroaglutinacijskim testom. Uporaba testa Leptocheck pa je zelo koristna v primeru, ko je potrebna zelo hitra diagnostika, ali pa v primeru, ko nimamo na voljo osebja, usposobljenega za izvedbo mikroaglutinacijskega testa.

5.2 SKLEPI

- Z obema serološkima testoma, mikroaglutinacijskim in testom Leptocheck, smo ugotovili in potrdili nastanek specifičnih protiteles proti leptospirnim antigenom pri bolnikih s sumom na leptospirozo.
- Rezultati obeh testov so se ujemali v 74,4 %.
- Test Leptocheck je v primerjavi z mikroaglutinacijskim testom hitrejši, bolj varen in manj zahteven za uporabo.
- Test Leptocheck lahko uporabimo kot presejalni test za nujno diagnostiko, vendar je potrebno rezultate kasneje potrditi še z mikroaglutinacijskim testom.
- Razliko v rezultatih mikroaglutinacijskega testa in testa Leptocheck je potrebno naprej spremljati.

6 POVZETEK

Leptospiroza je najbolj razširjena zoonoza na svetu, ki je v Sloveniji endemična v murskosoboški regiji. Povzročajo jo različni serovari vrste *Leptospira interrogans* sensu lato. Najpomembnejši prenašalci in rezervoar leptospiroze so glodavci, okužijo se lahko tudi številne divje in domače živali, človek pa je le naključni gostitelj. Klinična slika je zelo pestra in variira od subklinične vročinske bolezni do hudih oblik z zlatenico, akutno ledvično odpovedjo in krvavitvami s smrtnim izidom.

Humano leptospirozo lahko dokažemo z izolacijo bakterije *L. interrogans* sensu lato iz telesnih tekočin, z dokazom zvišanja titra protiteles v serumu ali z dokazom molekule DNK leptospir. Pri diagnostiki leptospiroze velikokrat pomaga epidemiološka anamneza: poznavanje razširjenosti leptospir in možnosti izpostavitve bolnika okužbi (Ružič - Sabljic, 2002). V prvi fazi okužbe, ko so leptospire v bolnikovi krvi in likvorju, jih lahko dokažemo neposredno z osamitvijo ali dokazom molekule DNK leptospir. V drugi fazi okužbe začne bolnik izdelovati specifična protitelesa, ki jih dokazujemo s serološkimi testi. Za dokazovanje celokupnih specifičnih protiteles proti leptospiram se v klinični diagnostiki uporablja referenčni mikroaglutinacijski test, na voljo so tudi encimskoimunski test ter več različic hitrih testov (Leptocheck, Leptotek ...).

V okviru tega diplomskega dela smo želeli ovrednotiti test Leptocheck, s katerim dokazujemo le protitelesa IgM, ki so prva, ki nastanejo po okužbi, ter ga primerjati z referenčnim mikroaglutinacijskim testom, ki dokazuje celokupna protitelesa proti leptospiram. Zanimalo nas je tudi, ali lahko s testom Leptocheck okužbo z leptospirami zanesljivo dokažemo.

V raziskavo smo vključili 340 vzorcev seruma 255 bolnikov s kliničnim sumom na leptospirozo. Vse vzorce smo testirali z zgoraj omenjenima serološkima testoma in z obema potrdili nastanek specifičnih protiteles proti leptospirnim antigenom. Ujemanje rezultatov z obema testoma smo dokazali v 74,4 % primerov. Z mikroaglutinacijskim testom smo dokazali več pozitivnih primerov kot s testom Leptocheck, kar smo tudi pričakovali, saj mikroaglutinacijski test dokazuje protitelesa IgG ter IgM, test Leptocheck pa samo protitelesa IgM. Ugotovili smo, da se rezultati testiranj istega serumskega vzorca z obema testoma večinoma ujemajo (74,4 % vzorcev), razen v nekaterih primerih, ko je

prišlo do precejšnjih razlik med rezultati obeh testiranj (25,6 % vzorcev). Z rezultatom smo lahko zadovoljni, čeprav smo morda pričakovali malenkost večje ujemanje med rezultati obeh testov. Glavna negativna lastnost testa Leptocheck je slaba ponovljivost, saj v 4,5 % zaradi različnih rezultatov testiranj istega vzorca končnega rezultata ni bilo mogoče določiti. Kljub temu lahko na podlagi dobljenih rezultatov trdimo, da lahko s preprostim testom Leptocheck ugotovimo okužbo pri bolnikih s sumom na leptospirozo in da pri tem zgrešimo 27,4 % bolnikov. Leptocheck test se lahko uporablja za nujno diagnostiko okužbe z leptospirami, vendar je potrebno rezultate v rutinskem času potrditi z mikroaglutinacijskim testom.

