MEDICINSKI RAZGLEDI

LETNIK 54 SUPPLEMENT 2 NOVEMBER 2015

7. BANIČEVI DNEVI: OKUŽBE PREBAVIL

5 Spremljanje nalezljivih bolezni, ki se prenašajo s hrano in vodo – *Eva Grilc, Maja Sočan*

11 Okolje in hrana kot vir okužbe – *Stanka Vadnjal, Urška Henigman, Andrej Kirbiš, Majda Biasizzo*

21 Molekularna epidemiologija parazitskih okužb prebavil – *Barbara Šoba, Miha Skvarč*

29 Cepiva proti črevesnim nalezljivim obolenjem – pregled cepiv v uporabi in v razvoju – *Zoran Simonović, Alenka Trop Skaza*

37 Imunski odziv in razvoj cepiv proti bakteriji *Helicobacter pylori* – *Alojz Ihan*

45 Vpliv mikrobioma na človekovo zdravje – *Gorazd Avguštin*

53 Prebavila kot vir okužbe pri imunsko kompromitiranih hematoloških bolnikih – *Enver Melkić, Samo Zver*

61 Sindrom bakterijskega preraščanja tankega črevesa – *Samo Plut, Mateja Pirš*

67 Različni pristopi za študije interakcij črevesne mikrobiote in bakterije *Clostridium difficile* – *Sandra Janežič, Aleksander Mahnič, Maja Rupnik*

73 Problematika odkrivanja bakterij *Escherichia coli*, ki povzročajo črevesne okužbe – *Marija Trkov, Tjaša Žohar Čretnik, Mateja Pirš, Ingrid Berce, Mateja Ravnik, Metka Paragi*

83 Napredki pri diagnostiki klasičnih črevesnih bakterijskih patogenov – *Mateja Pirš, Tjaša Cerar Kišek, Jernej Guzej, Barbara Stalowsky Poglajen, Tina Plankar Srovin, Tatjana Lejko Zupanc*

93 Novosti na področju virusnih okužb prebavil – *Andrej Steyer, Tina Naglič, Marko Kolenc, Martin Sagadin, Mateja Poljšak-Prijatelj*

103 Okužbe prebavil pri majhnih otrocih – *Monika Jevšnik, Andrej Steyer, Miroslav Petrovec*

111 Sindromski pristop v diagnostiki črevesnih okužb – *Mateja Pirš, Tjaša Cerar Kišek, Barbara Šoba, Miha Skvarč, Andrej Steyer, Marko Kolenc, Mateja Poljšak-Prijatelj*

121 Kolitis, povzročen z virusom citomegalije – *Nina Zidar, Ivan Ferkolj, Miroslav Petrovec*

127 Mikrobiološka diagnostika okužbe z bakterijo *Helicobacter pylori* – ali jo znamo pravilno uporabiti? – *Samo Jeverica, Samo Plut, Borut Štabuc*

135 Stafilokokna zastrupitev z živili – priporočila za obravnavo izbruha ali suma na izbruh in osnovne higienske postopke preprečevanja – *Eva Grilc, Nataša Šimac, Majda Pohar, Zoran Simonovič, Tatjana Frelih, Simona Uršič*

147 Okužbe prebavil po vrnitvi iz tropov – *Peter Kordiš, Veronika Grilj, Rok Grilj, Tadeja Kotar*

155 Driska pri bolnikih z imunsko motnjo – *Janez Tomažič, Mateja Pirš, Miha Skvarč*

167 Črevesne bolnišnične okužbe – *Tatjana Lejko Zupanc, Mateja Logar*

173 Obvladovanje črevesnih virusnih okužb v bolnišnicah in ustanovah za kronično nego – *Tatjana Mrvič, Tatjana Lejko Zupanc*

179 Obvladovanje okužb s *Clostridium difficile* v bolnišnicah – *Helena Ribič*

187 V pričakovanju novih smernic Ameriškega združenja za infekcijske bolezni za obravnavo infekcijske driske – *Mateja Logar*

195 Okužbe z večkratno odpornim kampilobaktrom v Sloveniji – *Irena Grmek Košnik, Ingrid Berce, Marija Trkov, Mateja Ravnik, Matejka Bremec, Zdenka Horvat Šardi, Alenka Štorman, Tatjana Harlander, Živa Petrovič, Mateja Pirš*

203 *Campylobacter concisus* – porajajoči se patogen: primeri okužb pri otrocih na Goriškem – *Ingrid Berce, Tanja Milanič Koron, Mateja Pirš, Romina Kofol*

213 Cista v jetrih zaradi okužbe s trakuljo rodu *Echinococcus* spp. – *Jasna Dragičević, Tadeja Kotar, Janez Tomažič, Barbara Šoba, Ana Kovač, Nina Starašinič, Miha Skvarč*

221 Povečano število primerov driske pri otrocih zaradi okužbe s praživaljo rodu *Cryptosporidium* spp. – *Matej Kokalj, Barbara Šoba, Eva Grilc, Jana Svetičič Marinko, Miha Skvarč*

229 Določevanje stafilokoknih toksinov pri zastrupitvah s hrano – prikaz primera z Dolenjske – *Urška Dermota, Marta Košir, Bonia Miljavac, Irena Grmek Košnik*

MEDICINSKI RAZGLEDI
Letnik 54
Supplement 2
November 2015

7. BANIČEVI DNEVI: OKUŽBE PREBAVIL
Zbornik predavanj

ORGANIZATORJI
Sekcija za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe SZD
Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Novo mesto, Center za Medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano

GLAVNI UREDNIK
prof. dr. Miroslav Petrovec

ORGANIZACIJSKI IN STROKOVNI ODBOR
Tatjana Harlander,
prof. dr. Miroslav Petrovec,
asist. dr. Mateja Pirš,
mag. Tjaša Žohar Čretnik

RECENZENTI
prof. dr. Miroslav Petrovec,
asist. dr. Mateja Pirš

UREDNIŠKA EKIPA
Valentina Ahac, Tjaša Gortnar, Sara Kukman, Miha Oražem, Nina Zupančič

UREDNIŠTVO
Društvo Medicinski razgledi
Korytkova ulica 2
1000 Ljubljana
Slovenija

T (01) 524 23 56 **F** (01) 543 70 11
E info@medrazgl.si
S www.medrazgl.si

POR: 02014-0050652588

GLAVNI UREDNIK
Rok Kučan

ODGOVORNI UREDNIK
Matej Goričar

TEHNIČNI UREDNIKI
Valentina Ahac, Sara Kukman, Urban Neudauer

UREDNIŠKI ODBOR
Tjaša Divjak, Jernej Drobež, Tjaša Gortnar, Kristina Jevnikar, Nik Krajnc, Ožbej Kunšič, Klemen Lovšin, Andraž Nendl, Miha Oražem, Saša Štupar, Lana Vodnik, Dinko Zavrl, Črt Zavrnik, Hana Zavrtanik

LEKTOR
Kristijan Armeni

PRELOM
Boex DTP, d. o. o.

TISK
Itagraf, d. o. o.

FOTOGRAFIJA NA NASLOVNICI
Vinko Šribar, MGMl

ZBORNIK ABSTRAHIRAJO IN/ALI INDEKSIRAJO
Biological Abstracts, Biomedicina Slovenica, Bowker International, Chemical Abstracts, Nutritional Abstracts

---

COPYRIGHT © MEDICINSKI RAZGLEDI 2015
Vse pravice pridržane. Razmnoževanje ali razširjanje posameznih delov ali celotne publikacije s katerim koli sredstvom brez pisnega privoljenja založbe je prepovedano.

MEDICINSKI RAZGLEDI

ARHIV

MEDICINSKI RAZGLEDI

LETNIK 54 SUPPLEMENT 2 NOVEMBER 2015

7. Baničevi dnevi: Okužbe prebavil

5 Spremljanje nalezljivih bolezni, ki se prenašajo s hrano in vodo / Surveillance of Foodborne and Waterborne Diseases – *Eva Grilc, Maja Sočan*

11 Okolje in hrana kot vir okužbe / Environment and Food as a Source of Infection – *Stanka Vadnjal, Urška Henigman, Andrej Kirbiš, Majda Biasizzo*

21 Molekularna epidemiologija parazitskih okužb prebavil / Molecular Epidemiology of the Intestinal Parasitoses – *Barbara Šoba, Miha Skvarč*

29 Cepiva proti črevesnim nalezljivim obolenjem – pregled cepiv v uporabi in v razvoju / Enteric Infections Vaccines – A Review of Vaccines Currently in Use and in Development – *Zoran Simonović, Alenka Trop Skaza*

37 Imunski odziv in razvoj cepiv proti bakteriji *Helicobacter pylori* / The Immune Response and the Development of Vaccines against *Helicobacter pylori* – *Alojz Ihan*

45 Vpliv mikrobioma na človekovo zdravje / The Effect of Microbiome on Human Health – *Gorazd Avguštin*

53 Prebavila kot vir okužbe pri imunsko kompromitiranih hematoloških bolnikih / Gastrointestinal Tract as a Source of Infection in Immunocompromised Patients – *Enver Melkić, Samo Zver*

61 Sindrom bakterijskega preraščanja tankega črevesa / Small Intestinal Bacterial Overgrowth Syndrome – *Samo Plut, Mateja Pirš*

67 Različni pristopi za študije interakcij črevesne mikrobiote in bakterije *Clostridium difficile* / Different Approaches to Studies of Gut Microbiota and *Clostridium difficile* Interactions – *Sandra Janežič, Aleksander Mahnič, Maja Rupnik*

73 Problematika odkrivanja bakterij *Escherichia coli*, ki povzročajo črevesne okužbe / Problems of Diarrheagenic *Escherichia coli* Detection – *Marija Trkov, Tjaša Žohar Čretnik, Mateja Pirš, Ingrid Berce, Mateja Ravnik, Metka Paragi*

83 Napredki pri diagnostiki klasičnih črevesnih bakterijskih patogenov / New Approaches in Detection of Classical Bacterial Diarrheal Pathogens – *Mateja Pirš, Tjaša Cerar Kišek, Jernej Guzej, Barbara Stalowsky Poglajen, Tina Plankar Srovin, Tatjana Lejko Zupanc*

93 Novosti na področju virusnih okužb prebavil / Novelties in Gastrointestinal Viral Infections – *Andrej Steyer, Tina Naglič, Marko Kolenc, Martin Sagadin, Mateja Poljšak-Prijatelj*

103 Okužbe prebavil pri majhnih otrocih / Gastrointestinal Infections in Small Children – *Monika Jevšnik, Andrej Steyer, Miroslav Petrovec*

111 Sindromski pristop v diagnostiki črevesnih okužb / Syndromic Approach in Diagnostics of Enteric Infections – *Mateja Pirš, Tjaša Cerar Kišek, Barbara Šoba, Miha Skvarč, Andrej Steyer, Marko Kolenc, Mateja Poljšak-Prijatelj*

121 Kolitis, povzročen z virusom citomegalije / Cytomegalovirus Colitis – *Nina Zidar, Ivan Ferkolj, Miroslav Petrovec*

127 Mikrobiološka diagnostika okužbe z bakterijo *Helicobacter pylori* – ali jo znamo pravilno uporabiti? / The Microbiological Diagnostics of Infection with *Helicobacter pylori* – Do We Know How to Use it Correctly? – *Samo Jeverica, Samo Plut, Borut Štabuc*

135 Stafilokokna zastrupitev z živili – priporočila za obravnavo izbruha ali suma na izbruh in osnovne higienske postopke preprečevanja / Staphylocccocal Food Poisoning – Guidelines for Investigation in Case of an Outbreak or a Possible Outbreak and for Basic Hygienic Preventive Measures – *Eva Grilc, Nataša Šimac, Majda Pohar, Zoran Simonovič, Tatjana Frelih, Simona Uršič*

147 Okužbe prebavil po vrnitvi iz tropov / Gastrointestinal Infections in Returned Travelers from the Tropics – *Peter Kordiš, Veronika Grilj, Rok Grilj, Tadeja Kotar*

155 Driska pri bolnikih z imunsko motnjo / Diarrhea in Immunocompromised Patients – *Janez Tomažič, Mateja Pirš, Miha Skvarč*

167 Črevesne bolnišnične okužbe / Nosocomial Gastrointestinal Infections – *Tatjana Lejko Zupanc, Mateja Logar*

173 Obvladovanje črevesnih virusnih okužb v bolnišnicah in ustanovah za kronično nego / Control of Viral Enteric Infections in Hospitals and Long-Term Care Facilities – *Tatjana Mrvič, Tatjana Lejko Zupanc*

179 Obvladovanje okužb s *Clostridium difficile* v bolnišnicah / Management of *Clostridium difficile* Infections in Hospitals – *Helena Ribič*

187 V pričakovanju novih smernic Ameriškega združenja za infekcijske bolezni za obravnavo infekcijske driske / In Anticipation of the New Infectious Diseases Society of America Guidelines for the Management of Infectious Diarrhea – *Mateja Logar*

195 Okužbe z večkratno odpornim kampilobaktrom v Sloveniji / Infections With Multiple Resistant Campylobacter in Slovenia – *Irena Grmek Košnik, Ingrid Berce, Marija Trkov, Mateja Ravnik, Matejka Bremec, Zdenka Horvat Šardi, Alenka Štorman, Tatjana Harlander, Živa Petrovič, Mateja Pirš*

203 *Campylobacter concisus* – porajajoči se patogen: primeri okužb pri otrocih na Goriškem / *Campylobacter concisus* – An Emerging Pathogen: Cases of Enteric Infections in Children from the Gorica Region – *Ingrid Berce, Tanja Milanič Koron, Mateja Pirš, Romina Kofol*

213 Cista v jetrih zaradi okužbe s trakuljo rodu *Echinococcus* spp. / Cystic Lesion in the Liver Caused by *Echinococcus* spp. – *Jasna Dragičević, Tadeja Kotar, Janez Tomažič, Barbara Šoba, Ana Kovač, Nina Starašinič, Miha Skvarč*

221 Povečano število primerov drisk pri otrocih zaradi okužbe s praživaljo rodu *Cryptosporidium* spp. / Increased Number of Diarrhea Cases in Children due to Infection with Protozoan *Cryptosporidium* spp. – *Matej Kokalj, Barbara Šoba, Eva Grilc, Jana Svetičič Marinko, Miha Skvarč*

229 Določevanje stafilokoknih toksinov pri zastrupitvah s hrano – prikaz primera z Dolenjske / Detecting Staphylococcal Enterotoxins in Food Poisoning: A Case Study of an Outbreak in the Lower Carniola region – *Urška Dermota, Marta Košir, Bonia Miljavac, Irena Grmek Košnik*

Predgovor

Za letošnje Baničeve dneve, že 7. po vrsti, smo si v Sekciji za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe Slovenskega zdravniškega društva izbrali temo Okužbe prebavil. Podobno temo smo imeli leta 2007, ko se dvodnevno srečanje naše sekcije še ni imenovalo po cenjenem profesorju dr. Stanku Baniču.

Živimo v času popolne globalizacije, ko lahko informacije v trenutku prepotujejo na tisoče kilometrov. Novost, zasnovana na Kitajskem, je lahko čez nekaj dni že na našem tržišču. Tudi za bolezenske agense ni več meja – lep primer smo imeli v izbruhu vročice ebola, ki še nikoli do sedaj ni prepotovala toliko kilometrov. V sedanjem trenutku moram vsekakor omeniti reko migrantov, beguncev z Bližnjega vzhoda, ki sicer samo prečkajo našo državo, a s seboj prinašajo mikrobe in bolezni, ki nam lahko povzročijo dodatne probleme. Saj bomo zmogli, ampak to bo terjalo dodatne finančne in tehnične izzive!

Tudi tokrat bom zapisala, da so bolezni prebavil v svetu velik zdravstveni problem. Vse se začne z zdravo, pitno vodo, z neoporečno hrano in nadaljuje s higieno rok tako doma kot v zdravstvenih ustanovah. Da bi zmogli povzročitelje določiti čim bolj natančno, smo v laboratorijih pridobili aparature in razvili metode, o katerih smo pred desetimi leti samo sanjali. Tudi ta najnovejša tehnologija ni več tako draga, se pa sprašujemo, če si bo naše čedalje bolj obubožano zdravstvo lahko privoščilo vso to diagnostiko.

Vedno začnemo z epidemiološkimi podatki, avtorji nam bodo predstavili tudi nekatere novosti pri cepljenju proti povzročiteljem okužb prebavil. Obravnava nekega izbruha je nujno timsko delo in avtorji nam predstavljajo primere dobre prakse. Prispevki nam ponujajo zadnje novosti in posebnosti o virusnih, bakterijskih in parazitnih povzročiteljih črevesnih bolezni. Črevesna flora je pri zdravju človeka zelo pomembna, a hkrati predstavlja za imunsko oslabljenega bolnika velik rezervoar bakterij, virusov in praživali, ki v določenem trenutku lahko odločajo o zdravju ali bolezni takega pacienta. Spremenjena črevesna flora kot nosilka raznih večkratno odpornih bakterij pa nam pomeni vsakodnevni izziv v preprečevanju bolnišničnih okužb. Pred nekaj leti smo se čudili bolnišnicam, v katerih so se borili z bakterijo *C. difficile*, danes je to vsakodnevna izolacija v večini naših laboratorijev.

Kako obvladovati izbruhe, kako peljati preprečevanje prenosov v bolnišnicah, kako pristopati k obravnavi neke diareje v luči sodobnih, zmogljivih metod, različnih smernic ter standardov – upamo, da bomo odgovore na vsa ta vprašanja dobili na letošnjem simpoziju. Zbornik, ki je pred vami, naj služi specializantom in specialistom različnih strok, saj prinaša pomembne prispevke naših raziskovalno usmerjenih kolegov – hvala za vaš trud. Velika zahvala tudi zelo aktivnemu programskemu odboru, vsem recenzentom in lektorjem.

V teh dveh dneh srečanja upamo na plodne razprave, izmenjavo mnenj in znanja, po končanih predavanjih pa na nedvomno prijetno druženje v skritem kotičku dolenjske pokrajine.

Tatjana Harlander

Eva Grilc[1*], Maja Sočan[2]

Spremljanje nalezljivih bolezni, ki se prenašajo s hrano in vodo

Surveillance of Foodborne and Waterborne Diseases

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: nalezljive bolezni, ki se prenašajo s hrano in vodo, epidemiološko spremljanje, Slovenija

Spremljanje, preprečevanje in obvladovanje črevesnih nalezljivih bolezni v Sloveniji poteka v skladu z Zakonom o nalezljivih boleznih (Uradni list RS, št. 33/2006) in podzakonskimi akti. V Sloveniji je podobno kot v državah Evropske unije prijava določenih črevesnih nalezljivih bolezni obvezna. Incidenca črevesnih nalezljivih bolezni, izračunana na osnovi prijav, je zagotovo nižja od dejanske, kar smo potrdili z raziskavo leta 2011. V prispevku prikazujemo epidemiologijo črevesnih nalezljivih bolezni v Sloveniji od leta 2005 do 2014.

ABSTRACT

KEY WORDS: foodborne and waterborne diseases, surveillance, Slovenia

Surveillance, prevention and control of foodborne and waterborne infectious diseases in Slovenia is implemented in accordance with the Law on Infectious Diseases (Official Gazette RS, No. 33/2006) and other regulations. In Slovenia, as in other European Union member states, detection of specific foodborne and waterborne infectious diseases has to be reported. The incidence of foodborne and waterborne diseases, calculated on the basis of the reports, is certainly lower than the actual incidence, which was confirmed by a multiplicator study we performed in 2011. The paper presents the epidemiology of foodborne and waterborne infectious diseases in Slovenia from 2005 to 2014.