7 VIRI

Adler B., Murphy A. M., Locarini S. A., Faine S. 1980. Detection of specific antileptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid – phase enzyme – linked immunoabsorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 11, 5: 452–457

Avšič Županc T. 1998. Posredno dokazovanje virusov. V: Splošna medicinska virologija. Koren S., Avšič Županc T., Drinovec B., Poljak M. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 119–128

Babudieri B. 1961. Laboratory diagnosis of leptospirosis. *Bulletin of World Health Organization*, 24: 45–58

Baril C., Saint Girons I. 1990. Sizing of the *Leptospira* genome by pulsed-field agarose gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters*, 71: 95–100

Bedernjak J. 1993. Leptospiroze pri nas in v svetu. Murska Sobota, Pomurska založba: 136 str.

Bedernjak J., Bedernjak - Bajuk N. 2003. Leptospiroze. V: Infektološki simpozij 2003. Čižman M., Strle F. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 131–139

Bharti A. R., Nally J. E., Ricaldi J. N., Matthias M. A., Diaz M. M., Lovett M. A., Levett P. N., Gilman R. H., Willing M. R., Gotuzzo E., Vinetz J. M. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infectious Diseases*, 3, 12: 757–711

Brown P.D., Lewett P.N. 1997. Differentiation of *Leptospira* species and serovars by PCR – restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed and low – stringency PCR. *Medical Microbiology*, 46: 173–181

Cacciapuoti B., Ciceroni L., Barboni D. A. 1990. Fatty acid profiles in the family *Leptospiraceae*. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie*, 247: 16-27

Diament D., Brunialti M. K. C., Romero E. C. K., Kallas E. G., Salomao R. 2002. Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* Glycolipoprotein. *Infection and Immunity*, 70, 4: 1667–1683

Fabrice M., Baranton G., Perolat P. 1997. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infection and Immunity*, 65, 2: 729–738

Faine S., Adler B., Bolin C., Perolat P. 1999. *Leptospira* and leptospirosis. 2nd ed. Melbourne, MedSci: 257 str.

Haake D. A., Matsunga J. 2002. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infection and Immunity*, 70, 9: 4936–4945

Isogai E., Kitagawa H., Isogai H., Kurebayashi Y., Ito N. 1986. Biological activities of leptospiral lipopolysaccharide. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene*, 261: 53–64

Krauss H., Weber A., Appel M., Enders B., Isenberg H. D., Schiefer H. G., Slenczka W., Graevenitz A., Zahner H. 2003. Leptospirosis. V: Zoonoses: Infectious diseases transmissible from animals to humans. 3rd ed. Krauss H., Weber A., Appel M., Enders B., Isenberg H. D., Schiefer H. G., Slenczka W., Graevenitz A., Zahner H. (eds.). Washington, ASM Press: 203–205

Levett P.N., Whittington C.U. 1998. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 1: 11–14

Levett P.N. 2001. Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 2: 296–326

Levett P. N. 2003 *Leptospira* and *Leptonema*. V: Manual of clinical microbiology. 8th ed. Murray P. R., Baron J. E., Jorgensen J. H., Tenover F. C., Tenover P. C., Tenover P. C., Tenover P. C. (eds.). Washington, ASM Press: 929–935

Levett P. N. 2007. *Leptospira*. V: Manual of clinical microbiology. 9th ed. Murray P. R., Baron J. E., Jorgensen J. H. (eds.). Washington, D.C., ASM Press: 963–970

Masuzawa T., Nakamura R., Shimizu T., Yanagihara Y. 1990. Biological activities and endotoxic activities of protective antigens (PAGs) of *Leptospira interrogans*. *Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene*, 274: 109–117

Ooteman M. C., Vago A. R., Koury M. C. 2006. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *Journal of Microbiological Methods*, 65, 2: 247–257

Pal E., Prelog I. 2003. Prikaz bolnikov z leptospirozo, zdravljenih na oddelku za infekcijske bolezni in vročinska stanja Splošne bolnišnice Murska Sobota v letu 2002 – pomen hemokultur pri njeni diagnostiki. *Zdravniški vestnik*, 72: 275–277

Palmer M. F. 1988. Laboratory diagnosis of leptospirosis. *Medical Laboratory Sciences*, 45: 174–178

Plank R., Dean D. 2000. Overview of epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes and Infection*, 2, 10: 1265–1267

Postic D., Marien F., Perolat P., Baranton G. 2000. Diagnostic biologique leptospirose: Boreliose de lyme. 2^e ed. Paris, Institute Pasteur: 248 str.

Radšel - Medvešček A. 2002. Leptospiroza. V: Infekcijske bolezni. Marolt - Gomišček M., Radšel - Medvešček A. (ur.). Ljubljana, Tangram: 213–218

Ružič - Sabljic E. 2002. Leptospire. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 303–307

Saengjaruk P., Chaicumpa W., Watt G., Bunyaraksyotin G., Wuthiekanun V., Tapchaisri P., Sittinont C., Panaphut T., Tomanakan K., Sakovaree Y., Chongsa-Nguan M., Mahakunkijcharoen Y., Kalambaheti T., Naigowit P., Wambangco M. A. L., Kurazono H., Hayashi H. 2002. Diagnosis of human leptospirosis by monoclonal antibody-based antigen detection in urine. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 2: 480–489

Sinkovič A., Hojs R., Veble A., Baklan Z. 1996. Težka oblika leptospiroze z akutnim pankreatitisom in večorgansko odpovedjo – prikaz primera in pregled literature. *Zdravniški vestnik*, 65: 71–73

Smits H. L., Ananyina Y. V., Cheresky A., Dancel L., Ali-a-fat R.F.M., Chee H.D. 1999. International multicenter evaluation of the clinical utility of a dipstick assay for detection

of *Leptospira* – specific immunoglobulin M antibodies in human serum specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 9: 2904–2909

Smits H. L., Van der Hoorn M. A. W. G., Goris M. G. A., Gussenhoven G. C., Yersin C., Sasaki D. M., Terpstra W. J., Hartskeer R. A. 2000. Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 3: 1272–1275

Smythe L. D., Smith I. L., Smith G. A., Dohnt M. F., Symonds M. L., Barnett L. J., McKay D. B. 2002. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infectious Diseases*, 2: 13, doi 10.1186/1471-2334-2-13: 7 str.

Winslow W. E., Merry D. J., Pirc M. L., Devine P. L. 1997. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 8: 1938–1942

Wuthiekanun V., Chierakul W., Limmathurotsakul D., Smythe L., Symonds M. L., Dohnt M. F., Slack A. T., Limpaiboon R., Suputtamongkol Y., White N. J., Day N. P. J., Peacock S. J. 2007. Optimization of culture of *Leptospira* from humans with leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 4: 1363–1365

Zuerner L., Haake D., Adler B., Segers R. 2001. Technological advances in the molecular biology of *Leptospira*. V: The spirochetes: Molecular and cellular biology. Saier M. H., Garcia-Lara J. (eds.). Wyomondham, Horizon Scientific Press: 137–145

PRILOGE

Priloga A: Rezultati testiranja vzorcev seruma bolnikov z mikroaglutinacijskim (MAT) testom in Leptocheck testom

Zaporedna številka vzorca	Številka in leto vzorca	MAT s serotipi 1-8	Leptocheck	MAT s serotipi 9-11 in 14-15
1	8/00	1 : 150 2, 1 : 300 3, 1 : 150 5, 1 : 600 6, 1 : 30 8	++	/
2	32/00	1 : 200 1, 1 : 600 3, 1 : 600 6	++	/
3	109/00	1 : 500 1 delna aglutinacija 1,2,5	--	neg
4	123/00	1 : 100 1, 1 : 300 4	++	/
5	128/00	1 : 150 1, 1 : 400 4	++	/
6	15/03	1 : 400 1, 1 : 100 5	++	/
7	16/03	1 : 400 1, 1 : 100 5	++	/
8	18/03	1 : 100 1	-, -, +/-, -, +/-	1 : 200 9
9	37/03	1 : 1600 8 delna aglutinacija 6,7	-, +, +, +	/
10	35/03	1 : 400 1, 1 : 100 5, 1 : 100 7, delna aglutinacija 2	----	1 : 200 9
11	45/03	1 : 800 2, 1 : 400 3, 1 : 400 4, 1 : 400 6, 1 : 1600 5, 1 : 400 6, 1 : 800 7	++	/
12	55/03	1 : 200 1, 1 : 800 2, 1 : 400 3, 1 : 800 4, 1 : 400 5, 1 : 400 6, 1 : 800 7, delna aglutinacija 8	++	/
13	62/03	1 : 200 1, delna aglutinacija 2,8	++	/
14	71/03	1 : 3200 1, delna aglutinacija 2,5	++	/
15	74/03	1 : 1600 8 delna aglutinacija 2,6,7	----	1 : 400 9, delna aglutinacija 10,14
16	91/03	1 : 800 8 delna aglutinacija 2,3,7	+/-, +, +	/
17	97/03	1 : 200 3 delna aglutinacija 2,6,7,8	----	neg
18	110/03	1 : 100 6, delna aglutinacija 2,3	----	ni več vzorca
19	112/03	1 : 800 1, 1 : 100 5, delna aglutinacija 3,8	++	/
20	113/03	1 : 200 3 delna aglutinacija 2	-, +/-, -, -	neg delna aglutinacija 9,15
21	144/03	1 : 100 1, delna aglutinacija 5,8	++	/
22	149/03	1 : 1600 2, 1 : 400 3, 1 : 400 4, 1 : 100 5, 1 : 3200 6, delna aglutinacija 1,7	++	/
23	154/03	1 : 3200 2, 1 : 400 3, 1 : 400 4, 1 : 400 5, 1 : 3200 6, delna aglutinacija 1,7	++	/
24	156/03	1 : 200 2, 1 : 100 3, delna aglutinacija 4,7	++	/
25	159/03	1 : 200 delna aglutinacija 3	-, +/-, -, +/-, +/-	neg

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Rezultati testiranja vzorcev seruma bolnikov z mikroaglutinacijskim (MAT) testom in testom Leptocheck