[1*] Mag. Eva Grilc, dr. med., Center za nalezljive bolezni, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Zaloška cesta 29, 1000 Ljubljana; eva.grilc@nijz.si

[2] Doc. dr. Maja Sočan, dr. med., Center za nalezljive bolezni, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Zaloška cesta 29, 1000 Ljubljana

UVOD

Globalno breme črevesnih nalezljivih bolezni (ČNB) oz. bolezni, ki se prenašajo s hrano in vodo, ni znano, vendar je verjetno veliko *(1)*. Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) ocenjuje, da letno zaradi ČNB po svetu umre 2,2 milijona ljudi *(1, 2)*. Porazdelitev bremena je neenakomerna. Ocenjujejo, da se 90 % ČNB pojavi v nerazvitih državah *(1)*. Tudi v razvitih državah ostajajo ČNB zaradi svoje pogostosti in razširjenosti velik javnozdravstveni problem *(2)*. Skupine prebivalstva, bolj dovzetne za okužbo, so:

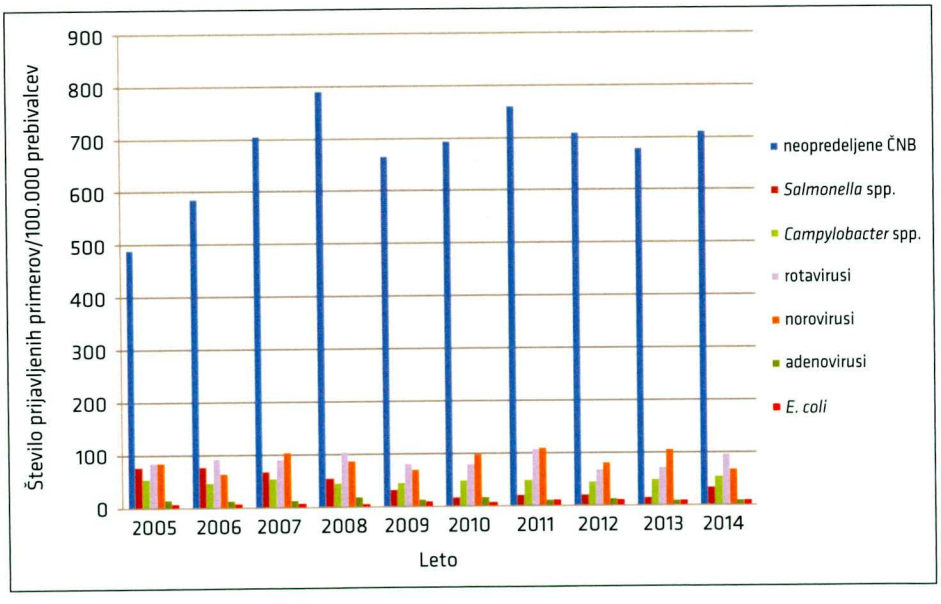
- starostniki,
- (majhni) otroci,
- osebe z motnjami imunskega odgovora in
- turisti, ki potujejo v dežele z nižjim higienskim standardom.

Najpogosteje dokazani povzročitelji v nerazvitih državah so rotavirusi in enterotoksigene *E. coli* (ETEC), ponekod se še vedno pojavljajo tudi izbruhi kolere, griže in trebušnega tifusa *(1)*. V razvitih državah ČNB najpogosteje povzročajo virusi *(1)*.

V prispevku predstavljamo podatke o prijavljenih primerih ČNB, ki jih je zajelo epidemiološko spremljanje od leta 2005 do 2014.

METODE ZBIRANJA PODATKOV

Spremljanje, preprečevanje in obvladovanje ČNB v Sloveniji poteka v skladu z Zakonom o nalezljivih boleznih (Uradni list RS, št. 33/2006) in podzakonskimi akti *(3)*. Vrsto ČNB se določi v skladu z Mednarodno klasifikacijo bolezni in poškodb (MKB-10). Pri določanju vrste ČNB se upošteva tudi standardne definicije za namene prijave *(4)*. V Sloveniji je podobno kot v državah Evropske unije (EU) prijava nekaterih ČNB obvezna. Incidenčna stopnja ČNB, izračunana na osnovi prijav, je zagotovo nižja od dejanske, kar smo potrdili z raziskavo »Populacijska študija akutnih črevesnih okužb v Sloveniji: opredelitev multiplika-



Slika 1. Incidenčna stopnja najbolj pogostih črevesnih nalezljivih bolezni (neopredeljenih črevesnih nalezljivih bolezni, salmoneloz, kampilobakterioz, okužb z rotavirusi, norovirusi, adenovirusi in *Escherichio coli*) na 100.000 prebivalcev v Sloveniji od leta 2005 do 2014. ČNB – črevesna nalezljiva bolezen.

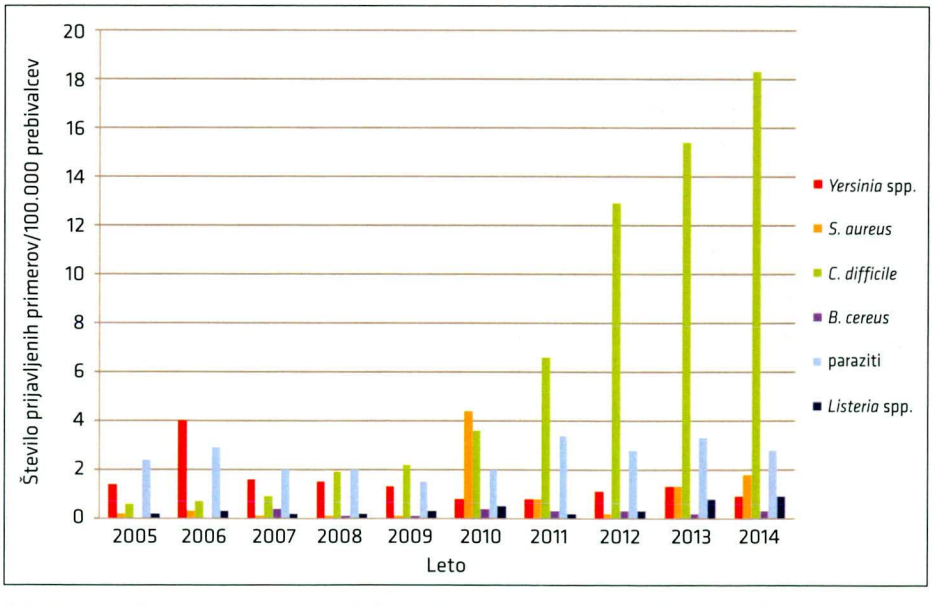
torja« leta 2011 (5). Z omenjeno prvo presečno raziskavo ČNB pri nas smo ocenili, da je na vsak prijavljen primer ČNB 56 zbolelih oseb v populaciji (5).

Največji delež ČNB predstavljajo ČNB neznane etiologije. Med opredeljenimi povzročitelji so na prvem mestu virusni povzročitelji, zlasti norovirusi in rotavirusi, katerih incidenca je vsa leta visoka. Predvidevamo, da večji del med neopredeljenimi ČNB verjetno predstavljajo virusne okužbe. Med prijavljenimi primeri ČNB z opredeljenim bakterijskim povzročiteljem je bila do leta 2009 na prvem mestu salmoneloza, kasneje pa kampilobakterioza. Pogostost prijave salmoneloz je do leta 2013 upadala. Vzrok upada prijav je bila večja varnost živil živalskega izvora (6). V letu 2014 je incidenca salmonelnih gastroenterokolitisov narasla za 2,3-krat. Zaznali smo tudi povečano število izbruhov. Dva sta se pojavila v osnovni šoli, eden v osnovni šoli in vrtcu, trije v restavracijah, eden na izletu ter v družini (skupno 9). Eden od izbruhov je bil hidričen, kar je zelo redek pojav. Osem izbruhov je povzročila S. Enteritidis, hidrični izbruh pa S. Typhimurium. Vzrok za povečano incidenco salmoneloz v letu 2014 ostaja nepojasnjen.

Prijavna incidenca kampilobakterioz je visoka (okoli 1.000 prijavljenih primerov letno) in se ne spreminja bistveno. Vzrokov je več, eden pomembnejših je, da so kampilobaktri prisotni v svežem perutninskem mesu in termično neobdelanih izdelkih iz perutninskega mesa (6). Izbruhov v zadnjih 20 letih nismo zaznali.

Prijave okužb z *E. coli*, ki je na četrtem mestu med bakterijskimi povzročitelji, ostajajo na isti ravni. Glede na 10-letno povprečje med posameznimi skupinami prevladujejo enteropatogene *E. coli* (EPEC). V zadnjih letih beležimo povečanje deleža *E. coli*, ki proizvajajo verotoksin (VTEC), kar je verjetno tudi posledica izboljšane diagnostike.

Podatki o redkeje prijavljenih ČNB so prikazani na sliki 2. Okužbe s *C. difficile*,



Slika 2. Incidenčna stopnja manj pogostih črevesnih nalezljivih bolezni (okužbe z jersinijami, *Staphylococcus aures*, *Clostridium difficile*, *Bacillus cereus*, listerijami in paraziti) na 100.000 prebivalcev v Sloveniji od leta 2005 do 2014.

ki je na četrtem mestu med bakterijskimi povzročitelji, so v izrazitem porastu. Od leta 1999, ko smo prejeli zgolj dve prijavi, je v letu 2013 število prijav naraslo na 316, v letu 2014 pa na 377 prijav (19 % več). Okužbe se pojavljajo pri bolnikih z običajnimi dejavniki tveganja, to so:

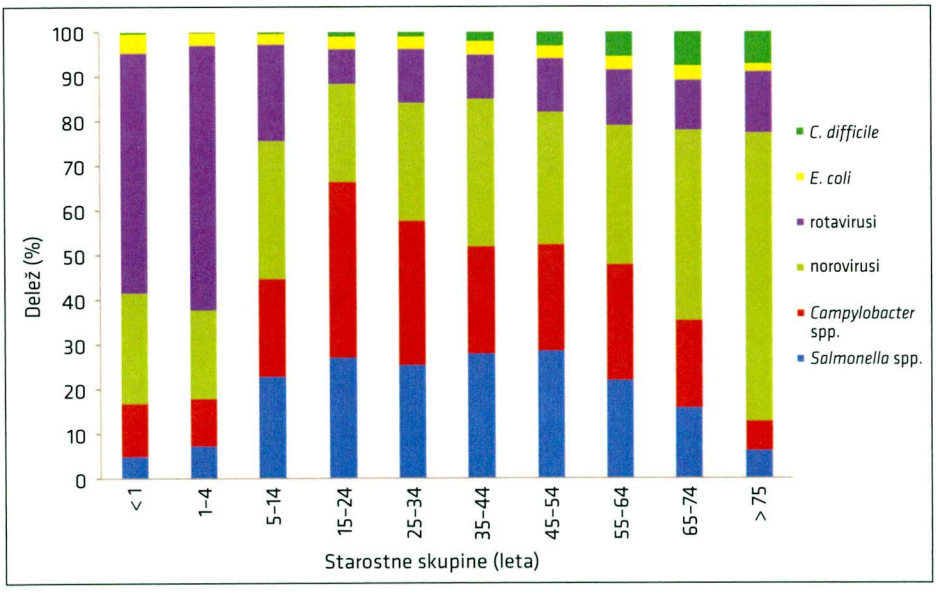
- starejše osebe,
- osebe s kroničnimi boleznimi,
- osebe, ki so se zdravile v bolnišnici, in
- osebe, ki so prejemale antibiotike.

Med redkeje prijavljenimi povzročitelji so zaradi visoke umrljivosti pomembne listerije. V letu 2014 smo zaznali 18 prijav, 5 oseb je umrlo. Zadnje kopičenje primerov smo zaznali v letu 2013 na Dolenjskem, ko so zbolele 3 osebe. Dejansko število listerioz je verjetno višje, ker se zazna in zdravi le bolnike s težko klinično sliko. Preiskovanje skupkov listerioze je zahtevno, saj je potencialno okuženih več živil, zato se je težko odločiti kje in koliko vzorčiti.

Incidenca prijavljivih parazitoz, kot sta trihineloza in trakuljavost, ostaja v zadnjih letih na enaki ravni. Izjema so prijave enterobioze, ki so v zadnjih 4 letih porasle za 4-krat. Vzrok ni znan.

Deleži povzročiteljev se znatno razlikujejo glede na starostno skupino. V mlajših in starejših starostnih skupinah prevladujejo okužbe z rotavirusi in norovirusi, kar je verjetno odraz težje klinične slike in posledično potrebe po zdravniški pomoči pri majhnih otrocih. Ljudje v srednjem življenjskem obdobju potrebujejo zdravniško pomoč ob prebolevanju bakterijskih okužb. Verjetno tudi virusne okužbe prebavil v tem starostnem obdobju niso tako redke, vendar zaradi lažjega prebolevanja ni podatka o njihovi pogostosti. Prijavne incidence pogosto odražajo koriščenje zdravstvenih storitev, saj brez obiska pri zdravniku ne pride do prijave. Največ okužb s *C. difficile se* pojavi po 50. letu, kar je povsem pričakovano.

Razmerje med prijavami moških in žensk s ČNB se s starostjo spreminja. Pri dojenčkih in v predšolskem obdobju je incidenčna stopnja višja pri dečkih kot pri



Slika 3. Deleži povzročiteljev črevesnih nalezljivih bolezni po starostnih skupinah (10-letno povprečje v Sloveniji od leta 2005 do 2014).

deklicah. V odrasli dobi pa je prijavljenih več žensk, kar je morda posledica dejstva, da so ženske prej pripravljene poiskati zdravniško pomoč kot moški.

ZAKLJUČEK

Predstavili smo najpogosteje prijavljene ČNB v Sloveniji. Dejanskega števila okuženih in obolelih ne poznamo. Ocenili bi ga lahko s pomočjo raziskav bremena okužb, ki vključujejo tudi matematično modeliranje. ČNB ostajajo pomemben javnozdravstveni problem. Treba jih je stalno epidemiološko spremljati tako doma kot v tujini, občasno oceniti breme, iskati in raziskovati nove povzročitelje ter ozaveščati prebivalstvo o preventivnih ukrepih.

LITERATURA

1. Grilc E. Epidemiološko spremljanje črevesnih nalezljivih bolezni v Sloveniji od leta 1999 do leta 2009. Zdrav var. 2012; 51: 155–62.
2. Kuchenmüller T, Hird S, Stein C, et al. Estimating the global burden of foodborne diseases –a collaborative effort. Euro Surveill. 2009; 14: 1–4.
3. Zakon o nalezljivih boleznih 2006. Uradni list RS št. 33/2006.
4. Sočan M, Šubelj M. Definicije prijavljenih nalezljivih bolezni za namene epidemiološkega spremljanja [internet]. IVZ; 2012 [citirano 2015 Sep 17]. Dosegljivo na: http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/definicija_prijavljivih_nb_za_namene_epi_spremljanja.pdf
5. Grilc E, Sočan M. Populacijska študija akutnih črevesnih okužb v Sloveniji: opredelitev multiplikatorja. Zdrav var. 2014; 53: 125–32.
6. Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin. Letno poročilo monitoringa zoonoz in povzročiteljev zoonoz [internet]. 2014 [citirano 2015 Sep 21]. Dosegljivo na: http://www.uvhvvr.gov.si/si/delovna_podrocja/zivila/zoonoze

Stanka Vadnjal[1*], Urška Henigman[2], Andrej Kirbiš[3], Majda Biasizzo[4]

Okolje in hrana kot vir okužbe

Environment and Food as a Source of Infection

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: hrana, okolje, povzročitelji črevesnih obolenj, mikroorganizmi

Mikroorganizmi, ki jih izoliramo iz kliničnega materiala pri osebah s črevesnimi okužbami, so večinoma ubikvitarni in tako v večji ali manjši meri razširjeni povsod okoli nas. Posamezne vrste se razlikujejo predvsem glede na to, kakšno okolje jim bolj ustreza. To se odraža tudi v njihovi razširjenosti v določenem zunanjem okolju ali gostitelju. Na pojavnost mikrobov vplivajo številni fizikalno-kemijski dejavniki, na njihov prenos pa tudi socialno-ekonomske razmere v določenem okolju. Ravno pri črevesnih okužbah so kontaminirana živila pogost vir okužbe. Tako dobimo pri bolniku ob epidemiološkem poizvedovanju o vrsti zaužitih živil v zadnjem obdobju najpogosteje pričakovane odgovore. Natančno iskanje vzroka alimentarnega obolenja je, razen v primeru velikih izbruhov, žal pogosto neuspešno. Predvsem je tako v primeru kontaminiranih živil, ki imajo kratek rok uporabnosti. Prav zato je pomembno sodelovanje vseh institucij – od tistih, ki so vpeta v linijo »od vil do vilic«, do zdravniškega osebja, ki se na koncu srečuje s klinično sliko, ki jo mikrobi povzročijo v bolnikovem organizmu. Le z izpopolnjenim sistemom ugotavljanja vira nekega alimentarnega obolenja lahko učinkovito izrabimo sistem sledljivosti živil, katerega so skladno z zakonodajo dolžni graditi vsi vpleteni v prehranski verigi. V prispevku bomo osvetlili posamezne skupine živil, ki so najpogosteje povezane s povzročitelji črevesnih obolenj. Vse raziskave, katerih namen je zmanjšati pojavljanje alimentarnih obolenj, pogosto vodijo do spoznanja, da kritične točke niso samo določene vrste živil, ampak tudi okolje in s tem predmeti, ki prihajajo v stik z živili, in seveda tudi naše ravnanje z njimi.

ABSTRACT

KEY WORDS: food, environment, cause of intestinal diseases, microorganisms

Microorganisms isolated from the clinical material of persons with intestinal infections are mainly ubiquitous and thus widespread all around us. Individual types of microbes mostly differ regarding the environmental condition that suits them. This is also reflected in their occurrence in the environment or in the host. The incidence of

[1*] Asist. dr. Stanka Vadnjal, dr. vet. med., Inštitut za higieno živil in bromatologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, 1000 Ljubljana; stanka.vadnjal@vf.uni-lj.si

[2] Viš. strok. sod. dr. Urška Henigman, dr. vet. med., Inštitut za higieno živil in bromatologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, 1000 Ljubljana; urska.henigman@vf.uni-lj.si

[3] Prof. dr. Andrej Kirbiš, dr. vet. med., Inštitut za higieno živil in bromatologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, 1000 Ljubljana; andrej.kirbis@vf.uni-lj.si

[4] Viš. strok. svet. dr. Majda Biasizzo, dr. vet. med., Inštitut za higieno živil in bromatologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, 1000 Ljubljana; majda.biasizzo@vf.uni-lj.si

microbes depends on many physic-chemical factors. At the same time, their transmission is also influenced by socio-economic conditions in a particular environment. Contaminated food is often the cause of intestinal diseases. This frequently leads to expected answers during epidemiological inquiry about the type of food eaten by the patient in the last period. A precise determination of the cause of foodborne disease is, except in the case of major outbreaks, often unsuccessful, particularly in the case of contaminated food with short shelf life. Therefore cooperation between all institutions is very important – from those who are involved in the line »from farm to fork« to the medical personnel. The latter are at the end faced with a clinical picture caused by microbes in the patient's body. Only with an advanced system of determining the source of alimentary diseases, a system of traceability of foodstuffs can be used effectively. The system has to be in accordance with the law and this has to be respected by all involved in the food chain. In this article, we will highlight the types of food which are most often associated with intestinal diseases caused by different pathogens. In most studies that focus on reducing the occurrence of foodborne illnesses, a common conclusion is that what is crucial is not only the type of food, but also the environment and objects that come into contact with foodstuffs and of course the way we handle them.