Zaporedna številka vzorca	Številka in leto vzorca	MAT s serotipi 1-8	Leptocheck	MAT s serotipi 9-11 in 14-15
26	166/03	1 : 800 2, 1 : 200 3, 1 : 800 4, 1 : 400 5, 1 : 800 6 delna aglutinacija 7	-, +, +	/
27	176/03	1 : 400 1 delna aglutinacija 2,5,6,7	----	1 : 400 9
28	213/03	1 : 1600 3, delna aglutinacija 4,5,6,7	++	/
29	219/03	1 : 100 8 delna aglutinacija 2,6,7	-, +, +	/
30	262/03	1 : 200 6, delna aglutinacija 2,3,5	++	/
31	264/03	1 : 200 1 delna aglutinacija 5,6	+/-, +, +	/
32	285/03	1 : 100 2, 1 : 400 6, delna aglutinacija 3,5,7,8	++	/
33	393/03	1 : 400 2, 1 : 100 3, 1 : 400 4, 1 : 200 5, 1 : 800 6, 1 : 800 7, 1 : 100 8	-, +, +, +	/
34	301/03	1 : 200 6, delna aglutinacija 2	++	/
35	306/03	1 : 100 2, 1 : 200 3, delna aglutinacija 6,8	++	/
36	320/03	1 : 800 2 delna aglutinacija 2,3	-, +, +, +	/
37	323/03	1 : 200 2, 1 : 100 3, delna aglutinacija 5,7,8	++	/
38	327/03	1 : 200 6, delna aglutinacija 2,3	++	/
39	335/03	1 : 100 2, 1 : 100 3, 1 : 100 6, 1 : 100 7	++	/
40	337/03	1 : 100 2, 1 : 100 3, 1 : 400 6, 1 : 400 7	++	/
41	343/03	1 : 400 2, 1 : 200 3, delna aglutinacija 5,7,8	++	/
42	350/03	1 : 200 2, 1 : 100 3, 1 : 200 6, 1 : 100 7	++	/
43	364/03	1 : 100 2, 1 : 400 6	++	/
44	22/04	1 : 200 2, 1 : 200 3	+++	/
45	42/04	1 : 200 2, > 1 : 12800 3, 1 : 100 4, 1 : 100 5, 1 : 100 6, 1 : 1600 7	+++	/
46	46/04	1 : 100 6 delna aglutinacija 2,3,4,7	+, -, -	delna aglutinacija 1 : 50 9
47	51/04	1 : 100 2, 1 : 200 4, 1 : 100 5, 1 : 100 6, 1 : 800 7, > 1 : 12800 3	+++	/
48	54/04	1 : 100 2, 1 : 800 3, 1 : 100 4, delna aglutinacija 5,6	+++	/
49	55/04	1 : 100 3, 1 : 100 4, 1 : 200 7, delna aglutinacija 2,5	+++	/
50	57/04	1 : 200 6, 1 : 100 8	---	neg delna aglutinacija 9
51	63/04	1 : 200 6, delna aglutinacija 2,3,4	+++	/
52	66/04	1 : 100 6 delna aglutinacija 1,3	---	neg delna aglutinacija 9
53	72/04	1 : 200 5, 1 : 100 6	---	neg delna aglutinacija 9
54	115/04	1 : 400 1, delna aglutinacija 2,3,5,7	+++	/
55	116/04	1 : 100 7 delna aglutinacija 2,5,8	----	1 : 100 9 delna aglutinacija 10,15

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Rezultati testiranja vzorcev seruma bolnikov z mikroaglutinacijskim (MAT) testom in testom Leptocheck

Zaporedna številka vzorca	Številka in leto vzorca	MAT s serotipi 1-8	Leptocheck	MAT s serotipi 9-11 in 14-15
56	161/04	1 : 100 6, 1 : 200 3, delna aglutinacija 7,8	++	/
57	181/04	1 : 100 3, delna aglutinacija 2,6,7	----	neg delna aglutinacija 9
58	182/04	1 : 200 3 delna aglutinacija 2,7	----	neg delna aglutinacija 10
59	220/04	1 : 100 2, 1 : 3200 3, 1 : 100 6, 1 : 800 7, delna aglutinacija 5	++	/
60	221/04	1 : 100 2, 1 : 6400 3, 1 : 100 6, 1 : 100 7	++	/
61	256/04	1 : 100 7, 1 : 800 3, delna aglutinacija 2,6	++	/
62	301/04	1 : 6400 8, delna aglutinacija 3	++	/
63	332/04	1 : 100 1, 1 : 100 3, delna aglutinacija 2,4	++	/
64	336/04	1 : 100 6, delna aglutinacija 2,3,7	++	/
65	339/04	1 : 3200 8, delna aglutinacija 2,3,	++	/
66	357/04	1 : 3200 8, delna aglutinacija 2,3,7	++	/
67	361/04	1 : 800 2, 1 : 1600 3, 1 : 400 6, 1 : 800 7, delna aglutinacija 1	++	/
68	362/04	1 : 400 1, 1 : 100 3, delna aglutinacija 2,7	++	/
69	367/04	1 : 100 1, 1 : 100 3 delna aglutinacija 2,6,7	++++	/
70	370/04	1 : 1600 8, delna aglutinacija 2,3,6,7	++	/
71	402/04	1 : 102400 2, 1 : 800 3, 1 : 102400 6, 1 : 800 7, delna aglutinacija 4,5	++	/
72	405/04	1 : 200 8, delna aglutinacija 2,6,7	++	/
73	418/04	1 : 100 7, 1 : 1600 8 delna aglutinacija 2,3,6	----	1 : 200 9, 1 : 100 15 delna aglutinacija 10,14
74	421/04	1 : 400 3, delna aglutinacija 2,5,6,7	++	/
75	422/04	1 : 1600 8 delna aglutinacija 2,6,7	----	1 : 100 9
76	446/04	1 : 200 8, delna aglutinacija 2,6,7	+/-, +, +	/
77	447/04	1 : 800 8 delna aglutinacija 2,4,6,7	----	neg
78	450/04	1 : 1600 8 delna aglutinacija 1,2,6,7	----	1 : 100 9
79	457/04	1 : 800 3, delna aglutinacija 2,6,7	++	/
80	460/04	1 : 800 8 delna aglutinacija 2,6,7	---	1 : 100 9
81	463/04	1 : 800 8 delna aglutinacija 1,2,5,6,7	-----	neg delna aglutinacija 9,10,11,14,15
82	473/04	1 : 400 8 delna aglutinacija 2,6,7	----	neg
83	476/04	1 : 800 8 delna aglutinacija 2,6	----	neg
84	459/05	1 : 400 8 delna aglutinacija 2,7	-, +, -, +/-, -	neg

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Rezultati testiranja vzorcev seruma bolnikov z mikroaglutinacijskim (MAT) testom in testom Leptocheck

Zaporedna številka vzorca	Številka in leto vzorca	MAT s serotipi 1-8	Leptocheck	MAT s serotipi 9-11 in 14-15
85	830/05	1 : 800 8, delna aglutinacija 2,3,7	----	neg delna aglutinacija 9
86	1129/05	1 : 400 8, delna aglutinacija 2,3	++	/
87	1708/05	1 : 200 8 delna aglutinacija 2,3,7	----	neg
88	2335/05	1 : 400 8 delna aglutinacija 2	----	neg
89	2485/05	1 : 200 3, delna aglutinacija 2,7	++	/
90	2793/05	1 : 12800 3, delna aglutinacija 2,7	++	/
91	3882/05	1 : 200 8 delna aglutinacija 2,7	-, +/-, +, -, +/-	neg
92	4366/05	1 : 100 8 delna aglutinacija 2,7	----	1:100 9
93	4766/05	1 : 200 8 delna aglutinacija 2,7	----	neg delna aglutinacija 9
94	9651/05	1 : 200 3	----	neg delna aglutinacija 9
95	9791/05	1 : 400 8	+, -, +/-, -	neg
96	10730/05	1 : 100 3, delna aglutinacija 2,7	++	/
97	11675/05	1 : 400 1, 1 : 100 3, delna aglutinacija 2,7	++	/
98	11832/05	> 1 : 12800 3 delna aglutinacija 2,7	----	neg
99	11833/05	1 : 200 3, delna aglutinacija 2,5,7,8	++	/
100	12080/05	1 : 1600 1, delna aglutinacija 2,3,7	++	/
101	12339/05	> 1 : 12800 8 delna aglutinacija 2,3,7	----	1:200 9 delna aglutinacija 10,11,14,15
102	13963/05	> 1 : 12800 3 delna aglutinacija 2,7	----	neg delna aglutinacija 9
103	13977/05	1 : 400 1, 1 : 200 2, 1 : 1600 3, 1 : 800 5, 1 : 100 6, 1 : 800 7, 1 : 200 8	++	/
104	14389/05	1 : 100 1, 1 : 200 2, 1 : 800 3, 1 : 800 5, 1 : 200 7, 1 : 100 8, delna aglutinacija 6	++	/
105	14564/05	1 : 6400 1 delna aglutinacija 2,3,7	----	neg delna aglutinacija 10
106	14786/05	1 : 6400 1, 1 : 100 7 delna aglutinacija 2,3	----	1 : 100 9
107	16878/05	1 : 400 8, delna aglutinacija 7	++	/
108	17202/05	1 : 800 3, 1 : 200 7	++	/
109	24/06	1 : 6400 3, 1 : 800 7 delna aglutinacija 2,4,5,6	++	/
110	251/06	1 : 6400 3, 1 : 800 7 delna aglutinacija 2,4,5,7	++	/
111	812/06	1 : 12800 3 delna aglutinacija 2,7	----	neg
112	813/06	1 : 3200 3, 1 : 400 7, delna aglutinacija 2,4,8	++	/
113	1237/06	1 : 3200 3, 1 : 400 7, delna aglutinacija 1	++	/

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Rezultati testiranja vzorcev seruma bolnikov z mikroaglutinacijskim (MAT) testom in testom Leptocheck