UVOD

Prebavni sistem ljudi in živali je kompleksen sistem s številnimi mehanizmi delovanja. Lahko rečemo, da je prav v procesu prehranjevanja organizem najbolj izpostavljen delovanju najrazličnejših dejavnikov tveganja. Ljudje se s povzročitelji črevesnih obolenj okužimo bodisi neposredno preko okuženih ljudi, živali in predmetov ali posredno preko kontaminirane hrane ali vode. Za alimentarne okužbe ali zastrupitve so odgovorna živila, ki so kontaminirana s patogenimi mikroorganizmi ali njihovimi toksini in jih človek zaužije v količini, ki presega infekcijsko oz. toksično dozo, kar pomeni, da lahko povzročijo obolenje. Pri manifestaciji bolezni je ključna sposobnost imunskega odziva. Prav zato številna obolenja v večjem obsegu opažamo v imunsko občutljivih starostnih skupinah in pri kroničnih bolnikih, kar je razvidno tudi iz objavljenih letnih poročil epidemioloških služb *(1, 2)*.

Uredba (ES) št. 852/2004 o higieni živil določa, da je nosilec živilske dejavnosti (proizvajalec) odgovoren, da so živila, ki jih proizvaja, varna oz. zdravstveno ustrezna *(3)*. V splošnih zahtevah živilske zakonodaje, področje katerih ureja Uredba (ES) št. 187/2002, je navedeno tudi, da je nosilec živilske dejavnosti dolžan potrošniku s svojim izdelkom posredovati tudi informacije »o preprečevanju posebnih neželenih učinkov nekega živila ali skupine živil na zdravje« *(4)*. Proizvodnja živil je nadzorovana z različnimi mehanizmi nadzora. Sami nosilci živilske dejavnosti imajo vpeljan sistem kontrole kritičnih točk (angl. *Hazard Analysis Critical Control Point*, HACCP) med samo proizvodnjo, prav tako večje trgovske verige izvajajo dodatno lastno kontrolo živil, ki jih posredujejo v promet. Uradne službe, kot so Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin RS (UVHVVR), Zdravstveni inšpektorat RS (ZIRS) in Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ), pa vsako leto izvajajo program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev. Kljub prizadevanjem rejcev, proizvajalcev in stroke se pri posameznih skupinah živil občasno srečujemo s prisotnostjo mikroorganizmov, ki večinoma zaradi neustreznih postopkov priprave hrane povzročajo obolenja pri

ljudeh. Okužbe, katerih vzrok je kontaminirana hrana (npr. kampilobakterioza, salmoneloza, okužba z *E. coli*, virusne okužbe itd.), se najpogosteje odražajo kot gastroenteritisi. V naporih za zmanjšanje razširjenosti mikrobov in pri preprečevanju obolenj z enteričnimi patogeni ne smemo pozabiti na njihovo sposobnost preživetja v najrazličnejših okoljih ter tudi sposobnost oblikovanja biofilmov. Le-ti lahko predstavljajo trdovraten vir ponavljajoče kontaminacije živil, ki ga je zelo težko locirati in tudi odstraniti.

RAZŠIRJENOST POVZROČITELJEV ČREVESNIH OBOLENJ V POSAMEZNIH SKUPINAH ŽIVIL IN V OKOLJU

Posamezne vrste mikroorganizmov so skoraj praviloma bolj razširjene pri določenih živalskih vrstah in tako posledično dosegajo višjo prevalenco tudi v tovrstnih živilih. Vendar to ne pomeni, da so možen vir okužbe ljudi le ta živila. V nadaljevanju bomo zato izpostavili vrste živali, ki so glavni prenašalci mikrobov in ob tem tudi najpogostejši povzročitelji določenega obolenja.

Perutnina

Prodaja in uživanje perutninskega mesa (piščančjega in puranjega) je v zadnjih desetletjih v porastu. Razlogi za to so v njegovih dietetičnih karakteristikah (lažja prebavljivost, nižja vsebnost maščob) in tudi v cenovni dostopnosti. Perutninska proizvodnja se pri svojem delu srečuje predvsem s prisotnostjo dveh mikrobnih vrst, ki povzročata obolenja pri ljudeh. To so bakterije vrste *Campylobacter* spp. in *Salmonella* spp. Za obe vrsti je značilno, da se razmnožujeta tudi pri temperaturah, višjih od 42 °C, kar je tudi poglavitni razlog za njuno pojavnost v črevesju perutnine. Veliko večjo prevalenco termofilnih kampilobaktrov (*C. jejuni/coli*) pri perutnini v primerjavi z ostalimi živalskimi vrstami si po vsej verjetnosti lahko razlagamo tudi z dejstvom, da je telesna temperatura ptic okrog 42 °C in so zato njihova prebavila idealno okolje za rast in razmnoževanje teh vrst bakterij. Živali se s salmonelami in termofilnimi kampilobaktri okužijo med samo vzrejo. Vzroke za to je najpogosteje treba iskati v okuženi krmi in v nedoslednem izvajanju biovarnostnih ukrepov (prisotnost glodavcev, insektov, ptic, nezadostno čiščenje in dezinfekcija, nepravilno vseljevanje novih jat, nedosledna uporaba dezinfekcijskih barier itd.) *(5)*.

Po podatkih letnega poročila o zoonozah in povzročiteljih zoonoz smo v Sloveniji v letu 2013 v okviru nacionalnega programa nadzora glede bakterij vrste *Salmonella* spp. prisotnost ugotovili pri 2,8 % matičnih jat. Pridobljeni izolati niso pripadali serovarom *S.* Enteritidis, *S.* Typhimurium, *S.* Hadar, *S.* Virchow ali *S.* Infantis. Rezultati so dosegli zastavljeni cilj Evropske unije (EU) glede zmanjšanja razširjenosti salmonel v teh jatah *(1, 6)*. Pri nesnicah so bile salmonele ugotovljene pri 3,8 % jat (*S.* Enteritidis/*S.* Typhimurium pri 1,1 %). V jatah brojlerjev je bilo pozitivnih vzorcev 2,3 % (*S.* Enteritidis/*S.* Typhimurium pri 0,14 %), najpogosteje je bil izoliran serovar *S.* Infantis. Od 121 preiskanih vzorcev svežega piščančjega in puranjega mesa ter perutninskih mesnih pripravkov (domačega in tujega porekla) so bile salmonele ugotovljene v 11,6 % vzorcih. V večini primerov je bila izolirana *S.* Infantis, serotipa *S.* Enteritidis in *S.* Typhymurium pa nista bila ugotovljena *(6)*.

Meso perutnine in perutninski izdelki so bili v državah članicah EU leta 2013 kot povzročitelji izbruhov salmoneloz na sedmem mestu s 5,1 % povzročenih primerov *(2)*. Od leta 2005 primat najpogosteje ugotovljenega povzročitelja gastrointestinalnih obolenj ne pripada več salmonelam, ampak kampilobaktrom. Kampilobakterioza je tako v letu 2013 z incidenčno stopnjo 64,8/100.000 prebival-

cev med zoonozami daleč na prvem mestu (na drugem mestu ji sledi salmoneloza z incidenčno stopnjo 20,4/100.000 prebivalcev). Poglavitni vir okužb s kampilobaktri in tudi z njimi povezanimi izbruhi je piščančje meso. V letu 2012 je bilo piščančje meso vir izbruhov kampilobakterioz v 44 %, v letu 2013 pa kar v 50 % primerov *(2, 7)*. Švicarski raziskovalci so ugotovili, da je bilo perutninsko meso vir obolenj v 70,9 % primerov. Povprečna stopnja pojavljanja v jatah brojlerjev v Sloveniji je 74 %. Med procesom klanja pride do kontaminacije piščančjih trupov in tako je bila v letu 2013 ugotovljena prisotnost mikrobov na površini piščančjega in puranjega mesa v 52 % primerov *(6)*. Stopnja razširjenosti kampilobaktrov v ostalih državah članicah EU je precej različna. Splošno znano je, da imajo najnižjo prevalenco severne države (npr. v letu 2013 Finska 5,12 % in Švedska 8,77 %), v ostalih državah članicah EU pa se le-ta giblje med 30–80 %. Do kontaminacije površine trupov med procesom klanja perutnine ne pride le med neoptimalno izvedeno eksenteracijo, ampak tudi že v fazi skubljenja živali *(8)*. Navzkrižna kontaminacija med konfekcioniranjem piščančjega mesa za prodajo na drobno pa vodi do tega, da so mikrobi prisotni tudi v perutninskih mesnih izdelkih. Za kampilobakteriozo je značilno sporadično pojavljanje, predvsem v poletnih mesecih. Razlog sezonskega pojavljanja je tako v višji prevalenci mikrobov v brojlerskih jatah v poletnih mesecih kot tudi v specifičnosti prehranjevanja in druženja ljudi v tem obdobju.

Naravni rezervoar bakterij vrste *Salmonella* spp. in *Campylobacter* spp. so tudi purani, vendar do kontaminacije mesa med klanjem prihaja v manjši meri. Razlog za to je v velikosti živali in tudi v počasnejšem poteku procesa klanja. V letu 2012 so tako tovrstna živila (puranje meso in izdelki iz puranjega mesa) povzročila izbruh obolenja le v 4 % primerov *(7)*.

Prežvekovalci

Prežvekovalci (predvsem mlado govedo) so glavni rezervoar verotoksigenih sevov *E. coli* (VTEC). Bakterije *E. coli* so sicer del normalne črevesne mikroflore pri ljudeh in živalih, njihovi patogeni sevi pa so za kampilobaktri, salmonelami in *Y. enterocolitico* poglavitni povzročitelji gastrointestinalnih obolenj *(2)*. Na podlagi virulentnih dejavnikov razlikujemo več skupin:

- enteropatogene *E. coli* (EPEC),
- enterotoksigene *E. coli* (ETEC),
- enteroinvazivne *E. coli* (EIEC),
- enteroagregativne *E. coli* (EAEC),
- difuzno adherentne *E. coli* (DAEC) in
- *E. coli*, ki izdelujejo Šigove toksine (STEC) ali VTEC, med katere sodijo tudi enterohemoragične *E. coli* (EHEC).

Pri ljudeh je kot povzročitelj izbruhov sicer najbolj poznan serotip VTEC O157, vendar je patogenih tudi več kot 50 % serotipov ne-O157 *(9)*. V povezavi okužb s hrano se pri ljudeh pogosto pojavljajo serološke skupine O103, O26, O145 in O111. V letu 2013 je bilo pri govedu ugotovljeno več kot 20 različnih VTEC. Poleg O157 so bili najpogosteje izolirani sevi O26, O174, O103, O91, O185 in O22 *(6)*. Sevi VTEC pri govedu asimptomatsko naseljujejo črevesje in se z iztrebki prenašajo v okolico. Na stopnjo kontaminacije črede vplivata starost živali in letni čas. Izločanje bakterij je najintenzivnejše pri živalih, starih od 2 mesecev do 2 let, v poletnem in v jesenskem obdobju *(10–12)*. Raziskovalci so ugotovili, da izločanje bakterij praviloma ni dolgotrajno. V študiji je kar 63 % testiranih živali VTEC izločalo manj kot en mesec. Opisani pa so tudi primeri, ko je izločanje trajalo več let *(13)*. Sezonsko izločanje bakterij v okolje se praviloma odraža tudi pri pojavljanju obolenj pri ljudeh *(1, 14)*. Do kontaminiranosti mesa z VTEC pride med zakolom živali. Najpomembnejša kritična točka med procesom klanja je eksenteracija, kjer lah-

ko ob odstranitvi želodca in črevesja pride do poškodbe sten in razlitja vsebine po trupu *(15)*. Kontaminirana surovina vodi do pojavljanja sevov VTEC v surovem mletem mesu in mesnih izdelkih. V letu 2013 so bili v državah članicah EU iz živil najpogosteje izolirani sevi O157, O26, O103, O121 in O55 *(2)*. Neupoštevanje higienskih postopkov med molžo živali lahko vodi tudi do prisotnosti VTEC v surovem mleku. Uživanje nepasteriziranega mleka in mlečnih izdelkov lahko zato povzroči obolenja ljudi in privede celo do večjih izbruhov *(16)*. V letu 2013 je bilo v devetih državah članicah EU preiskanih 860 vzorcev surovega mleka, namenjenega neposrednemu uživanju, od katerih je bilo 2,3 % vzorcev VTEC-pozitivnih *(2)*.

Prašiči

Prašiče oz. uživanje svinjskega mesa in izdelkov iz svinjine najpogosteje povezujemo s primeri jersinioze. Ta živalska vrsta je primarni rezervoar bakterij *Y. enterocolitica*. Večina patogenih sevov pripada biotipu 4 (serotip O:3) in biotipu 2 (serotip O:9). V patogeno skupino so uvrščeni tudi biotipi 1B, 3 in 5. Jersinioza spada po podatkih Evropske agencije za varnost hrane (angl. *European Food Safety Authority*, EFSA) za leto 2103 na tretje mesto najpogostejših gastrointestinalnih zoonoz; v zadnjih petih letih je opaziti trend upadanja *(2)*. Večje število primerov je zaznati v severni in vzhodni Evropi. Po objavljenih podatkih je stopnja prevalence pri prašičih v posameznih državah članicah EU zelo različna in se giblje med 10–90 %. V Sloveniji je bilo v letu 2013 v okviru monitoringa zoonoz preiskanih 121 vzorcev mesa, mletega mesa in mesnih izdelkov. Pozitivnih je bilo 10 vzorcev, vendar je bil v vseh primerih izoliran biotip A1, ki za ljudi ni patogen *(1)*. Z ugotavljanjem prisotnosti mikroba na tonzilih prašičev ob klanju smo v letih 2008 in 2009 ugotovili, da je mikrob prisoten v okoli 20 % vzorcev *(17)*.

Od bakterij vrste *Salmonella* spp. sta pri prašičih najpogosteje ugotovljena serovara *S.* Typhimurium in *S.* Dublin. Meso prašičev in mesni izdelki iz svinjine so v letu 2013 povzročili 8,9 % izbruhov salmoneloz in so kot ugotovljen vir obolenj na tretjem mestu, pred perutnino *(2)*.

Jajca

Kokošja jajca in jajčni izdelki so najpogostejši vzrok za pojav salmoneloznih okužb v obliki večjih izbruhov. V letu 2013 so v območju EU tovrstna kontaminirana živila povzročila kar 44,9 % vseh primerov. Ugotovljena razširjenost salmonel pri kokošjih jajcih, namenjenih za prodajo, je sicer nizka. Bakterije so ugotovili pri 0,1 % od 23.441 preiskanih vzorcev *(2)*. Relativno nizko stopnjo kontaminacije si ob sočasnem velikem deležu povzročenih salmoneloz lahko razlagamo z dejstvom, da so jajca in jajčni izdelki idealen medij za naglo razmnoževanje mikrobov. Zato se ravno pri tovrstnih živilih vsako nespoštovanje dobrih praks (higienske razmere, način priprave in narava jedi, temperaturni pogoji) izredno hitro maščuje in lahko vodi do večjega števila obolelih.

Mleko

Mleko vseh vrst domačih živali je lahko vir okužbe z različnimi patogenimi mikroorganizmi predvsem, če ga uživamo toplotno neobdelanega ali obdelava ni bila zadostna. Mleko je izredno občutljivo živilo tudi glede možnosti naknadne kontaminacije. Človek lahko vanj ob neustreznem ravnanju zanese mikrobe bodisi iz ustne sluznice ali površine rok. Stafilokoki in streptokoki, ki kolonizirajo na koži in sluznicah, se v takem primeru lahko naglo razmnožijo in ob zaužitju živila povzročijo obolenje oz. zastrupitev. Podobno velja tudi za mlečne izdelke, kot so skuta, sveži in trdi siri. Tako je uživanje nepasteriziranega, surovega mleka, poglavitni vir izbruhov povezanih z VTEC *(2, 16)*.

Kontaminirano mleko je lahko tudi vzrok za kampilobakteriozo, jersiniozo in ostala črevesna obolenja. V letu 2012 je bilo prijavljenih kar 20 % izbruhov kampilobakterioz, vzrok katerih je bilo kontaminirano mleko *(7)*. V letu 2013 so po poročilu EFSA prisotnost bakterije *Y. enterocoliticae* ugotovili v 8,9 % od 202 preiskanih vzorcev mleka in mlečnih izdelkov *(2)*.

Školjke

Za školjke je značilno, da dnevno prefiltrirajo velike količine morske vode in zato ob določenih vplivih okolja v prebavnih žlezah kopičijo biološke in kemijske onesnaževalce. V prehrambeni verigi se najpogosteje srečujemo z naslednjimi:

- užitne klapavice (*M. galloprovincialis*),
- pokrovače (*Pecten jacobaeus*),
- ladinke (*Venus verrucosa*),
- ostrige (*Ostrea edulis*),
- noetove barke (*Arca noae*) in
- vongole (*Tapes* spp.).

V mesu školjk pogosto ugotovimo prisotnost patogenih bakterij (npr. *Salmonella* spp., *E. coli, Vibrio* spp.) in enteričnih virusov *(18)*. Evropska zakonodaja kot mikrobiološke kriterije za žive školjke določa mejne vrednosti za bakterijo *E. coli* (kot pokazatelja higienskih razmer glede fekalne onesnaženosti morja) in kriterije za bakterije vrste *Salmonella* spp. *(19)*. V Sloveniji so trenutno gojitvena območja uvrščena v cono B, kar pomeni, da morajo školjke pred prodajo v center za prečiščevanje (t. i. depuracijo). Školjke, ki so dane v promet, morajo izpolnjevati tudi kriterije glede prisotnosti morskih biotoksinov *(3, 20)*. Ti se kopičijo v školjkah ob povečani prisotnosti dinoflagelatov v morski vodi. V primeru, da to vodi v presežene vrednosti okadaične kisline in njenih derivatov, školjke vsebujejo diarealne toksine (angl. *Diarrhetic Shellfish Poisoning toxin*, DSP). Zaužitje takšnih školjk lahko povzroči prebavne motnje. Številne študije in vsakoletna poročila EFSA kažejo, da so školjke pogosto kontaminirane tudi z virusi (npr. norovirusi in virus hepatitisa A) *(7, 21, 22)*. Prečiščevanje školjk v neoporečni morski vodi odstrani bakterije oz. zmanjša njihovo prisotnost na sprejemljivo raven, ne odstrani pa vseh virusnih delcev in morskih biotoksinov. Pojavljanje bakterije *V. parachaemolyticus* in morskih biotoksinov je pogostejše v poletnih mesecih, medtem ko so norovirusi prisotni predvsem v hladnejših mesecih. Školjke in drugi morski sadeži so v letu 2012 povzročili okužbo z norovirusi v 16,5 % prijavljenih izbruhov *(7)*.