Zaporedna številka vzorca	Številka in leto vzorca	MAT s serotipi 1-8	Leptocheck	MAT s serotipi 9-11 in 14-15
114	2081/06	1 : 800 3, 1 : 200 7	++	/
115	3203/06	1 : 400 3, 1 : 100 7	++	/
116	3649/06	1 : 1600 3 delna aglutinacija 2,7	-, -, +, +, -	neg
117	4708/06	1 : 800 7, 1 : 800 8 delna aglutinacija 3,6	-, -, +, +, +/-, -	neg delna aglutinacija 11,15
118	5022/06	1 : 200 3, delna aglutinacija 2,7	++	/
119	5347/06	1 : 200 7, 1 : 400 8 delna aglutinacija 2,6	----	neg
120	7032/06	1 : 200 7, 1 : 800 8	+/-, +, +	/
121	7425/06	1 : 400 3, 1 : 100 5, 1 : 200 6, 1 : 200 7, delna aglutinacija 1,2,4	++	/
122	8184/06	1 : 100 7, 1 : 200 8	-, +/-, +/-, +/-	neg
123	9518/06	1 : 200 7, 1 : 200 8	----	neg delna aglutinacija 14
124	10044/06	1 : 800 1, 1 : 100 6, delna aglutinacija 3,5	++	/
125	12610/06	1 : 100 7, 1 : 400 8	-, +/-, -, +, +	neg
126	1590/07	1 : 200 7, 1 : 200 8 delna aglutinacija 2	-, +/-, -, +/-	1 : 100 9 delna aglutinacija 10
127	5063/07	1 : 100 8	----	1 : 100 9
128	7192/07	1 : 100 8, delna aglutinacija 2,7	++	/
129	8141/07	1 : 3200 3, 1 : 200 6 delna aglutinacija 1,4	-, -, +, +, +	1 : 800 9, 1 : 200 11 delna aglutinacija 14
130	8415/07	1 : 200 3, 1 : 100 7, delna aglutinacija 1,2,5,6	++	/
131	8416/07	1 : 400 8	++	/
132	8480/07	1 : 100 8 delna aglutinacija 6,7	----	neg
133	8557/07	1 : 100 2, 1 : 400 3, 1 : 200 5, 1 : 100 6, delna aglutinacija 4,7	++	/
134	8881/07	1 : 200 3, 1 : 100 7, 1 : 200 8, delna aglutinacija 1,2,5,6	++	/
135	9031/07	1 : 200 2, 1 : 400 6, delna aglutinacija 3,5,7	++	/
136	9085/07	1 : 100 8 delna aglutinacija 6,7	----	neg
137	9694/07	1 : 200 1	-, +/-, +, -	neg
138	9912/07	1 : 400 6, 1 : 100 7	++	/
139	10586/07	1 : 400 3, 1 : 100 5, 1 : 800 8, delna aglutinacija 7	++	/
140	11187/07	1 : 200 1, 1 : 200 7, 1 : 100 8	++	/
141	11229/07	1 : 800, delna aglutinacija 7,8	++	/
142	12638/07	1 : 400 4, 1 : 100 7, 1 : 400 8 1,3,5	-, +, +, +	/

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Rezultati testiranja vzorcev seruma bolnikov z mikroaglutinacijskim (MAT) testom in testom Leptocheck

Zaporedna številka vzorca	Številka in leto vzorca	MAT s serotipi 1-8	Leptocheck	MAT s serotipi 9-11 in 14-15
143	12658/07	1 : 100 7, 1 : 100 8	++	/
144	13010/07	1 : 100 1 delna aglutinacija 7,8	+/-, +/-, +/-	/
145	13136/07	1 : 100 1	----	neg
146	105/08	1 : 6400 3	++	/
147	1205/08	1 : 100 8	-, +/-, +/-	neg
148	6939/08	1 : 100 6, 1 : 12800 7, 1 : 51200 8	-, +, +/-, -	neg delna aglutinacija 9
149	7498/08	1 : 200 8	+/-, +/-, +/-	/
150	7703/08	1 : 600	+/-, +, +/-	/
151	7970/08	1 : 100, 1 : 128000 6	+/-, +, +/-	/
152	8109/08	1 : 1600 8, 1 : 100 6 delna aglutinacija 1,7	-, +/-, +	/
153	8262/08	1 : 100 6, 1 : 800 7, 1 : 12800 8	----	/
154	8409/08	1 : 200 1, 1 : 400 6, 1 : 800 7, 1 : 12800 8	++	/
155	9303/08	1 : 400 6, delna aglutinacija 2,4,7	++	/
156	11711/08	1 : 100 1, 7	++	/
157	12358/08	1 : 400 3	++	
Zaporedna številka vzorca	Številka in leto vzorca	MAT s serotipi 1-8	Leptocheck	MAT ponovitev s serotipi 1-8 + MAT s serotipi 9-11 in 14-15
158	22/08	neg	+++	neg
159	42/08	neg	---	/
160	106/08	neg	---	/
161	151/08	neg	--	/
162	359/08	neg delna aglutinacija 6,7	+, -, +/-, +/-, +/-	neg
163	360/08	neg	--	/
164	384/08	neg	--	/
165	385/08	neg delna aglutinacija 6,7	--	/
166	465/08	neg	--	/
167	561/08	neg	--	/
168	562/08	neg	--	/
169	616/08	neg	+, -, +, +	neg
170	801/08	neg	--	/
171	802/08	neg	--	neg

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Rezultati testiranja vzorcev seruma bolnikov z mikroaglutinacijskim (MAT) testom in testom Leptocheck

Zaporedna številka vzorca	Številka in leto vzorca	MAT s serotipi 1-8	Leptocheck	MAT ponovitev s serotipi 1-8 + MAT s serotipi 9-11 in 14-15
172	803/08	neg	-, +/-, -	neg
173	804/08	neg	+, -, -, -	/
174	1017/08	neg	+, -, -, -	/
175	1266/08	neg	--	/
176	1329/08	neg	-, +/-, -	/
177	2399/08	neg	--	/
178	2486/08	neg	--	/
179	2571/08	neg	--	/
180	2753/08	neg	--	/
181	2800/08	neg	--	/
182	2860/08	neg	--	/
183	2861/08	neg delna aglutinacija 2,6,7	--	/
184	2862/08	neg	+, +, +/-	neg delna aglutinacija 4,8,9 2x ponovili
185	2986/08	neg	--	/
186	3058/08	neg	--	neg
187	3061/08	neg	--	/
188	3116/08	neg	+, -, -, -	/
189	3176/08	neg delna aglutinacija 2,7	--	/
190	3321/08	neg	--	/
191	3385/08	neg	--	/
192	3473/08	neg	--	/
193	3474/08	neg delna aglutinacija 7	--	/
194	3491/08	neg	+, -, +/-, -, -	neg delna aglutinacija 4,6,8,9
195	3492/08	neg	--	/
196	3512/08	neg	--	/
197	3513/08	neg	--	/
198	3596708	neg	-, +/-, -	/
199	3672/08	neg	--	/
200	3712/08	neg	--	/
201	3777/08	neg	---	/
202	3789/08	neg	--	/
203	3790/08	neg	--	/

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Rezultati testiranja vzorcev seruma bolnikov z mikroaglutinacijskim (MAT) testom in testom Leptocheck

Zaporedna številka vzorca	Številka in leto vzorca	MAT s serotipi 1-8	Leptocheck	MAT ponovitev s serotipi 1-8 + MAT s serotipi 9-11 in 14-15
204	3898/08	neg delna aglutinacija 2,4	--	neg
205	3903/08	neg	--	/
206	3969/08	neg	+,-,-,-,-	/
207	4087/08	neg	+,-,+,-,+/-	neg 2 x ponovili
208	4256/08	neg	--	/
209	4376/08	neg	--	/
210	4396/08	neg	--	/
211	4511/08	neg	--	/
212	4512/08	neg	+/-,-,-,-,-	/
213	4522/08	neg	+++	neg delna aglutinacija 9
214	4578/08	neg	--	/
215	4714/08	neg	+,-,-,-,-	/
216	4676/08	neg	--	/
217	4742/08	neg	--	/
218	4793/08	neg	--	/
219	4836/08	neg	--	/
220	4879/08	neg	--	/
221	4883/08	neg	--	/
222	4976/08	neg	--	/
223	4977/08	neg	--	/
224	4991/08	neg	--	/
225	5138/08	neg	--	/
226	5215/08	neg	+++	neg 2 x ponovili
227	5408/08	neg	--	/
228	5609/08	neg	--	/
229	5661/08	neg	--	/
230	5686/08	neg	--	/
231	5757/08	neg	--	/
232	5758/08	neg	--	/
233	5759/08	neg	--	/
234	5825/08	neg	--	/
235	5828/08	neg	--	/
236	5877/08	neg	--	/

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Rezultati testiranja vzorcev seruma bolnikov z mikroaglutinacijskim (MAT) testom in testom Leptocheck

Zaporedna številka vzorca	Številka in leto vzorca	MAT s serotipi 1-8	Leptocheck	MAT ponovitev s serotipi 1-8 + MAT s serotipi 9-11 in 14-15
237	5949/08	neg	--	/
238	5968/08	neg	--	/
239	5989/08	neg	+, -, +, +, +	neg
240	6088/08	neg	--	/
241	6093/08	neg	--	/
242	6164/08	neg	--	/
243	6262/08	neg	+, -, +/-, +/-, +	neg delna aglutinacija 9
244	6321/08	neg	--	/
245	6416/08	neg	--	/
246	6417/08	neg delna aglutinacija 2,3	--	/
247	6455/08	neg	--	/
248	6495/08	neg	--	/
249	6581/08	neg	--	/
250	6604/08	neg	--	/
251	6605/08	neg	-, +/-, +/-, +/-	neg
252	6651/08	neg	--	neg delna aglutinacija 9
253	6895/08	neg	+, -, -, -, -	neg
254	6954/08	neg delna aglutinacija 6	+++	neg
255	6984/08	neg	--	/
256	7191/08	neg	--	/
257	7192/08	neg	--	/
258	7196/08	neg	+, -, +/-, -, +/-	neg delna aglutinacija 4,6,8,9
259	7348/08	neg	--	/
260	7428/08	neg	--	/
261	7596/08	neg	+++	neg
262	7597/08	neg delna aglutinacija 3,6,7	--	/
263	7608/08	neg delna aglutinacija 6	+, -, -, +, +/-	neg delna aglutinacija 6,8
264	7658/08	neg	--	/
265	7759/08	neg delna aglutinacija 7	--	/
266	7771/08	neg delna aglutinacija 7	--	/
267	7842/08	neg	--	/
268	8057/08	neg	--	/