Voda

Pitna voda je vključena v vse pore našega življenja; z njo se vsakodnevno srečujejo vsa bitja na zemlji. Vodo deklariramo kot živilo in glede na to, da je tudi vključena v vse dele proizvodne verige, je za zdravstveno ustrezno živilo nujno potrebna njena neoporečnost. S kontaminirano vodo se ljudje lahko okužimo neposredno ali posredno, ko oporečna voda z mikrobi kontaminira predmete in proizvodnjo živil. Za vsa živila, ki se pred zaužitjem toplotno ne obdelajo, je še toliko bolj pomembno, da med proizvodnjo ne pridejo v stik z vodo, ki vsebuje patogene bakterije in viruse. V letu 2013 je bilo v Evropi zabeleženih devet izbruhov obolenj, katerih vzrok je bila kontaminirana voda. Ob tem je bilo ugotovljenih pet povzročiteljev *(2)*:

- norovirusi,
- VTEC O128,
- *Cryptosporidium parvum*,
- *Cryptosporidium hominis* in
- bakterije vrste *Salmonella* spp.

V treh primerih povzročitelja niso uspeli ugotoviti.

Sadje in zelenjava

Zdravstvena ustreznost sadja in zelenjave je tesno povezana z neoporečnostjo vode, s

katero prihaja v stik. Glede na to, da je velik del proizvodnje vezan na sistem namakanja, je potrebno redno spremljati kvaliteto vode, ki se za to uporablja. Tako sadje kot zelenjava so vsakoletno povezani s primeri obolenj z VTEC, salmonelami, norovirusi in virusom hepatitisa A. Tovrstna živila so v letu 2013 povzročila 4,4 % vseh primerov izbruhov, povezanih s hrano *(2)*. Gastrointestinalna obolenja lahko povzročajo tudi izdelki iz žit (npr. moka, slaščice, pudingi ipd.). Le-ta se lahko med procesom proizvodnje kontaminirajo z mikrobi, ki so ob ugodnih razmerah sposobni proizvajati toksine (npr. *B. cereus*). Posamezne skupine toksinov so termostabilne in v tem primeru pride do zastrupitve tudi ob ustrezni toplotni obdelavi živila.

Okolje

Ob pogledu na celotno proizvodno verigo živil rastlinskega in živalskega izvora opazimo, da se pojavljanje mikroorganizmov vseskozi prepleta. Poglavitni namen tako proizvajalcev kot strokovnjakov s področja higiene živil je čim bolj zajeziti oziroma prekiniti krog pojavljanja patogenih mikrobov:

- pri rejnih živalih,
- v primarni proizvodnji,
- v živilski industriji,
- v prometu z živili in
- ne nazadnje tudi v domačem okolju potrošnika.

Vsi nosilci živilske dejavnosti se morajo zavedati, da je za končen proizvod ravno tako kot zdravstveno neoporečna surovina v enaki meri pomembno delovno okolje, torej prostori in oprema. Samo če z ustreznim čiščenjem in dezinfekcijo odstranimo prisotne mikroorganizme v tem okolju, lahko prekinemo krog nenehnih sekundarnih kontaminacij tudi takrat, ko jih neka žival ali surovina ne vsebuje.

Vir mikrobov, ki povzročajo črevesna obolenja ljudi, niso samo zaužita živila, ampak zelo pogosto tudi okolje, ki nas obdaja. Potencialni vir okužbe so živali, bodisi v domačem okolju kakor tudi v trgovinah z živalmi in na kmetijah oziroma v živalskih vrtovih. Mikrobe vrste *Campylobacter* spp. so švedski raziskovalci ugotovili kar pri 37 % preiskanih psov *(23)*. Značilno je, da je pojavljanje mikrobov pogostejše pri mladih živalih, mlajših od dveh let. V zadnjih letih je med lastniki psov opaziti trend hranjenja s surovo, komercialno pripravljeno hrano. Le-ta lahko vsebuje bakterije, kot so kampilobaktri, *L. monocytogenes*, *E. coli itd.* Ob neupoštevanju higienskih postopkov pri hranjenju živali (pomivanje posod in pultov, kuhinjske krpe) lahko pride tudi do kontaminacije živil, namenjenih prehrani ljudi. Bakterije vrste *Salmonella* spp. so prisotne tudi na koži in sluznicah eksotičnih živali, ki jih imajo ljudje čedalje pogosteje v svojih domovih (npr. plazilci, želve, ježki ipd.). Površine, ki so zelo obremenjene in v nenehnem stiku z ljudmi, so prav tako možen vir okužb, še posebno v obdobjih, ko so tudi obolenja ljudi pogostejša. Kot vir okužb je potrebno omeniti tudi bazenske vode in pripadajočo opremo na javnih kopališčih, ki so zelo obremenjene in ob neustreznem vzdrževanju pogosto vir različnih črevesnih bakterij in virusov.

ZAKLJUČEK

Ob pregledu pojavljanja mikrobov, ki povzročajo alimentarna črevesna obolenja, ne moremo mimo podatka, da je v letu 2013 v kar 38,5 % primerov tovrstnih izbruhov bolezni prišlo v domačem okolju, torej pri oz. po pripravi hrane doma *(2)*. Z 22,2 % jim sledijo gostinski obrati, delež ostalih lokacij (šole, vrtci, domovi za starejše občane, bolnišnice, pikniki) pa je bistveno nižji (2–8 %). Kljub temu, da zakonodaja določa, da je nosilec živilske dejavnosti odgovoren za varen, zdravstveno ustrezen proizvod, ne moremo mimo dejstva,

da s tem še niso odpravljena vsa tveganja ob zaužitju živil. Dolžnost proizvajalca je tudi, da potrošnika opozori na pravilno rokovanje pri pripravi živila in na temperaturne pogoje hranjenja. Veljavna zakonodaja trenutno ne določa kriterijev in mejnih vrednosti za vse potencialno patogene mikroorganizme. Takšna primera sta denimo prisotnost kampilobaktrov v perutninskem mesu in mesnih izdelkih, prisotnost drugih vrst salmonel, kot sta *S.* Enteritidis in *S.* Typhimurium, v svežem perutninskem mesu in še bi lahko naštevali. Ob poznavanju osnovnih lastnosti najpogostejših povzročiteljev alimentarnih črevesnih obolenj vemo, da so ti mikrobi relativno občutljivi in da jih lahko že s pravilno pripravo hrane uničimo, tudi če so prisotni na živilu, ki ga pripravljamo. Seveda pa je potrebna doslednost, upoštevanje čistih in nečistih poti pri rokovanju z živili in tudi z opremo. V izogib pojavljanju izbruhov bolezni ali sporadičnih primerov ne zadostuje samo izobraževanje delavcev v nekem specifičnem okolju, ampak bi bilo potrebno prav zaradi vseh mikrobov, ki nas obdajajo in nas bodo obdajali tudi v bodoče, pripraviti program izobraževanja prebivalstva in z njim začeti seznanjati že najmlajše generacije. Z ozaveščenim in odgovornim ravnanjem na vseh ravneh bomo uspešno zajezili opisane vzroke in vire okužb, popolna varnost glede okužb s hrano ali zaradi dejavnikov okolja pa seveda zaradi kompleksnosti problematike ne bo mogoča.

LITERATURA

1. Kraigher A, Sočan M, Klavs I, et al. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2013 [internet]. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje; 2014 [citirano 2015 Oct 05]. Dosegljivo na: http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/publikacije-datoteke/epidemilosko_spremljanje_nalezljivih_bolezni_2013.pdf
2. European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EFSA Journal. 2015; 13 (1): 3991.
3. Uredba (ES) št. 852/2004 Evropskega Parlamenta in Sveta z dne 29. aprila 2004 o higieni živil.
4. Uredba (ES) št. 178/2002 Evropskega Parlamenta in Sveta z dne 28. januarja 2002 o določitvi posebnih načel in zahtevah živilske zakonodaje, ustanovitvi Evropske agencije za varnost hrane in postopkih, ki zadevajo varnost hrane.
5. Silva J, Leite D, Fernandes M, et al. Campylobacter spp. as a Foodborne Pathogen: A Review. Front Microbiol. 2011; 2: 200.
6. Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin. Letno poročilo o zoonozah in povzročiteljih zoonoz Sloveniji v letu 2013 [internet]. 2014 [citirano 2015 Oct 05]. Dosegljivo na: http://www.uvhvvr.gov.si/si/delovna_podrocja/zivila/zoonoze/
7. European Food Safety Authority. Scientific report of EFSA and OECD. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. EFSA Journal 2014; 12 (2): 3547.
8. Hayama Y, Yamamoto T, Kasuga F, et al. Simulation model for Campylobacter cross-contamination during poultry processing at slaughterhouses. Zoonoses Public Health. 2011; 58 (6): 399–406.
9. Morabito S, Karch H, Mariani-Kurkdjian P, et al. Enteroaggregative, Shiga toxin-producing Escherichia coli O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. J Clin Microbiol. 1998; 36 (3): 840–2.
10. Renter DG, Sargeant JM, Hygnstorme SE, et al. Escherichia coli O157:H7 in free-ranging deer in Nebraska. J Wildl Dis. 2001; 37 (4): 755–60.
11. Caprioli A, Morabito S, Brugere H, et al. Enterohaemorrhagic Escherichia coli: emerging issues on virulence and modes of transmission. Vet Res. 2005; 36 (3): 289–311.
12. Fernandez D, Rodriguez EM, Arroyo GH, et al. Seasonal variation of Shiga toxin-encoding genes (vtx) and detection of E. coli O157 in dairy cattle from Argentina. J Appl Microbiol. 2009; 106 (4): 1260–7.

13. Cobbaut K, Houf K, Douidah L, et al. Alternative sampling to establish the Escherichia coli O157 status on beef cattle farms. Vet Microbiol. 2008; 132 (1–2): 205–10.
14. Ebel E, Schlosser W, Kause J, et al. Draft risk assessment of the public health impact of Escherichia coli O157:H7 in ground beef. J Food Prot. 2004; 67 (9): 1991–9.
15. Bell RG. Distribution and sources of microbial contamination on beef carcasses. J Appl Microbiol. 1997; 82 (3): 292–300.
16. Kaspar C, Doyle ME, Archer J. White paper on non-O157:H7 Shiga toxin-producing E. coli from meat and non-meat sources [internet]. Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison; 2010 [citirano 2011 Nov 2]. Dosegljivo na: http://www.namif.org/namif/wp-content/uploads/08-402.pdf
17. Biasizzo M, Grebenc S, Mićunović J, et al. Estimation of Yersinia enterocolitica prevalence in slaughtered pig tonsils in Slovenia by using three cultural isolation procedures. Slov vet res. 2013; 50 (4): 167–72.
18. Henigman U. Ugotavljanje patogenih bakterij in virusov v školjkah slovenskega morja in njihova genetska karakterizacija [doktorsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2012.
19. Uredba (ES) št. 2073/2005 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 15. novembra 2005 o mikrobioloških merilih za živila.
20. Uredba (ES) št. 854/2004 Evropskega parlamenta in Sveta o določitvi posebnih predpisov za organizacijo uradnega nadzora proizvodov živalskega izvora, namenjenih za prehrano ljudi.
21. Muniain-Mujika I, Girones R, Lucena F. Viral contamination of shellfish: evaluation of methods and analysis of bacteriophages and human viruses. J Virol Methods. 2000; 89 (1–2): 109–18.
22. Fiore AE. Hepatitis A transmitted by food. Clin Infect Dis. 2004; 38 (5): 705–15.
23. Holmberg M, Rosendal T, O Engvall E, et al. Prevalence of thermophilic Campylobacter species in Swedish dogs and characterization of C. jejuni isolates. Acta Veterinaria Scandinavica [internet]. 2015 [citirano 2015 Sep 21]; 57: 19 Dosegljivo na: http://www.actavetscand.com/content/57/1/19

Barbara Šoba[1*], Miha Skvarč[2]

Molekularna epidemiologija parazitskih okužb prebavil

Molecular Epidemiology of the Intestinal Parasitoses

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: molekularna epidemiologija, prebavila, giardioza, kriptosporidioza, ameboza, ehinokokoza, tenioza

Kljub hitro razvijajočim se molekularno-genetskim tehnologijam za mikrobiološko diagnostiko infekcijskih bolezni je vpeljava modernih metod na področju parazitskih okužb relativno počasna. V prispevku izpostavljamo nekatere parazitske okužbe prebavil, pomembne za področje Slovenije, za katere pomenijo molekularne metode pomemben napredek v spremljanju medvrstne in/ali znotrajvrstne pestrosti njihovih povzročiteljev ter s tem predpogoj za njihovo molekularno epidemiološko spremljanje.

ABSTRACT

KEY WORDS: molecular epidemiology, digestive system, giardiasis, cryptosporidiosis, amebiasis, echinococcosis, taeniasis

Despite a rapid progress in the field of molecular and genetic technologies for clinical microbiological diagnostics of infectious diseases, diagnostic developments for parasites have remained relatively stagnant. In the present paper, we present some of the more important parasitic infections of digestive system detected in Slovenia and emphasize the importance of implementing molecular methods for studying inter-/intraspecies diversity and molecular epidemiology of these infections.

[1*] Asist. dr. Barbara Šoba, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; barbara.soba@mf.uni-lj.si

[2] Asist. dr. Miha Skvarč, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana.

UVOD

Mikrobiološka diagnostika parazitskih okužb tudi v dobi razcveta molekularnih diagnostičnih metod temelji na klasičnih diagnostičnih metodah (npr. mikroskopija, kultivacija), ki so nemalokrat zelo zamudne in zahtevajo laboratorijsko osebje z obsežno laboratorijsko prakso. Kljub temu, da te metode še vedno predstavljajo zlati standard v diagnostiki parazitskih okužb, pogosto ne omogočajo razlikovanja med morfološko podobnimi vrstami parazitov, še manj pa ponujajo vpogled v njihovo znotrajvrstno raznolikost. Klasične diagnostične metode so zato le malo v pomoč pri proučevanju epidemiologije parazitskih okužb, ki je nepogrešljivo pri ugotavljanju virov okužb in načinov širjenja bolezni, kot npr. v primeru epidemij ali bolnišničnih okužb. V prispevku izpostavljamo parazitske okužbe prebavil, za katere pomeni vpeljava molekularnih metod v njihovo mikrobiološko diagnostiko že skoraj nepogrešljivo stalnico modernega parazitološkega laboratorija, hkrati pa je predpogoj za njihovo molekularno epidemiološko spremljanje.

GIARDIOZA

Giardioza je parazitoza, ki jo pri človeku povzroča pražival *Giardia duodenalis* (sin. *intestinalis, lamblia*). Bolezen je razširjena povsod po svetu in se običajno kaže kot akutna ali kronična driska. Čeprav okužba s parazitom pri nekaterih ljudeh poteka brezsimptomno, je lahko driski pridruženo še bruhanje, slabost, bolečine v trebuhu, napenjanje in malabsorpcija, kot posledica okužbe pa se lahko razvije tudi laktozna intoleranca ali sindrom razdražljivega črevesa *(1–3)*. *G. duodenalis* kolonizira tanko črevo človeka in ima dve življenjski obliki. Infektivno, metabolno neaktivno cisto gostitelj običajno zaužije z vodo ali hrano. V tankem črevesu se pod vplivom prebavnih sokov iz ciste sprosti trofozoit, ki je prehranjujoča in deleča se oblika parazita. Trofozoit se po lumnu črevesa prosto giblje ali pa se pritrdi na črevesno sluznico. V odvisnosti od koncentracije žolča v tankem črevesu se trofozoiti encistirajo v ciste, ki gostitelja zapuščajo z iztrebki. Ciste v iztrebkih so takoj infektivne, v okolju lahko preživijo od več tednov do nekaj mesecev. Infektivna doza je majhna, že od 10 do 100 cist *(4)*.

Giardioza je ena najpogostejših parazitoz prebavil človeka. Prevalenca giardioze pri ljudeh je nižja v razvitem svetu (0,4–7,5 %) kot v državah v razvoju, kjer znaša od 8–30 % *(3, 5)*. V Sloveniji je giardioza najpogostejša prijavljiva parazitska bolezen (Nacionalni inštitut za javno zdravje, NIJZ). Letna stopnja obolevnosti, ocenjena na osnovi prijav, je v letu 2012 znašala 1,7/100.000 prebivalcev, manj kot evropsko povprečje istega leta – 5,43/100.000 prebivalcev *(6, 7)*.

Izsledki molekularno-bioloških raziskav so pokazali, da je *G. duodenalis* pravzaprav kompleks več vrst oz. genetskih skupin, ki so si med seboj morfološko zelo podobne ali celo identične. Doslej je opisanih osem takšnih genetskih skupin (A–H) *(3, 8, 9)*. Genetske razdalje med njimi so precej velike in nedavne primerjave genoma genetskih skupin A, B in E, za katere so danes na voljo celotna genomska zaporedja, so pokazale, da gre za različne vrste *(10, 11)*.

Epidemiologija giardioze je izredno kompleksna. K okužbi človeka prispeva več različnih poti prenosa parazita *(5)*. Kljub mnogim raziskavam ostajajo številni epidemiološki vidiki, kot so vloga živali pri okužbi človeka, klinični pomen okužbe z določeno genetsko skupino *G. duodenalis* ter učinkovitost zdravljenja giardioze ob okužbi z določeno genetsko skupino, nejasni *(3, 12–14)*. Genetski skupini A in B lahko okužita tako človeka kot tudi druge primate, živino (genetska skupina A), pse, mačke in nekatere vrste divjih sesal-

cev, medtem ko je ostalih šest genetskih skupin *G. duodenalis* (C–H) specifičnih za svojega gostitelja in ne okuži ljudi *(3)*. Genetski skupini A in B se nadalje delita v več podskupin. Genetska skupina A ima 4 podskupine (AI–AIV), od tega humani izolati pripadajo podskupinama AI in AII, živalski pa podskupinam AI, AIII in AIV. Genetska skupina B se prav tako deli v 4 podskupine (BI–BIV), od katerih humani izolati pripadajo podskupinama BIII in BIV, živalski pa podskupinam BI, BII *(3)*. Obširno se proučuje vloga genetskih skupin A in B pri simptomatiki giardioze in odpornosti na zdravila, vendar so dosedanji rezultati raziskav deljeni *(12–14)*.

Kot je pokazalo proučevanje genetske pestrosti izolatov *G. duodenalis* pri slovenskih bolnikih z giardiozo, sta genetski skupini A in B skorajda enakomerno zastopani, medtem ko je govedo okuženo z genetsko skupino E in zato najverjetneje ni pomemben vir okužbe za človeka. Na osnovi sekvenčne analize nukleotidnih zaporedij treh genetskih lokusov *G. duodenalis* (lokusa za beta-giardin, triozafosfat izomerazo in glutamat dehidrogenazo) smo namreč od 51 uspešno opredeljenih izolatov slovenskih bolnikov z giardiozo pri 26 (51 %) določili genetsko skupino AII in pri 25 (49 %) genetsko skupino BIV *(15)*. Na osnovi tipizacije lokusa za beta-giardin smo 33 izolatov *G. duodenalis* goveda opredelili kot genetsko skupino E, kar smo dodatno potrdili z v ta namen razvito specifično verižno reakcijo s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) v realnem času *(16)*. Glede na rezultate proučevanja genetske pestrosti *G. duodenalis* v Sloveniji živali predvidoma niso pomemben vir okužbe s tem parazitom za človeka.

KRIPTOSPORIDIOZA

Kriptosporidioza je parazitoza, ki jo pri človeku povzročajo praživali iz rodu *Cryptosporidium*. Podobno kot giardioza je tudi kriptosporidioza razširjena povsod po svetu in se pri večini bolnikov z normalno imunostjo kaže v obilni vodeni ali sluzasti driski tudi pet do desetkrat na dan. Drisko navadno spremljajo bolečine v trebuhu, slabost, bruhanje, pomanjkanje teka in nekoliko zvišana telesna temperatura. Driska traja približno 9–15 dni, redkeje več tednov. Bolezen, ki je lahko tudi brez bolezenskih znakov, navadno preneha sama od sebe *(17, 18)*. Pri bolnikih z oslabelo imunostjo je lahko driska dolgotrajna, kronična, traja lahko več mesecev. Bolniki močno shujšajo, saj izgubljajo veliko tekočine. Pred uvedbo antiretrovirusne terapije je kriptosporidioza veljala za enega pomembnejših vzrokov smrti pri bolnikih, okuženih s HIV *(19, 20)*. Okužba lahko pri omenjenih bolnikih povzroči tudi vnetje dihalnih poti, žolčnika, jeter in trebušne slinavke *(19)*. Infektivna oblika parazita so okrog 5 µm velike, izredno odporne in takoj infektivne oociste, s katerimi se človek okuži po fekalno-oralni poti, bodisi z zaužitjem onesnažene vode ali hrane bodisi neposredno od okužene živali ali človeka *(21)*.

Globalno je kriptosporidioza takoj za rotavirozo najpogostejši vzrok driske pri otrocih *(21)*. V Sloveniji je letna stopnja obolevnosti, ocenjena na osnovi prijav, v letu 2012 znašala 0,58/100.000 prebivalcev, manj kot evropsko povprečje istega leta – 3,2/100.000 prebivalcev *(6, 7)*.

Rod *Cryptosporidium* je izredno obsežen. Danes obsega 27 vrst in preko 40 genotipov kriptosporidijev. Večina od slednjih bo po zadostni biološki in molekularni opredelitvi najverjetneje pridobila status samostojne vrste. Človeka lahko okuži skoraj 20 morfološko izredno podobnih ali identičnih vrst/genotipov kriptosporidijev, najpogosteje pa vrsti *C. hominis* in *C. parvum* *(21)*. Medtem ko je *C. hominis* izrazito antropofilna vrsta, torej vrsta, ki okuži človeka, je vrsta *C. parvum* zelo pogosta tudi pri govedu *(22)*. Glede na sekvenčno analizo gena

za 60 kDa velik glikoprotein (GP60), ki je dandanes zelo uporabno orodje za proučevanje molekularne epidemiologije kriptosporidioze, ima vrsta *C. parvum* 14 družin podtipov (IIa–o), od tega imajo zoonotski potencial le družine IIa, IId in III *(23)*. Najpogostejše družine podtipov *C. parvum*, ki okužijo ljudi, so IIa, IIc in IId *(22)*.

V Sloveniji 90 % kriptosporidioze pri človeku povzroča vrsta *C. parvum*, 10 % okužb pa druge vrste/genotipi kriptosporidijev, med katerimi prevladuje antropofilna vrsta *C. hominis (24)*. Podtipi *C. parvum*, ki okužijo ljudi, v več kot 90 % pripadajo družini podtipov IIa, v posameznih primerih pa so ljudje okuženi tudi z antropofilno družino podtipov IIc *(25)*. Tekom let se pogostnost posameznih podtipov znotraj družine podtipov IIa nekoliko spreminja, podtip IIaA15G2R1 pa ves čas ostaja kot najpogostejši podtip. Družina podtipov IIa je tudi najpogostejša (>90 %) družina podtipov, ki okuži govedo v Sloveniji, s podtipom IIaA15G2R1 kot najpogostejšim podtipom *(25)*. Rezultati molekularno epidemioloških raziskav torej kažejo, da je prenos *C. parvum* med obema gostiteljema v Sloveniji pogost in da predstavlja govedo pomemben vir okužbe ljudi.

AMEBOZA

Pri človeku povzroča amebozo ameba *Entamoeba histolytica*. Ameboza je med najbolj razširjenimi parazitskimi okužbami. Letno zaradi nje umre več kakor 100.000 ljudi, v čemer jo od parazitskih bolezni prekašata le malarija in shistosomoza. Osemnajst let je minilo odkar je bila vrsta nepatogene amebe *Entamoeba dispar* uradno ločena od potencialno patogene, sicer morfološko identične vrste *E. histolityca (26)*. Dandanes so podatki o dejanski prevalenci okužbe z eno ali drugo vrsto amebe nepopolni, vendar prevladuje mnenje, da je prevalenca okužbe z *E. dispar* mnogo višja kot z *E. histolytica (27)*. Amebi *E. histolytica* je morfološko podobna še *E. moshkowskii* in nedavno identificirana vrsta *E. bangladeshi*. Obe vrsti lahko najdemo v črevesu človeka, njun patogenetski potencial pa je potrebno še raziskati *(28)*.

Ameboza je razširjena predvsem na indijski podcelini, v Srednji in Južni Ameriki ter Afriki. V Sloveniji za amebozo obolevajo popotniki in imigranti. Okužba je fekalno-oralna, infektivna oblika parazita so ciste, s katerimi se človek običajno okuži ob zaužitvi fekalno onesnažene vode ali hrane. Simptomi črevesne ameboze so akutni amebni kolitis, ki se kaže kot vodena, lahko tudi krvava driska s hudimi tenzemi, akutni nekrotizirajoči kolitis s toksičnim megakolonom (ki je najbolj zaskrbljujoč zaplet amebnega kolitisa in ima visoko umrljivost), apendicitis in amebom – proliferativno granulomatozno vnetje. Manj kot 1 % z *E. histolityca* okuženih ljudi razvije zunajčrevesno amebozo. Za zunajčrevesno obliko bolezni je daleč najbolj pogost amebni jetrni absces, prizadeta pa so lahko še pljuča, možgani, srce in redkeje koža *(29)*.

Mikrobiološka diagnostika črevesne ameboze temelji na mikroskopskem pregledu svežih vzorcev blata bolnikov na prisotnost trofozoitov in cist parazita. Pomanjkljivosti te metode sta vsaj dve. Prvič, če bolniku odvzamemo le en vzorec blata, ima metoda zelo nizko občutljivost. Amebe se v iztrebkih namreč ne izločajo ves čas. Običajno je potrebno odvzeti vsaj tri vzorce blata v desetih dneh, da dosežemo 85–95 % občutljivost metode. Trofozoiti amebe so tudi zelo občutljivi na dejavnike okolja. V svežih vzorcih blata propadejo prej kot v eni uri in jih v mikroskopskem preparatu ni mogoče več prepoznati, če vzorcu blata ni dodan konzervans, ki ohrani njihovo morfologijo. Drugič, trofozoiti in ciste *E. histolytica* so po morfologiji enaki nepatogeni amebi *E. dispar*. Diagnostični za *E. histolytica* so zgolj eritrociti v citoplazmi njenih tro-

fozoitov, vendar le-ti niso nujno prisotni. Trofozoiti *E. dispar* eritrocitov nikoli ne vsebujejo *(29)*. Zaradi pomanjkljivosti klasičnih diagnostičnih metod se v mikrobiološko diagnostiko ameboze uvaja molekularne metode z visoko občutljivostjo, predvsem pa s sposobnostjo ločevanja med *E. histolytica* in drugimi amebami prebavil *(29)*. Žal le-te dandanes še niso standardizirane in mnogokrat niso certificirane za rabo v diagnostiki, zato je njihova validacija v domeni laboratorija, ki jih uporablja.

V Laboratoriju za parazitologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani (v nadaljevanju Laboratorij za parazitologijo) smo od leta 2012–2015 obravnavali 19 vzorcev blata bolnikov, pri katerih na podlagi mikroskopskega pregleda nismo mogli opredeliti vrste amebe in smo jih zato dodatno testirali z molekularno metodo. S PCR v realnem času za sočasno ugotavljanje okužbe z amebama *E. histolytica* in *E. dispar* smo pri enem bolniku ugotovili okužbo z *E. histolytica*, pri šestih pa z nepatogeno amebo *E. dispar*. V istem časovnem obdobju smo v Laboratorij za parazitologijo prejeli osem punktatov jetrnega abscesa enakega števila bolnikov s sumom na zunajčrevesno amebozo, od katerih smo pri štirih s PCR v realnem času potrdili jetrno okužbo z *E. histolytica*.

EHINOKOKOZA

Alveolarna (AE) in cistična ehinokokoza (CE) sta eni izmed najtežjih parazitskih zoonoz, ki ju povzročajo larvalne stopnje trakulj iz rodu *Echinococcus*. Običajno potekata kot kronični jetrni bolezni. CE, ki jo povzroča vrsta *E. granulosus*, je razširjena povsod po svetu, medtem ko je AE, ki jo povzroča *E. multilocularis*, endemična na severni zemeljski polobli, vključno s Severno Ameriko ter nekaterimi azijskimi in evropskimi državami. Človek, ki je naključni vmesni gostitelj trakulj, se okuži z zaužitjem jajčec, ki jih v svojih iztrebkih izločajo z odraslo trakuljo okuženi psi (*E. granulosus*, tudi *E. multilocularis*) in lisice (*E. multilocularis*) *(30)*. Jajčna ovojnica se v prebavilih vmesnega gostitelja raztopi, sproščena ličinka, onkosfera, pa prodre v kapilare, od koder potuje običajno v jetra. Pri CE se na mestu, kjer se onkosfera ustavi, razvije okrogla cista, obdana s kutikulo in napolnjena z bistro tekočino. Mlada cista je navadno brez prekatov, unilokularna, in znotraj opeta z germinativno membrano. Iz germinativne membrane brstijo zarodne kapsule in protoskoleksi. Sčasoma se v cisti razvijejo hčerinske ciste, kar spremeni tipičen unilokularen videz, značilen za mlado cisto *(30, 31)*. Pri AE cista vdira v okolno tkivo kakor tumor. Ima alveolarno strukturo iz več veziklov, velikih od <1 mm do 15–20 cm. Vsak vezikel je navzven obdan s kutikulo, navznoter pa z germinativno membrano. Vsebina veziklov je želatinasta, zarodne kapsule in protoskoleksi so le redko vidni. Meja med tkivom parazita in gostitelja je slabo definirana *(30, 31)*.

Desetletno (2004–2013) povprečje incidenčnih stopenj ehinokokoze v Sloveniji je po podatkih NIJZ 0,28/100.000 prebivalcev, kar je primerljivo z evropskim povprečjem *(6, 32)*. V laboratoriju za parazitologijo beležimo od leta 2008 do danes 53 primerov humane ehinokokoze. Prevladuje CE, kot kažejo seroprevalenčne raziskave, pa imamo v Sloveniji tudi bolnike z AE, kar je v skladu z ugotovljeno 2,6 % prevalenco okužbe z *E. multilocularis* pri lisicah *(33–35)*.

Diagnostika humane ehinokokoze temelji na opazovanju morfoloških značilnosti cist s slikovnimi preiskavami, čemur sledi potrjevanje okužbe s serološkimi metodami in/ali mikroskopskim pregledom vsebine cist na protoskolekse in kaveljčke v hidatidnem pesku. Kadar ciste niso tipične za eno ali drugo vrsto ehinokoka, je identifikacija vrste povzročite-

lja mogoča z molekularnimi metodami, s katerimi tudi ovržemo sum na ehinokokozo v dvomljivih primerih. Običajno to pomeni, da genetski material iz ehinokokne ciste pomnožimo s PCR, pomnoženim odsekom mitohondrijske ali jedrne DNA pa določimo nukleotidno zaporedje, na podlagi katerega lahko sklepamo na okužbo z eno ali drugo vrsto trakulje *(36)*.

Glede na to, da je ehinokokoza zoonoza, je za ustrezen epidemiološki nadzor ključnega pomena podatek o razširjenosti okužbe ne samo pri ljudeh, ampak tudi pri živalih. Za nadzor nad boleznijo je še posebej pomembna pravilna določitev končnega gostitelja trakulje. Ker molekularne metode omogočajo celo vpogled v znotrajvrstne razlike, lahko z njimi odgovorimo na nekatera ključna vprašanja o vzorcih razširjanja ehinokoka v naravi *(36)*.

TENIOZA

Človek je končni gostitelj treh vrst trakulj iz rodu *Taenia*: *T. solium*, *T. saginata* in *T. asiatica*. Ob zaužitju ikričavega svinjskega (*T. solium* in *T. asiatica*) ali govejega (*T. saginata*) mesa, t.j. mesa z ličinkami ali cisticerki teh trakulj, se v njegovem črevesu razvijejo odrasle trakulje. Govorimo o teniozi. Človek je lahko vmesni gostitelj trakulje *T. solium*, če se okuži z jajčeci trakulje in se v njem, predvsem v možganih, lahko pa tudi v mišicah in očeh, razvijejo cisticerki, ki lahko povzročijo hudo bolezen (nevro)cisticerkozo. Nevrocisticerkoza je najpogostejša zajedavska bolezen osrednjega živčevja pri človeku *(31, 36)*.

Trakulji *T. solium* in *T. saginata* sta zaradi trgovine z živino in migracij ljudi razširjeni povsod po svetu, *T. asiatica* pa le v Aziji. V Sloveniji je tenioza prijavljiva nalezljiva bolezen. Med leti 1996–2011 je bilo NIJZ prijavljenih v povprečju 14 primerov tenioze letno, v letih 2012 in 2013 pa le po trije primeri. V letih 2007–2011 je bilo po podatkih Uprave Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR) pri govedu prijavljenih 219 primerov cisticerkoze, pri prašičih pa en primer *(37)*. Humana cisticerkoza je v Sloveniji redka bolezen, predvidoma povezana z imigracijo iz držav nekdanje Jugoslavije. Na podlagi seroprevalenčnih raziskav beležimo v Laboratoriju za parazitologijo od leta 2001 do 2015 devet primerov humane nevrocisticerkoze. Na podlagi epidemioloških podatkov bolnikov predvidevamo, da so se vsi okužili zunaj Slovenije.

Z vidika javnega zdravja je ugotavljanje nosilcev odrasle trakulje *T. solium* poglavitno za preprečevanje humane cisticerkoze. Mikrobiološka diagnostika tenioze temelji na prepoznavi jajčec in za vrsto značilnih odrivkov trakulj v iztrebkih bolnika. Jajčeca trakulj iz rodu *Taenia* so morfološko identična, zato na osnovi mikroskopije ne moremo sklepati na okužbo z eno ali drugo vrsto trakulje, kar pa omogočajo molekularne metode *(36)*. Kot zanimivost povejmo, da rezultati filogenetskih raziskav rodu *Taenia* podpirajo teorijo o afriškem izvoru človeka in predvidevanja o spremembi prehranjevalnih navad zgodnjih hominidov z rastlinojedcev na vse- oz. mesojedce *(38)*.

ZAKLJUČEK

Kljub hitro razvijajoči se molekularno-genetski tehnologiji je razvoj modernih metod za diagnostiko parazitskih okužb zelo počasen. Mnogi novejši diagnostični testi še niso standardizirani, kar medicinske parazitologe sili v zanašanje na klasične mikrobiološke metode, predvsem mikroskopijo. Današnje raziskave so usmerjene v razvoj in optimizacijo molekularnih tehnik, kot sta PCR in izotermalno pomnoževanje, posredovano z zanko (angl. *loop-mediated isothermal amplification*, LAMP). Nekateri testi kot npr. multipla PCR omogočajo sočasno ugotavljanje prisotnosti

več različnih povzročiteljev okužb, kar občutno zniža ceno preiskav. Kaže, da bo v moderni diagnostiki parazitskih okužb pomembno mesto zasedla tudi proteomika, ki bo omogočila kategorizacijo občutljivih posameznikov, razločevanje med različnimi stopnjami okužbe in spremljanje uspešnosti zdravljenja parazitoz.

In memoriam

Dolgoletnemu vodji Laboratorija za parazitologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, cenjenemu parazitologu, prof. dr. Jerneju Logarju (1946–2015), izjemnemu mentorju in sodelavcu, predvsem pa velikemu človeku brezmejne topline.

LITERATURA

1. Halliez MC, Buret AG. Extra-intestinal and long term consequences of Giardia duodenalis infections. World J Gastroenterol. 2013; 19: 8974–85.
2. Leitsch D. Drug resistance in the microaerophilic parasite. Curr Trop Med Rep. 2015; 2: 128–35.
3. Ryan U, Caccio SM. Zoonotic potential of Giardia. Int J Parasitol. 2013; 43: 943–56.
4. Rendtorff RC. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. Giardia lamblia cysts given in capsules. Am J Hyg. 1954; 59: 209–20.
5. Feng Y, Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of Giardia species and giardiasis. Clin Microbiol Rev. 2011; 24: 110–40.
6. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2014 – food- and waterborne diseases and zoonoses. Stockholm: ECDC; 2014.
7. Kraigher A, Sočan M, Klavs I, et al. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2012. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja; 2013.
8. Andrews RH, Adams M, Boreham PF, et al. Giardia intestinalis: electrophoretic evidence for a species complex. Int J Parasitol. 1989; 19: 183–90.
9. Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, et al. Genetic diversity within the morphological species Giardia intestinalis and its relationship to host origin. Infect Genet Evol. 2003; 3: 29–38.
10. Franzen O, Jerlstrom-Hultqvist J, Castro E, et al. Draft genome sequencing of giardia intestinalis assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species? PLoS Pathog. 2009; 5: e1000560.
11. Jerlstrom-Hultqvist J, Ankarklev J, Svard SG. Is human giardiasis caused by two different Giardia species? Gut Microbes. 2010; 1: 379–82.
12. Kohli A, Bushen OY, Pinkerton RC, et al. Giardia duodenalis assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008; 102: 718–25.
13. Benere E, Van Assche T, Cos P, et al. Variation in growth and drug susceptibility among Giardia duodenalis assemblages A, B and E in axenic in vitro culture and in the gerbil model. Parasitology. 2011; 138: 1354–61.
14. Bonhomme J, Le Goff L, Lemee V, et al. Limitations of tpi and bg genes sub-genotyping for characterization of human Giardia duodenalis isolates. Parasitol Int. 2011; 60: 327–30.
15. Šoba B, Islamović S, Skvarč M, et al. Multilocus genotyping of Giardia duodenalis from symptomatic human infections in Slovenia. Folia Parasitologica. V tisku 2015.
16. Van Lith L, Soba B, Vizcaino VV, et al. A real-time assemblage-specific PCR assay for the detection of Giardia duodenalis assemblages A, B and E in fecal samples. Veterinary Parasitology. 2015; 211: 28–34.
17. Chalmers RM, Davies AP. Minireview: clinical cryptosporidiosis. Exp Parasitol. 2010; 124: 138–46.
18. Current WL, Garcia LS. Cryptosporidiosis. Clin Microbiol Rev. 1991; 4: 325–58.
19. Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of Cryptosporidium infection in immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev. 2002; 15: 145–54.
20. Manabe YC, Clark DP, Moore RD, et al. Cryptosporidiosis in patients with AIDS: correlates of disease and survival. Clin Infect Dis. 1998; 27: 536–42.
21. Ryan U, Hijjawi N. New developments in Cryptosporidium research. Int J Parasitol. 2015; 45: 367–73.
22. Shirley DA, Moonah SN, Kotloff KL. Burden of disease from cryptosporidiosis. Curr Opin Infect Dis. 2012; 25: 555–63.

23. Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. Exp Parasitol. 2010; 124: 80–9.
24. Soba B, Petrovec M, Mioc V, et al. Molecular characterisation of Cryptosporidium isolates from humans in Slovenia. Clin Microbiol Infect. 2006; 12: 918–21.
25. Soba B, Logar J. Genetic classification of Cryptosporidium isolates from humans and calves in Slovenia. Parasitology. 2008; 135: 1263–70.
26. Anonymous. Amoebiasis. Wkly Epidemiol Rec. 1997; 72: 97–9.
27. Nair GV, Variyam EP. Noninvasive intestinal amebiasis: Entamoeba histolytica colonization without invasion. Curr Opin Infect Dis. 2014; 27: 465–9.
28. Ali IK. Intestinal amebae. Clin Lab Med. 2015; 35: 393–422.
29. Choudhuri G, Rangan M. Amebic infection in humans. Indian J Gastroenterol. 2012; 31: 153–62.
30. Nunnari G, Pinzone MR, Gruttadauria S, et al. Hepatic echinococcosis: clinical and therapeutic aspects. World J Gastroenterol. 2012; 18: 1448–58.
31. Logar J. Parazitologija človeka. Radovljica: Didakta; 2010.
32. Kraigher A, Sočan M, Klavs I, et al. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2013. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje; 2014.
33. Logar J, Soba B, Kotar T. Serological evidence for human cystic echinococcosis in Slovenia. BMC Infect Dis. 2008; 8: 63.
34. Šoba B, Logar J. Serological evidence for human alveolar echinococcosis in Slovenia (2006-2010). Proceedings of Epidemiology of alveolar echinococcosis in Europe: recent developments and new trends: monitoring and control perspectives; 2010 Dec 8-9; Nancy, France; 2010.
35. Vergles Rataj A, Bidovec A, Žele D, et al. Echinococcus multilocularis in the red fox (Vulpes vulpes) in Slovenia. Eur J Wildl Res. 2010; 56: 819–22.
36. Nakao M, Yanagida T, Okamoto M, et al. State-of-the-art Echinococcus and Taenia: phylogenetic taxonomy of human-pathogenic tapeworms and its application to molecular diagnosis. Infect Genet Evol. 2010; 10: 444–52.
37. Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, Zdravstveni inšpektorat RS, Inštitut za varovanje zdravja RS. Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2013. Ljubljana; 2013.
38. Hoberg EP, Alkire NL, de Queiroz A, et al. Out of Africa: origins of the Taenia tapeworms in humans. Proc Biol Sci. 2001; 268: 781–7.

Zoran Simonović[1*], Alenka Trop Skaza[2]

Cepiva proti črevesnim nalezljivim obolenjem – pregled cepiv v uporabi in v razvoju

Enteric Infections Vaccines – A Review of Vaccines Currently in Use and in Development

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: cepiva, črevesne okužbe, razvoj cepiv

Črevesne okužbe so kljub izboljšanim higiensko sanitarnim razmeram pomemben javnozdravstveni problem. Čeprav število smrti zaradi akutnih infekcijskih drisk upada, v državah v razvoju črevesne okužbe še vedno predstavljajo zelo veliko breme v obolevnosti in umrljivosti, predvsem otrok. Trenutno so za zaščito pred črevesnimi okužbami na voljo le cepiva proti rotavirusnim okužbam, trebušnemu tifusu in koleri. V različnih fazah razvoja so cepiva proti drugim nalezljivim črevesnim obolenjem. V sklopu povzročiteljev virusnih enteritisov razvijajo cepiva proti norovirusnim okužbam, od bakterijskih povzročiteljev pa cepiva proti okužbam, ki jih povzročajo enterotoksigena in enterohemoragična *Escherichia coli, Shigella* spp., *Campylobacter jejuni* in netifusne salmonele. V prispevku predstavljamo pregled obstoječih cepiv proti povzročiteljem črevesnih okužb ter cepiv, ki so v fazi raziskav in razvoja. V Sloveniji sta na voljo cepivi proti trebušnemu tifusu in proti rotavirozi.

ABSTRACT

KEY WORDS: vaccines, enteric infections, vaccine development

Enteric infections are a major public health problem despite global improvements in hygienic and sanitary conditions. Although the annual number of deaths due to diarrheal disease has been in decline, the burden of enteric infections in terms of morbidity and mortality remains especially high in developing countries, particularly among children. At present, only vaccines against rotavirus enteritis, typhoid fever and cholera are available for protection against enteric infections. Vaccines against certain other infectious agents responsible for human enteric infections are also in development, including vaccines against illnesses caused by noroviruses, enterotoxigenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli, Shigella* species, *Campylobacter jejuni* and non-typhoidal salmonella. This article presents a review of vaccines against viral and bacterial enteric infections, both those already in use and those still in development. Only vaccines against typhoid fever and rotavirus gastroenteritis are currently available in Slovenia.

[1*] Asist. Zoran Simonović, dr. med., Nacionalni inštitut za javno zdravje, območna enota Maribor, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; zoran.simonovic@nijz.si

[2] Prim. dr. Alenka Trop Skaza, dr. med., Nacionalni inštitut za javno zdravje, območna enota Celje, Ipavčeva ulica 11, 3000 Celje

UVOD

Črevesne okužbe predstavljajo enega največjih globalnih javnozdravstvenih problemov, saj še vedno predstavljajo drugi najpogostejši vzrok umrljivosti otrok, mlajših od 5 let. Po ocenah Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) se letno pojavi 1,7 milijarde epizod akutnih infekcijskih driske, zaradi katerih umre okoli 760.000 otrok *(1)*. Posamezne črevesne okužbe še vedno predstavljajo pomembno javnozdravstveno breme tudi v državah z dobro organizirano preskrbo s pitno vodo, vzpostavljenimi standardi varne proizvodnje in priprave živil ter z urejenim sistemom odstranjevanja odpadnih voda in odpadkov. Črevesne okužbe se pojavljajo sporadično ali v obliki izbruhov, ki so lahko zaradi globalizacije prehrambno transportnih verig zelo obsežni. SZO ocenjuje, da naj bi imelo tudi v razvitih državah 10–30 % ljudi vsaj enkrat na leto težave zaradi okužbe s hrano.

Pri nas so v zadnjih letih najpogostejši povzročitelji črevesnih okužb rotavirusi in norovirusi, sledijo pa bakterijski povzročitelji *Campylobacter, Salmonellae, Clostridium difficile* in različni sevi *Escherichiae coli*. Norovirusi in rotavirusi so tudi najpogostejši povzročitelji izbruhov, ki jih obravnavamo pri nas *(2)*. V deželah v razvoju so najpogostejši povzročitelji akutnih drisk rotavirusi, *E. coli*, salmonele, šigele, kriptosporidiji, kampilobaktri in *Vibrio cholerae*, v razvitem svetu pa norovirusi *(3)*.

Resen izziv proizvajalcem cepiv predstavlja prav številčnost črevesnih patogenov, njihova raznolikost in potreba po vzpostavitvi lokalne imunosti v črevesni sluznici *(4)*. Razvoj cepiv proti povzročiteljem črevesnih okužb se je začel že pred več kot 40 leti, a le z delnim uspehom. Trenutno so za uporabo dovoljena le cepiva proti rotavirusnim okužbam, cepivo proti trebušnemu tifusu in cepivo proti koleri. V različnih fazah razvoja je vsaj še 50 kandidatnih cepiv, in sicer proti norovirusnim okužbam ter okužbam s salmonelami, šigelami, enterotoksigeni in enterohemoragični *E. coli*, kampilobaktrom in kriptosporidijem *(5, 6)*. V Sloveniji se je trenutno možno cepiti le proti trebušnemu tifusu in rotavirusnim okužbam. Razvoj učinkovitih cepiv proti povzročiteljem črevesnih okužb je še posebej pomemben za revnejše dežele s slabimi sanitarno-higienskimi razmerami in slabše razvito zdravstveno službo. Zaščita pred črevesnimi okužbami s cepljenjem pa je pomembna tudi za potnike iz razvitih dežel, ki potujejo na endemska področja.

CEPIVA PROTI ROTAVIRUSNIM OKUŽBAM

Ocenjujejo, da zaradi rotavirusnih enteritisov na leto umre 400.000–500.000 ljudi *(7)*. Pri otrocih do petega leta starosti so rotavirusne okužbe vzrok 40 % vseh primerov hudih oblik akutne driske, ki zahtevajo bolnišnično zdravljenje.

Razvoj cepiv proti rotavirusnim okužbam se je pričel v 80. letih prejšnjega stoletja. V prvi generaciji rotavirusnih kandidatnih cepiv so bila živa atenuirana cepiva, pripravljena iz antigensko sorodnih nehumanih izolatov rotavirusa (goveji, opičji in ovčji). Klinična učinkovitost teh kandidatnih cepiv je bila relativno slaba, pogosti so bili neželeni učinki. V 90. letih 20. stoletja smo bili priča razvoju druge generacije rotavirusnih cepiv, kjer so z genetskimi prerazporeditvami nehumanim sevom dodali genetske segmente humanih rotavirusov. Leta 1998 je štirivalentno oralno živo cepivo *RotaShield®* (Wywth-Lederle) dobilo dovoljenje za uporabo po dokazani do 90 % učinkovitosti preprečevanja težkih rotavirusnih drisk. Po dobrem letu dni uporabe in cepljenih 1,5 milijona otrok je bilo temu cepivu zaradi povečanega tveganja za pojav intususcepcije odvzeto dovoljenje za uporabo. Leta 2006 sta dobili dovoljenje za promet dve rotavirusni cepivi tretje generacije – petvalentno rekombinantno go-

veje-humano atenuirano cepivo *Rotateq*® (Merck Sharp&Dohme) in monovalentno humano atenuirano cepivo *Rotarix*® (GlaxoSmithKline) *(8)*.

Cepivo *Rotateq*® vsebuje pet rotavirusnih sevov s prerazporejenim genomom G1P[5], G2P[5], G3P[5], G4P[5] in G6P[8]. Cepljenje je sestavljeno iz treh oralnih odmerkov cepiva z medsebojnim razmikom od štiri do deset tednov. S cepljenjem lahko pričnemo po otrokovem 6. tednu starosti, zaključiti pa ga je treba do 32. tedna. Cepivo izkazuje 74 % učinkovitost proti vsem oblikam rotavirusnega enteritisa v prvem letu življenja in 98 % zaščito proti zelo hudi obliki rotavirusne okužbe *(9)*.

Cepivo *Rotarix*® je monovalentno cepivo, ki vsebuje žive atenuirane viruse G1P[8]. Cepljenje se izvede z dvema oralnima odmerkoma cepiva s štiritedenskim presledkom. Prvi odmerek se aplicira po dopolnjenem 6. tednu starosti, cepljenje pa mora biti zaključeno do 24. tedna otrokove starosti *(10)*. Cepivo izzove nastanek imunosti proti cepilnemu tipu virusa, a zaradi navzkrižne reaktivnosti ščiti tudi pred ostalimi serotipi: G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8], G8P[4] in G12P[6]. Cepivo v prvih dveh letih življenja nudi skoraj 80 % zaščito pred kakršno koli obliko rotavirusnega enteritisa in 96 % zaščito pred hudo obliko rotavirusne okužbe, ki zahteva sprejem v bolnišnico *(11)*. Obe cepivi tretje generacije sta vključeni v cepilne programe številnih držav. V Sloveniji sta za cepljenje dojenčkov na voljo obe cepivi. Cepljenje je samoplačniško in ni vključeno v program obveznega/rutinskega cepljenja otrok. Cepljenje dovolj velikega deleža otrok proti rotavirusnim okužbam zaradi kolektivne imunosti ščiti tudi necepljene *(12)*.

V nekaterih državah so v uporabi še druga cepiva proti rotavirusnim okužbam, ki pa imajo dovoljenje za uporabo le znotraj teh držav. Na Kitajskem uporabljajo monovalentno ovčje atenuirano cepivo LLR (angl. *Lanzhou lamb rotavirus*), ki spada med rotavirusna cepiva prve generacije, njegova učinkovitost in varnost pa nista bili dobro proučeni. V Vietnamu uporabljajo *Rotavin-M1*, ki je po sestavi in načinu aplikacije podoben cepivu *Rotarix*®. Cepivo *ROTAVAC*®, ki ima dovoljenje za uporabo v Indiji, temelji na naravno pridobljeni prerazporeditvi sevov humanega in govejega seva G9P[11], ki je v kliničnih raziskavah pokazalo dovolj visoko stopnjo zaščite pred rotavirusnimi okužbami *(5)*. V zgodnjih fazah predkliničnega ali kliničnega raziskovanja so še nekatera druga oralna atenuirana ter inaktivirana cepiva za intramuskularno in/ali intradermalno aplikacijo *(5)*.

CEPIVA PROTI TREBUŠNEMU TIFUSU

Trebušni tifus, ki ga povzroča *Salmonella* Typhi, in paratifus, ki ga povzročajo *Salmonella* Paratyphi A, B in C, ostajata pomemben javnozdravstveni problem predvsem v državah južne in jugovzhodne Azije, Afrike ter tudi Južne Amerike. V razvitem delu sveta se bolezen pojavlja izjemoma; večina obolelih okužbo prinese iz endemičnih držav. Na leto naj bi za tifusom zbolelo 21,7 milijonov ljudi, za paratifusom pa 5,4 milijone ljudi. Zaradi tifusa letno umre več kot 200.000 ljudi *(13)*.

Za cepljenje proti trebušnemu tifusu so v uporabi inaktivirana parenteralna cepiva ter atenuirano oralno cepivo. Parenteralna inaktivirana cepiva proti tifusu temeljijo na prečiščenem polisaharidnem kapsularnem Vi antigenu *S.* Typhi, ki je sicer odgovoren za virulenco povzročitelja. Pri nas sta dosegljivi cepivo *Typherix*® (GlaxoSmithKline) in *Typhim Vi*® (Sanofi Pasteur), ki vsebujeta 25 µg Vi antigena in se lahko uporabljata pri osebah, starejših od dveh let. Cepivo po parenteralni aplikaciji enojnega odmerka izzove nastanek serumskih anti-Vi protiteles pri 85–95 % odraslih in otrok, starejših od dveh

let. Učinkovitost cepiva pri zaščiti pred okužbo je nekaj več kot 70 % *(14)*. Obstajajo tudi kombinirana cepiva proti tifusu in hepatitisu A – *Hepatyrix*® (GlaxoSmith-Kline) in *Viatim*® (Aventis Pasteur) –, ki vsebujejo enako komponento tifusa kot monovalentna inaktivirana cepiva proti tifusu.

Predvsem v ZDA pogosto uporabljajo živo atenuirano oralno cepivo *Vivotif*® (Berna Biotech, Crucell), ki so ga razvili v zgodnjih 70. letih 20. stoletja in vsebuje liofiliziran mutant seva *Salmonella* Typhi – Ty21a. Cepivo je na voljo v obliki kapsul ali praška in se aplicira v treh odmerkih v razmiku dveh dni. Cepivo izzove nastanek protiteles in močan celični imunski odziv. Trije odmerki zagotovijo 67 % zaščito pred okužbo v obdobju treh let, v obdobju sedmih let pa je zaščita 62 % *(15)*. Cepivo v ZDA uporabljajo za zaščito oseb, starejših od šest let, drugje pa s cepivom cepijo odrasle ter otroke, starejše od dveh let.

V fazi razvoja so številna konjugirana tifusna cepiva, kjer je Vi antigen vezan na proteinski nosilec. Trenutno ima dovoljenje za promet le ena oblika konjugiranega cepiva, kjer je Vi antigen vezan na tetanusni toksoid *Peda-typhi*® (BioMed). Uporaba cepiva je dovoljena le v Indiji, saj so klinični podatki o varnosti in imunogenosti za zdaj še omejeni *(16)*. Dobre rezultate glede učinkovitosti (več kot 91 %) ima konjugirano cepivo, kjer je Vi antigen vezan na netoksičen rekombinantni protein, ki je identičen eksotoksinu *Pseudomonas aeruginosa (17)*. Dodatno razvijajo tudi izboljšano obliko oralnega atenuiranega cepiva, da bi z ohranjenim dosedanjim profilom varnosti dosegli boljšo učinkovitost in zmanjšali število potrebnih odmerkov *(18)*. Ker parenteralna cepiva temeljijo na Vi antigenu *S.* Typhi, ne učinkujejo na okužbe s *S.* Paratyphi, ki tega antigena nima, medtem ko živo oralno cepivo kaže določeno zaščito tudi pred okužbo s paratifusom *(19)*.

V Sloveniji je cepljenje proti tifusu po Programu imunoprofilakse in kemoprofilakse obvezno za vse osebe, ki živijo v skupnem gospodinjstvu s klicenoscem trebušnega tifusa, in za osebe, ki so pri svojem delu izpostavljene nevarnosti okužbe, priporočljivo pa za potnike, ki potujejo na endemična področja *(20)*.

CEPIVA PROTI KOLERI

Po ocenah SZO kolera letno povzroči okoli 3–5 milijonov obolenj in 100.000–120.000 smrti *(21)*. Trenutno imata široko dovoljenje za uporabo dve vrsti inaktiviranih oralnih cepiv proti koleri, ki se večinoma uporabljata za zaščito potnikov iz razvitih držav, ki potujejo na endemična področja, ali kot dodatni ukrep pri obvladovanju izbruhov kolere na endemskih območjih.

Inaktivirano oralno cepivo *Dukoral*® (Crucell) ima dovoljenje za uporabo od leta 1991 in ga uporabljajo v 65 državah sveta. Vsebuje mrtve celice *Vibrio cholerae* 01 obeh serotipov (Inaba in Ogawa) in obeh biotipov (klasični in El Tor) z dodanim prečiščenim rekombinantnim toksinom kolere – podenoto B. Shema peroralne aplikacije je sestavljena iz dveh odmerkov cepiva za odrasle in otroke, starejše od šest let, z dvotedenskim presledkom (minimalno enotedenski in maksimalno šesttedenski razmik). Otroci, stari 2–6 let, prejmejo tri odmerke. Raziskave so pokazale, da cepivo nudi 85 % zaščito pred okužbo šest mesecev po cepljenju. Zaščita nato postopoma pade na 62 oz. 58 % v prvem in drugem letu po cepljenju, v tretjem letu po cepljenju pa je le 18 %. Cepivo nudi tudi kratkoročno zaščito pred enterotoksigeno *E. coli* zaradi navzkrižne reakcije termolabilnega toksina *E. coli* s toksinom kolere *(22)*.

Inaktivirano cepivo *Shanchol*® (Shantana Biotechnics) ima dovoljenje za uporabo od leta 2009. Gre za bivalentno cepivo, ki vsebuje mrtve celice *V. cholerae* 01

klasičnega (serotipa Inaba in Ogawa) in El Tor (serotip Inaba) biotipa ter mrtve celice *V. cholerae* seva O139. Cepivo ima dovoljenje za uporabo pri starejših od enega leta in se aplicira v dveh odmerkih v razmiku dveh tednov. V triletnem obdobju po cepljenju ima cepivo 66 % učinkovitost *(23)*. V Vietnamu uporabljajo cepivo *mORCVAX®* (Vabiotech) z identično sestavo, kot jo ima *Shanchol®*. Do leta 2004 so proizvajali živo atenuirano cepivo *Orochol®* (Crucell). To je vsebovalo genetsko spremenjen klasičen sev *V. cholerae* 01 Inaba, ki izdeluje B-podenoto toksina kolere (angl. *cholera toxin B subunit*, CTB), ne pa podenote A (angl. *cholera toxin A subunit*, CTA). Cepivo se v kliničnih razmerah ni izkazalo kot učinkovito in ga trenutno ne izdelujejo več *(24)*. V zgodnjih fazah kliničnih raziskav so štiri kandidatna cepiva, ki temeljijo na oralni aplikaciji živega oslabljenega cepiva. Tri vrste kandidatnih cepiv so v fazi predkliničnih raziskav *(5)*.