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Rezultati testiranja vzorcev seruma bolnikov z mikroaglutinacijskim (MAT) testom in testom Leptocheck

Zaporedna številka vzorca	Številka in leto vzorca	MAT s serotipi 1-8	Leptocheck	MAT ponovitev s serotipi 1-8 + MAT s serotipi 9-11 in 14-15
269	8098/08	neg delna aglutinacija 1,3	--	/
270	8110/08	neg delna aglutinacija 6	--	/
271	8206/08	neg	--	/
272	8248/08	neg	--	/
273	8263/08	neg	--	/
274	8304/08	neg delna aglutinacija 6,7	--	/
275	8332/08	neg	--	/
276	8334/08	neg delna aglutinacija 1,6,7,8	+++	1,7,9 delna 1 : 100 5 in delna 1 : 100 8 2 x ponovili
277	8335/08	neg delna aglutinacija 6,7	+++	neg delna aglutinacija 2
278	8350/08	neg	--	/
279	8410/08	neg	+,-,-,-	/
280	8422/08	neg	--	/
281	8694/08	neg	--	/
282	9051/08	neg	--	/
283	9056/08	neg	--	/
284	9057/08	neg 7, delna aglutinacija 1:100 8	+,-,-,-	1 : 200 8 delna aglutinacija 1,2,4 2 x ponovili
285	9058/08	neg	--	/
286	9354/08	neg	--	/
287	9590/08	neg	--	/
288	9616/08	neg delna aglutinacija 5,1,7	+++	neg delna aglutinacija 1,4 1 : 100 delna aglutinacija na 8
289	9716/08	neg	+,-,+/-,+/-	neg delna aglutinacija 10,14 2 x ponovili
290	10003/08	neg	--	/
291	10005/08	neg	--	/
292	10045/08	neg	+++	neg
293	10200/08	neg	--	/
294	10216/08	neg	--	/
295	10291/08	neg	--	/
296	10358/08	neg	+++	neg
297	10562/08	neg	--	/

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Rezultati testiranja vzorcev seruma bolnikov z mikroaglutinacijskim (MAT) testom in testom Leptocheck

Zaporedna številka vzorca	Številka in leto vzorca	MAT s serotipi 1-8	Leptocheck	MAT ponovitev s serotipi 1-8 + MAT s serotipi 9-11 in 14-15
298	10595/08	neg	+, +, +/-	neg
299	10631/08	neg	--	/
300	10825/08	neg	--	/
301	10912/08	neg	--	/
302	10917/08	neg	--	/
303	10923/08	neg	--	/
304	10978/08	neg	--	/
305	11088/08	neg	+++	neg
306	11241/08	neg	--	/
307	11323/08	neg	--	/
308	11375/08	neg	--	/
309	11454/08	neg delna aglutinacija 6,7	+++	neg
310	11507/08	neg	+, +/-, -, -	neg
311	11508/08	neg delna aglutinacija 7	+++	neg delna aglutinacija 2,3,4,5,7,9,10
312	11658/08	neg delna aglutinacija 6,7	+++	neg
313	11710/08	neg	--	/
314	11735/08	neg	--	/
315	11838/08	neg	--	/
316	11930/08	neg	--	/
317	12060/08	neg	--	/
318	12104/08	neg	--	/
319	12152/08	neg	--	/
320	12238/08	neg	--	/
321	12508/08	neg	--	/
322	12526/08	neg	+++	neg delna aglutinacija 8 2 x ponovili
323	12627/08	neg	+, -, +/-, -	neg
324	12637/08	neg	--	/
325	12758/08	neg	--	/
326	12853/08	neg	--	/
327	12854/08	neg	--	/

Se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Rezultati testiranja vzorcev seruma bolnikov z mikroaglutinacijskim (MAT) testom in testom Leptocheck

Zaporedna številka vzorca	Številka in leto vzorca	MAT s serotipi 1-8	Leptocheck	MAT ponovitev s serotipi 1-8 + MAT s serotipi 9-11 in 14-15
328	12875/08	neg	--	/
329	12931/08	neg	--	/
330	12971/08	neg delna aglutinacija 6	--	/
331	12986/08	neg	--	/
332	13206/08	neg	--	/
333	13387/08	neg	--	/
334	13388/08	neg delna aglutinacija 6	--	/
335	13497/08	neg	--	/
336	13522/08	neg delna aglutinacija 6	--	/
337	13563/08	neg	--	/
338	12982/09	neg	-	/
339	12937/09	neg	-	/
340	13018/09	neg	-	/