CEPIVA PROTI OKUŽBAM Z *E. COLI*

Enterotoksigena *E. coli* (ETEC) je glavni vzrok otroške driske v manj razvitem delu sveta in driske potnikov, ki potujejo na ta področja. Povzročila naj bi okoli milijardo diarealnih epizod letno in 300.000–400.000 smrti *(25)*.

Cepiva proti ETEC so v fazi raziskav. Glavne težave pri pripravi cepiva so velika raznovrstnost sevov in njihove virulence ter slaba imunogenost termostabilnega enterotoksina (angl. *heat-stable toxin*, ST). Na drugi strani pa je termolabilen enterotoksin (angl. *heat-labile toxin*, LT) strukturno zelo podoben toksinu kolere, in zato cepivo *Dukoral®* nudi določeno stopnjo zaščite tudi pred drisko, povzročeno z ETEC. V raziskavah je cepivo izkazalo 60–67 % zaščito pred drisko, povzročeno z ETEC, ki proizvaja LT, in se priporoča kot zaščita za potnike, ki potujejo na endemična območja.

Pristopi k razvoju specifičnih cepiv proti ETEC vključujejo uporabo živih ali mrtvih celic ETEC, prečiščenih rekombinantnih fimbrijskih antigenov (imenovanih tudi *colonization factor antigens* – CFA), termolabilnega ali termostabilnega in termostabilnega toksoida hkrati ter užitnih transgenskih rastlin, ki izražajo CTB *(26)*. Cepiva, ki se nahajajo v napredovalih fazah kliničnega raziskovanja, izkazujejo slabo klinično učinkovitost. Transkutani obliž, ki sprošča LT, je dokazano varen in imunogen, a v tretji fazi raziskovanj niso dokazali zaščitne učinkovitosti *(27)*. V zadnji fazi raziskovanj se je kot klinično neučinkovito izkazalo tudi cepivo, sestavljeno iz več inaktiviranih ETEC sevov in rekombinantnim prečiščenim CTB *(28)*. Nekaj kandidatnih cepiv se nahaja v zgodnjih fazah kliničnega razvoja. Cepiva temeljijo na oralni administraciji inkativiranih celic ETEC, živih atenuiranih sevih ETEC in mutiranem LT, ter na aplikaciji prečiščenih CFA v obliki obliža *(6)*. V predkliničnih stadijih raziskujejo varnost in imunogenost intranazalno, intragastrično ali intraabdominalno apliciranih kandidatnih cepiv. Ta vsebujejo bodisi cele mrtve celice z dodanimi LT in CTB toksini ali pa uporabljajo atenuirane vektorje (*Shigella*) za ekspresijo antigenov ETEC, kombinacijo mutiranega LT, vezanega na mutiran ST, oziroma druge proteine ETEC, ki so vključeni v mehanizme adherence ETEC. Pred zadnjo fazo kliničnih raziskav se nahaja tudi cepivo proti enterohemoragični *E. coli* (EHEC), ki temelji na O-specifičnem polisaharidu *E. coli* O157:H7, konjugiranem na rekombinantni eksotoksin A *Pseudomonas aeruginosa*.

CEPIVA PROTI OKUŽBAM S ŠIGELAMI

Okužbe z bakterijami iz rodu *Shigella* predstavljajo veliko javnozdravstveno breme predvsem v deželah v razvoju, kjer naj bi povzročale več kot 160 milijonov okužb

letno, večinoma pri otrocih, mlajših od petih let *(29)*.

Razvoj cepiv otežuje široka antigenska raznolikost sevov. Zaščitna imunost pred šigelami je namreč tipsko specifična in usmerjena na O-somatski antigen. Ker so ljudje edini rezervoar teh bakterij, razvoj cepiv omejuje tudi odsotnost živalskih modelov. Kljub vsemu je v razvoju vsaj deset kandidatnih cepiv proti okužbam s šigelami, ki jih lahko razdelimo v dve skupini: cepiva z živimi atenuiranimi ali inaktiviranimi celimi bakterijskimi celicami ter konjugirana cepiva. V napredovali fazi kliničnega razvoja se nahaja konjugirano cepivo, ki temelji na antigenu O *Shigella flexneri* in *Shigella sonnei*, konjugiranem na rekombinantni eksoprotein A *Pseudomonas aeruginosa*. Cepivo je varno in imunogeno, zaščitna učinkovitost pa še ne dovolj visoka *(30)*. V zgodnjih fazah kliničnega razvoja se nahajajo oralna živa atenuirana cepiva, ki vsebujejo različne vrste šigel (*S. flexneri, S. dysenteriae, S. sonnei*) ter intranazalni inaktivirani cepivi. Prvo vsebuje bakterijske komponente različnih vrst šigel, drugo pa imunogene proteine in lipopolisaharide, ki so skupni vsem štirim vrstam šigel. V predklinični fazi razvoja se nahajajo atenuirana in inaktivirana cepiva druge generacije *(6)*.

CEPIVA PROTI NETIFUSNIM SALMONELOZAM

Ocenjuje se, da netifusne salmoneloze (*Salmonella* Typhimurium in *Salmonella* Enteritidis) povzročijo skoraj 100 milijonov primerov okužb in 155.000 smrti letno *(31)*. Le eno kandidatno cepivo je doseglo prvo fazo kliničnega preizkušanja (z mutacijami atenuirana *Salmonella* Typhimurium). V predkliničnem razvoju se nahajajo konjugirana cepiva, kjer je antigen O vezan na proteinski nosilec, ter živa atenuirana cepiva *Salmonella* Typhimurium in *Salmonella* Enteritidis *(6)*.

CEPIVA PROTI KAMPILOBAKTERIOZI

Campylobacter jejuni velja za enega najpogostejših bakterijskih povzročiteljev diarealne bolezni v razvitih državah. Razen akutne driske so iz javnozdravstvenega vidika pomembne tudi možne posledice prebolele bolezni (sindrom Guillain-Barré, reaktivni artritis in sindrom iritabilnega črevesja). Učinkovitega cepiva proti kampilobakteriozi še ni, kandidatna cepiva so v predkliničnem proučevanju in večinoma namenjena za uporabo pri perutnini. Obetajoč je razvoj cepiva za humano uporabo, ki temelji na kapsularnih polisaharidih, konjugiranih na netoksično obliko davičnega toksina CRM197 *(6)*.

CEPIVA PROTI NOROVIRUSNIM OKUŽBAM

Norovirusi so najpogostejši povzročitelji izbruhov enteritisa in drugi najpogostejši vzrok hospitalizacij zaradi črevesnih okužb. Razvoj cepiv je otežen zaradi relativno kratkotrajne imunosti, ki sledi okužbi, in zaradi velike genske variabilnosti ter majhne antigenske navzkrižne reaktivnosti. Zaradi onemogočene kultivacije virusa razvoj živih cepiv ni možen. Kandidatna cepiva tako temeljijo na sintezi VLPs (angl. *virus-like particles*). Edino cepivo v nadaljevalni fazi kliničnega raziskovanja je intramuskularno cepivo, ki vsebuje VLPs genogrupe GI.1 in GII.4. Trenutne raziskave kažejo obetajoče rezultate varnosti, imunogenosti in učinkovitosti *(32)*. Troje kandidatnih cepiv se nahaja šele v fazi predkliničnega raziskovanja *(5)*.

ZAKLJUČEK

Črevesne nalezljive bolezni predstavljajo pomembno javnozdravstveno breme tako v manj razvitih kot tudi v razvitih predelih sveta. So vodilni vzrok obolevnosti in umrljivosti otrok, ki živijo na območjih s slabšo dostopnostjo do neoporečne hra-

ne in pitne vode. Cepljenja proti najpogostejšim povzročiteljem črevesnih okužb lahko predstavljajo pomemben člen pri zmanjševanju bremena črevesnih okužb. Trenutno so v uporabi le cepiva proti rotavirusnim okužbam, trebušnemu tifusu in koleri. Cepljenje proti rotavirusnim okužbam je namenjeno zaščiti najmlajših otrok in se uporablja tudi pri nas. Cepljenje proti trebušnemu tifusu lahko izvedemo pri osebah, starejših od dveh let. Cepljenje pri nas priporočamo vsem, ki živijo v skupnem gospodinjstvu s klicenoscem trebušnega tifusa, osebam, ki so pri svojem delu izpostavljene nevarnosti okužbe, ter potnikom, ki potujejo na endemična področja. Cepivo proti koleri, ki v Sloveniji ni na voljo, v svetu uporabljajo predvsem za obvladovanje izbruhov in za zaščito potnikov, ki potujejo na endemična področja.

Čeprav proučujejo številna kandidatna cepiva proti različnim drugim povzročiteljem črevesnih okužb, pa v bližnji prihodnosti učinkovitih novih cepiv še ne pričakujemo. V nadaljevalnih fazah kliničnega razvoja se sicer nahajajo cepiva proti ETEC, EHEC, okužbam s šigelami in norovirusi. Kandidatna cepiva proti kampilobakteriozi in salmonelozam se nahajajo v predkliničnih stadijih razvoja oziroma v fazah zgodnjih kliničnih raziskav.

LITERATURA

1. WHO. Diarrhoeal disease [internet]. World Health Organization; 2013 [citirano 2015 Sep 29]. Dosegljivo na: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/
2. Kraigher A, Sočan M, Klavs I, et al. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2012. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2014.
3. UNICEF/WHO. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done [internet]. New York/Ženeva; 2009 [citirano 2015 Sep 29]. Dosegljivo na: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241598415_eng.pdf
4. Dougan G, Huett A, Clare S. Vaccines against human enteric bacterial pathogens. Br Med Bull. 2002; 62: 113–23.
5. O'Ryan M, Vidal R, del Canto F, et al. Vaccines for viral and bacterial pathogens causing acute gastroenteritis: Part I: Overview, vaccines for enteric viruses and Vibrio cholerae. Hum Vaccin Immunother. 2015; 11 (3): 584–600.
6. O'Ryan M, Vidal R, del Canto F, et al. Vaccines for viral and bacterial pathogens causing acute gastroenteritis: Part II: Vaccines for Shigella, Salmonella, enterotoxigenic E. coli (ETEC) enterohemorragic E. coli (EHEC) and Campylobacter jejuni. Hum Vaccin Immunother. 2015; 11: 601–19.
7. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, et al. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2012; 12: 136–41.
8. Poljak M. Cepiva proti rotavirusnim okužbam. Med Razgl. 2007; 46 Suppl 2: 163–74.
9. Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, et al. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. N Engl J Med. 2006; 354 (1): 23–33.
10. Rotarix® product information [internet]. 2015 [citirano 2015 Sep 29]. Dosegljivo na: http://emc.medicines.org.uk/emc/assets/c/html/displaydoc.asp?documentid=17840
11. Vesikari T, Karvonen A, Prymula R, et al. Efficacy of human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in European infants: randomised, double-blind controlled study. Lancet. 2007; 370: 1757–63.
12. Pollard SL, Malpica-Llanos T, Friberg IK, et al. Estimating the herd immunity effect of rotavirus vaccine. Vaccine. 2015; 33 (32): 3795–800.
13. Crump JA, Luby SP, Mintz ED. The global burden of typhoid fever. Bull World Health Organ. 2004; 82: 346–53.

14. Levine MM. Typhoid fever vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, eds. Vaccines. 4th ed. New York: Saunders; 2004. p. 1057–93.
15. Levine MM, Ferreccio C, Abrego P et al. Duration of efficacy of Ty21a, attenuated Salmonella typhi live oral vaccine. Vaccine. 1999; 17 (Suppl 2): S22–7.
16. WHO. Information Sheet. Observed rate of vaccine reactions. Typhoid vaccine [internet]. World Health Organization; 2014 [citirano 2015 Sep 29]. Dosegljivo na: http://www.who.int/vaccine_safety/initiative/tools/Typhoid_vaccine_rates_information_sheet.pdf
17. Lin FY, Ho VA, Kheim HB, et al. The efficacy of a Salmonella Typhi Vi conjugate vaccine in two-to-five-year-old children. N Engl J Med. 2001; 344 (17): 1263–9.
18. Tacket CO, Levine MM. CVD 908, CVD 908-htrA, and CVD 909 live oral typhoid vaccines: a logical progression. Clin Infect Dis. 2007; 45: S20–3.
19. Crump JA, Mintz ED. Global trends in typhoid and paratyphoid Fever. Clin Infect Dis. 2010; 50: 241–6.
20. Program cepljenja in zaščite z zdravili za leto 2015. Uradni list RS št. 40/2015.
21. WHO. Cholera. Fact sheet [internet]. World Health Organization; 2015 [citirano 2015 Sep 29]. Dosegljivo na: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/en/
22. WHO. Cholera, 2013. Wkly Epidemiol Rec. 2014; 8: 345–56.
23. Sur D, Kanungo S, Sah B, et al. Efficacy of a low-cost, inactivated whole-cell oral cholera vaccine: results from 3 years of follow-up of a randomized, controlled trial. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5 (10): e1289.
24. Richie EE, Punjabi NH, Sidharta YY, et al. Efficacy trial of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in North Jakarta, Indonesia, a cholera-endemic area. Vaccine. 2000; 18 (22): 2399–410.
25. Sánchez J, Holmgren J. Virulence factors, pathogenesis and vaccine protection in cholera and ETEC diarrhea. Curr Opin Immunol. 2005; 17 (4): 388–98.
26. Boedeker EC. Vaccines for enterotoxigenic Escherichia coli: current status. Curr Opin Gastroenterol. 2005; 21 (1): 15–9.
27. Behrens RH, Cramer JP, Jelinek T, et al. Efficacy and safety of a patch vaccine containing heat-labile toxin from Escherichia coli against travellers' diarrhoea: a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled field trial in travellers from Europe to Mexico and Guatemala. Lancet Infect Dis. 2014; 14 (3): 197–204.
28. Sack DA, Shimko J, Torres O, et al. Randomised, double-blind, safety and efficacy of a killed oral vaccine for enterotoxigenic E. Coli diarrhoea of travellers to Guatemala and Mexico. Vaccine. 2007; 25 (22): 4392–400.
29. Niyogi SK. Shigellosis. J Microbiol. 2005; 43 (2): 133–43.
30. Passwell JH, Ashkenzi S, Banet-Levi Y, et al. Age-related efficacy of Shigella O-specific polysaccharide conjugates in 1–4-year-old Israeli children. Vaccine. 2010; 28 (10): 2231–5.
31. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, et al. The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis. Clin Infect Dis. 2010; 50 (6): 882–9.
32. Treanor JJ, Atmar RL, Frey SE, et al. A novel intramuscular bivalent norovirus virus-like particle vaccine candidate – reactogenicity, safety, and immunogenicity in a phase 1 trial in healthy adults. J Infect Dis. 2014; 210 (11): 1763–71.

Alojz Ihan[1]

Imunski odziv in razvoj cepiv proti bakteriji *Helicobacter pylori*

The Immune Response and the Development of Vaccines against Helicobacter pylori

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Helicobacter pylori*, imunski odziv, aktivacija limfocitov, cepivo

Imunski odziv proti *Helicobacter pylori* vključuje različne mehanizme, ki gostitelju koristijo, nekateri pa mu povzročajo škodo. Prirojeni imunski odziv proti *Helicobacter pylori* privede do kroničnega sluzničnega vnetja in posledične aktivacije protivnetnih odzivov, ki zaradi zaviranja specifičnih imunskih odzivov omogočajo perzistenco okužbe. To je pomemben vzrok, da poskusi izdelave učinkovitih cepiv še niso privedli do njihove praktične uporabe za zaščito ljudi. Razvoj novih potencialnih cepiv proti *Helicobacter pylori* kombinira imunizacijo s klasičnimi antigeni *Helicobacter pylori* (ureaza, CagA, HP-NAP, HSPA) z inovativnimi načini njihove aplikacije (mikrosfere, vektorji, himerni adjuvansi). Poleg tehnoloških inovacij pa bo za učinkovito cepivo potrebno še poglobljeno poznavanje imunopatoloških mehanizmov med naravno okužbo s *Helicobacter pylori* in po drugi strani dejavnikov, ki omogočajo perzistenco *Helicobacter pylori* kljub kronični aktivaciji prirojenih in pridobljenih imunskih odzivov v okuženi sluznici. Samo cepivo, ki bo poleg vzbujanja intenzivnega specifičnega imunskega odziva proti *Helicobacter pylori* povzročilo še ustrezno spremembo sluzničnega vnetnega odziva v smeri regeneracije sluznice, bo lahko postalo model za doseganje sterilizacijske imunosti, ki po cepljenju prepreči naselitev *Helicobacter pylori* na želodčni sluznici.

ABSTRACT

KEY WORDS: *Helicobacter pylori*, immune response, lymphocyte activation, vaccine construction

The immune response to *Helicobacter pylori* involves different mechanisms that are both protective and damaging to the host. The innate and the adaptive immune responses lead to inflammatory as well as anti-inflammatory responses, allowing for persistence of many infections. Thus, developing new therapeutics and effective vaccines against *Helicobacter pylori* has proven to be arduous. Despite many immunisation experiments, using various routes of immunisation with classical as well as recombinant *Helicobacter pylori* vaccines (urease, CagA, HP-NAP, HspA, DNA, hymeric molecules, living vectors, microspheres), no effective vaccine is currently available for humans. New directions for succcessful vaccine construction should be built on deeper knowledge of immuno-

[1] Prof. dr. Alojz Ihan, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; alojz.ihan@mf.uni-lj.si

pathological events during natural *Helicobacter pylori* infection and factors leading to the resolution of infection: mandatory is a new insight about the interplay of the innate response to *Helicobacter pylori*, mucosal inflammation, *Helicobacter pylori* virulence factors inducing immune responses, regulation of the adaptive responses to *Helicobacter pylori* as well as construction of novel vaccine platforms for achieving a broad immune response, leading to a sterilizing immunity.

UVOD

Okužba s *Helicobacter pylori* povzroča kronični gastritis, razjedo dvanajstnika in želodca ter rak želodca. Povzročitelja sta leta 1982 odkrila avstralska raziskovalca Warren in Marshall, ki sta bakterijo sprva poimenovala *Campylobacter pylori*. Leta 1989 so bakterijo *Campylobacter pylori* preimenovali v *Helicobacter pylori*. Za svoje odkritje sta Warren in Marshall leta 2005 prejela Nobelovo nagrado *(1)*.

H. pylori v manj razvitih delih sveta okužuje preko 50 % populacije, v razvitem svetu je okuženost manjša. V Sloveniji smo v zadnjih petnajstih letih opazili prepolovitev prevalence okužbe, ki v povprečju znaša dobrih 25 %, v populaciji starejših od 60 let pa dobrih 50 %. Čeprav je okužba z bakterijo *H. pylori* v razvitem svetu čedalje redkejša, njen pomen v etiologiji kroničnega gastritisa, ulkusne bolezni želodca in nekaterih oblik neoplazem želodca ostaja *(2)*.

Bakterija je po Gramu negativna, mikroaerofilna, gibljiva spiralna palčka, ki pod določenimi pogoji preide v kokoidno obliko in je sposobna preživeti pri zelo nizkem pH v želodcu. Podobno kot druge bakterije, ki so specializirane za eno ekološko nišo, ima *H. pylori* majhen genom (1,67 mega baznih parov), ki kodira metabolno pomembne gene. *H. pylori*, pridobljena iz različnih izolatov, se med seboj razlikuje v genetskem prstnem odtisu. Kljub temu pa so proteini, ki jih DNA kodira, enaki, saj večinoma prihaja do zamenjav na zadnjem mestu kodona, kar zaradi degeneriranosti genskega koda ne povzroči spremembe v aminokislinskem zaporedju proteina *(3)*.

Okužba s *H. pylori* povzroča močne lokalne imunske odzive v želodčni sluznici gostiteljev. V služničnem vnetju sodelujejo nevtrofilci, limfociti B in T, plazmatke, makrofagi in dendritične celice (angl. *dendritic cells*, DC). V vnetje so pomembno vključene tudi epitelijske celice – s tvorjenjem citokinov zaradi okužbe s *H. pylori* vzdržujejo vnetje, njihovo spremenjeno delovanje v vnetnem okolju pa ovira obnovo sluznice. Želodčna sluznica s *H. pylori* okuženih ljudi vsebuje povečano koncentracijo provnetnih citokinov, kot so interlevkini (IL), in sicer IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, in tumor nekrotizirajočega faktorja alfa (TNF-α), ter protivnetnih citokinov IL-4 in IL-10 *(2)*. Povečana proizvodnja vnetnih citokinov stimulira aktivacijo in razmnoževanje specifičnih služničnih citotoksičnih spominskih limfocitov T in limfocitov B, ki proizvajajo imunoglobuline (Ig) A in IgG. Kljub temu pa specifični imunski odziv ne more odpraviti bakterijske okužbe sluznice, ki brez antibiotičnega zdravljenja navadno ostane doživljenjska *(2, 3)*.

Ker *H. pylori* kolonizira sluznico želodca, je delovanje služničnega imunskega odziva tisto, ki determinira razmerje med *H. pylori* in želodčno sluznico *(1)*. Želodčni epitel je osnovna celična pregrada med želodčno vsebino in notranjostjo organizma. Imunski sistem mora učinkovito zaščititi želodec proti patogenom, ne da bi poškodoval epitelij ali motil druge funkcije sluznice. Med njimi je pomemb-

na ustrezna tvorba želodčne kisline, zelo pomembno je tudi ustrezno razlikovanje mikrobnih in prehranskih antigenov zaradi vzdrževanja tolerance do slednjih *(2, 4)*.

PRILAGODITVENI MEHANIZMI *H. PYLORI* NA GOSTITELJA

Med okužbo *H. pylori* kolonizira površino epitela želodca zlasti v antrumu. *H. pylori* ne biva v kislem okolju v lumnu želodca, ampak kolonizira bolj nevtralno mikrookolje sluzi in površine epitelijskih celic. Poleg tega *H. pylori* proizvaja ureazo za pridobivanje amoniaka, s čimer se bakterija varuje pred kislino. Dobra gibljivost omogoča bakteriji, da se premakne skozi sluz na površje epitelijskih celic želodca. Veliko število adhezijskih molekul bakteriji omogoča stabilno povezavo z različnimi molekulami sluzi in površine želodčnega epitelija *(5)*.

Posebna prilagoditev *H. pylori* je v tem, da bakterija izraža adhezijske molekule le v določenih fazah rasti bakterij. To bakteriji omogoči odlepitev od mrtve epitelijske celice, ki se odlušči od sluznice v lumen želodca in pritrditev na molekule sluzi, prek katere bakterija z aktivnim gibanjem ponovno pride do živih epitelijskih celic v sluznici. To je mehanizem, ki *H. pylori* omogoča dolgotrajno perzistenco v želodcu *(6)*.

Mehanizmi naravne sluznične odpornosti preprečujejo mikrobno invazijo s čvrstimi povezavami med epitelijskimi celicami, ki jih dopolnjuje obrambna funkcija viskozne sluzi, ki vsebuje različne antibakterijske protein (lizocim, laktoferin, interferoni, defenzin). Odziv epitelijskih celic na adherirane *H. pylori* in s toksini izzvane poškodbe je sproščanje citokinov in drugih vnetnih mediatorjev, ki povzročijo lokalno infiltracijo nevtrofilcev, monocitov in mastocitov *(7)*. Želodčne epitelne celice ob vezavi *H. pylori* prepoznajo nevarne signale prek svojih receptorjev TLR (angl. *toll-like receptors*), posledica je citokinska aktivacija celic naravne odpornosti in vnetja. Želodčne epitelne celice zaradi svojih receptorjev TLR povzročajo sluznično vnetje ves čas okužbe s *H. pylori*, ob tem pa je narava vnetja drugačna kot pri klasičnem tkivnem bakterijskem vnetju s po Gramu negativnimi bakterijami, ki ga povzroči vezava lipopolisaharida (LPS) na TLR4 makrofagov. *H. pylori* ima modificirano strukturo LPS, ki ob vezavi na želodčne epitelijske celice aktivira predvsem TLR2. Posledično nastane predvsem vnetje, kjer namesto aktivacije TLR4 in produkcije TNF in IL-6, prevladuje tvorjenje citokinov IL-12 in IL-18. Posledica je kronično vnetje brez intenzivne infiltracije nevtrofilcev, ki sicer povzročajo gnojno vnetje *(8)*. LPS *H. pylori* v primerjavi z drugimi bakterijskimi LPS inducira malo NF-κB (angl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) aktivacijo prek TLR4, zato pa prek TLR2 intenzivnejšo tvorbo IL-12 in IL-18.

Kronično vnetje je ključno za patogenezo okužbe s *H. pylori*. Med vnetjem, ki je posledica okužbe, vnetišče intenzivno infiltrirajo mezenhimske matične celice, ki izvirajo iz kostnega mozga. Te celice naj bi bile poglavitni patogenetski dejavnik za nastanek raka želodca, saj njihova diferenciacija v vneti sluznici ne privede do obnovitve epitelija. Namesto tega nastane kopičenje nediferenciranih epitelijskih celic, sposobnih proliferacije. To v kombinaciji z mutagenimi presnovki ustnih bakterij, ki naselijo atrofično želodčno sluznico, povzroči preobrazbo v tumorske celice *(9)*.

SPECIFIČNI IMUNSKI ODZIVI

Poleg nespecifičnega vnetnega odziva, ki prevladuje v želodčni sluznici ob okužbi s *H. pylori*, v sluznici zaznavamo tudi elemente specifičnih imunskih odzivov. Med intraepitelijskimi limfociti (IEL) prevladujejo citotoksični limcotiti T (CD8). Lamina proprija vsebuje limfocite B in T,

slednji so pretežno celice T pomagalke (CD4). Plazmatke lamine proprije izločajo pretežno IgA, ki je namenjen transportu tujih antigenov iz globine sluznice nazaj na površino in v lumen želodca *(10)*.

Študija D'Elios in sod. je pokazala visoko mRNA ekspresijo interferona (IFN), TNF, IL-12, ne pa IL-4 v antralnih biopsijah okuženih pacientov, za razliko od neokuženih kontrol *(11)*. Rezultati kažejo na izrazito prevlado odziva Th1 v želodčnem antrumu okuženih bolnikov. Poleg odziva Th1 izzove *H. pylori* izrazit sluznični odziv Th17. Amedei in sod. so pokazali izrazit odziv IL-17 in IL-21 pri bolnikih z adenokarcinomom želodca, katerih limfocite so *in vitro* stimulirali s *H. pylori (12)*. Med celicami, ki imajo posebno vlogo pri imunskemu odzivu proti *H. pylori*, je treba omeniti še dendritične celice *(13)*.

H. pylori je razvil zmožnost indukcije različnih mehanizmov imunske tolerance, ki omogočajo perzistenco okužbe. Med okužbo s *H. pylori* v povečani meri nastajajo sluznične regulatorne celice T (Treg), ki zavirajo specifične vnetne odzive limfocitov T z izločanjem inhibitornih citokinov IL-10 in TGF-β *(13, 14)*. Edinstvena značilnost epitela želodca je zmožnost, da deluje kot antigen predstavljajoče celice, pri tem pa izraža molekule MHC II in kostimulacijske molekule *(12)*. Okužba sluznice s *H. pylori* zato inducira nastanek TGF-β in zavira proliferacijo celic CD4+T, kar kaže na mehanizem vzpostavljanja specifične tolerance do *H. pylori*. To omogoča vztrajanje *H. pylori* v želodčni sluznici *(15)*.

NAPREDEK V RAZVOJU CEPIV PROTI *H. PYLORI*

Številne študije možnih cepiv proti *H. pylori* kažejo, da ni težko doseči protitelesnega imunskega odziva proti *H. pylori*, vendar pa to navadno ni dovolj za trajno preprečitev kolonizacije sluznice ob okužbi (sterilizacijska imunost), še manj pa za morebitno terapevtsko eradikacijo *H. pylori* po cepljenju *(2)*. Prizadevanja za razvoj cepiva za preprečevanje in zdravljenje okužbe s *H. pylori* trajajo od leta 1990, ko je bilo potrjeno, da je *H. pylori* najpomembnejši vzrok nastanka raka želodca. Čeprav razširjenost *H. pylori* v razvitih državah upada, bi bilo cepljenje glede na incidence želodčnega raka stroškovno učinkovito za vso populacijo. Problem pa je, da dosedaj razvita cepiva niso dovolj učinkovita, da bi od njih pričakovali nastanek dolgotrajne sterilizacijske imunosti proti *H. pylori (16)*.

Inovativno platformo za izdelavo cepiva je razvil Moss s sod. z uporabo metode za napovedovanje T-celičnih epitopov, ki bi pri določenem posamezniku najbolj učinkovito aktivirali specifični odziv limfocitov T *(17)*. Na ta način so za mišji model cepljenja pripravili polipeptidno, multiepitopsko cepivo v liposomih z dodatkom adjuvantnih CpG oligonukleotidov in toplotno labilnega enterotoksina. Aplikacija je bila intranazalna ali intramuskularna. Cepivo povzroča širok imunski odziv z intenzivno produkcijo citokinov Th1 (IFN-γ); pri živalih je cepivo povzročilo tudi sterilizacijsko imunost.

Druga obetavna platforma za cepivo proti *H. pylori* je rekombinantni virus ošpic z ekspresijo *H. pylori* nevtrofilce aktivirajočega proteina (NAP) *(18)*. Mesec dni po cepljenju so vse živali razvile močan protitelesni odziv NAP v 2–4 tednih. Z uporabo IFN-γ ELISPOT testa so potrdili tudi učinkovito celično posredovano imunost. Poskus kaže, da cepljenje z živim cepivom izzove tako nastanek protiteles kot tudi T-celičnega imunskega odziva proti *H. pylori*.

Izboljšano učinkovitost cepiv je mogoče doseči tudi z novimi formulacijami, ki vključujejo več antigenov *H. pylori*. Chen s sod. je uporabil genski konstrukt iz genov za *H. pylori* oipA, gen IL-2 in podenote B toplotno labilnega toksina *E. coli*

(19). Z intradermalno aplikacijo cepiva je dosegel zmanjšano kolonizacijo *H. pylori* v želodcu po cepljenju. Podoben pristop so uporabili pri pripravi cepiva, kjer so v salmonelni vektor vstavili *H. pylori* gene CagA, VacA in ureazni gen (20). Oralna imunizacija je zmanjšala verjetnost naselitve *H. pylori* v želodcu.

V našem poskusu izdelave platform za cepivo proti *H. pylori* smo povečali aktivacijo imunskega sistema proti *H. pylori* s konstruktom gensko modificirane *H. pylori*, v katero smo vključili gene za močnejše agoniste TLR. Tako smo zamenjali *H. pylori* flagelin z bolj imunogenim flagelinom drugih bakterij oziroma smo naredili spremembe v biosintezi LPS (acilacija), kar poveča imunogenost. Za učinkovito formulacijo cepiva smo zgradili himerni flagelin, v kateri sta oba terminalna segmenta flagelina *H. pylori* (ki je TLR5 neaktivirajoči flagelin) nadomeščena z ustreznimi segmenti iz TLR5 *E. coli* flagelina (16). Rekombinantni himerni flagelin je znatno povečal odziv IgG in IgA pri miših, cepljenih s himernim flagelinom, v primerjavi z mišmi, cepljenimi z negativno kontrolo. Titri protiteles so ostali veliki tudi osem mesecev po zadnjem cepljenju. Cepljenje s himernim flagelinom omogoči miši pomembno zaščito proti *H. pylori*.

NAŠE IZKUŠNJE PRI ŠTUDIJU SLUZNIČNEGA IMUNSKEGA ODZIVA PROTI *H. PYLORI*

V naših raziskavah smo definirali spremembe lokalnega imunskega odziva med *H. pylori* kroničnim gastritisom in gastritisom brez okužbe s *H. pylori*. Da bi opredelili vrsto lokalnega imunskega odziva, ki bi lahko napovedal izid okužbe s *H. pylori*, smo analizirali limfocite infiltracije in vnetje želodčne sluznice. Po izolaciji limfocitov v sluznici želodca smo ocenili izražanje limfocitnih molekul, ki določajo razlike v aktivaciji limfocitov med *H. pylori* gastritisom in med drugimi vrstami gastritisa (21–24). Analizirali smo ekspresijo receptorjev IL-2 in citokinov (IFN, IL-4) pri bolnikih pred in po izkoreninjenju *H. pylori*. Delež celic Th2 se pri bolnikih po izkoreninjenju HP ni bistveno spremenil. Po drugi strani se je odstotek celic, ki proizvajajo IFN, znatno zmanjšal po eradikaciji *H. pylori* (24–27).

Za analizo sprememb, ki jih *H. pylori* povzroči v citokinski sintezi, smo iz krvi, okužene s *H. pylori*, izolirali dendritične celice (DC) in jih stimulirali z različnimi sevi živih in sonificiranih bakterij *H. pylori*. Ugotovili smo, da žive bakterije HP močneje stimulirajo DC in dokazali tudi povečano izločanje vnetnih citokinov IL-8, IL-6 in TNF v primerjavi s sonificiranimi bakterijami (28). Odstranitev *H. pylori* LPS s polimiksinom B je povzročila nižje izločanje IL-8, IL-6 in IL-1b v primerjavi s stimulacijo z živim *H. pylori*. Vendar pa so inhibirane DC izražale več TLR-2 in TLR-4.

DC smo stimulirali tudi s skupino sevov *H. pylori*, izoliranih iz želodčne sluznice bolnikov, ki so po antibiotični terapiji uspešno odstranili bakterijo, in drugo skupino sevov *H. pylori*, izoliranih iz bolnikov z neuspešno eradikacijo. Sevi bolnikov z uspešno eradikacijo so pri stimulaciji DC povečali izločanje IL-8 in izražanje HLA-DR, CD86 ter TLR-2 v primerjavi s sevi bolnikov z neuspešno eradikacijo (29, 30).

LITERATURA

1. Gubina M, Logar-Car G, Ferlan-Marolt V, et al. Helicobacter pylori in Children. Evaluation of the Two-Week Triple Therapy. In: Newell DG, Ketley JM, Feldman RA, eds. Campylobacters, Helicobacters, and Related Organisms. New York: Plenum Press; 1996. p. 447–51.
2. Gubina M, Tepeš B, Vidmar G, et al. Prevalenca protiteles proti bakteriji Helicobacter pylori v Sloveniji v letu 2005. Zdrav Vestn. 2006; 22: 1–5.
3. Ihan A, Pinchuk IV, Beswick EJ. Inflammation, immunity, and vaccines for Helicobacter pylori infection. Helicobacter. 2012; 17: 16–21.
4. Gubina G, Botta GA, Logar-Car G, et al. Helicobacter pylori gastritis in children long-term follow-up after eradication. Alpe Adria Microbiol J. 1996; 5: 23–8.
5. Ihan A, Kotnik V, Tomažič J, et al. Immunological response to Helicobacter pylori. Alpe Adria Microbiol J. 1996; 5: 29–33.
6. Smith SM, Moran AP, Duggan SP, et al. Tribbles 3: A novel regulator of TLR2-mediated signaling in response to Helicobacter pylori lipopolysaccharide. J Immunol. 2011; 186: 2462–71.
7. Kumar PS, Brandt S, Madassery J, et al. Induction of TLR-2 and TLR-5 expression by Helicobacter pylori switches cagPAI-dependent signalling leading to the secretion of IL-8 and TNF-alpha. PLoS ONE. 2011; 6: e19614.
8. Zeng HM, Pan KF, Zhang Y, et al. Genetic variants of toll-like receptor 2 and 5, Helicobacter pylori infection, and risk of gastric cancer and its precursors in a chinese population. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2011; 20: 2594–602.
9. Ferrand J, Lehours P, Schmid-Alliana A, et al. Helicobacter pylori infection of gastrointestinal epithelial cells in vitro induces mesenchymal stem cell migration through an NF-κB-dependent pathway. PLoS ONE. 2011; 6: e29007.
10. Bimczok D, Grams JM, Stahl RD, et al. Stromal regulation of human gastric dendritic cells restricts the Th1 response to Helicobacter pylori. Gastroenterology. 2011: 141; 929–38.
11. D'Elios MM, Manghetti M, De Carli M, et al. T helper 1 effector cells specific for Helicobacter pylori in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. J Immunol. 1997; 158: 962–7.
12. Amedei A, Munari F, Della CD, et al. Helicobacter pylori secreted peptidyl prolyl cis, trans-isomerase drives Th17 inflammation in gastric adenocarcinoma. Intern Emerg Med. 2014; 9: 303–9.
13. Zhuang Y, Shi Y, Liu XF, et al. Helicobacter pylori-infected macrophages induce Th17 cell differentiation. Immunobiology. 2011; 216: 200–7.
14. Beswick EJ, Pinchuk IV, Earley RB, et al. Role of gastric epithelial cell-derived transforming growth factor beta in reduced CD4+ T cell proliferation and development of regulatory T cells during Helicobacter pylori infection. Infect Immun. 2011; 78: 2737–45.
15. Oertli M, Sundquist M, Hitzler I, et al. DC-derived IL-18 drives Treg differentiation, murine Helicobacter pylori-specific immune tolerance, and asthma protection. J Clin Invest. 2012; 122: 1082–96.
16. Mori J, Vranac T, Smrekar T, et al. Chimeric flagellin as the self-adjuvanting antigen for the activation of immune response against Helicobacter pylori. Vaccine. 2012; 30: 5856–63.
17. Moss SF, Moise L, Lee DS, et al. HelicoVax: Epitope-based therapeutic Helicobacter pylori vaccination in a mouse model. Vaccine. 2011; 29: 2085–91.
18. Iankov ID, Haralambieva IH, Galanis E. Immunogenicity of attenuated measles virus engineered to express Helicobacter pylori neutrophil-activating protein. Vaccine. 2011; 11: 1710–20.
19. Chen J, Lin L, Li N. Enhancement of Helicobacter pylori outer inflammatory protein DNA vaccine efficacy by co-delivery of interleukin-2 and B subunit heat-labile toxin gene encoded plasmids. Microbiol Immunol. 2012; 56: 85–92.
20. Guo L, Li X, Tang F, et al. Immunological features and the ability of inhibitory effects on enzymatic activity of an epitope vaccine composed of cholera toxin B subunit and B cell epitope from Helicobacter pylori urease A subunit. Appl Microbiol Biotechnol. 2012; 93: 1937–45.
21. Ihan A, Križman I, Ferlan-Marolt V, et al. HLA-DR expression on CD8 lymphocytes from gastric mucosa in urease-positive and urease-negative gastritis. FEMS Microbiol Immunol. 1995; 10: 295–9.
22. Ihan A, Tepež B, Kavčič I, et al. IL-2 receptor expression on gastric mucosa T lymphocytes is enhanced in duodenal ulcer patients compared to non-ulcer dispeptic patients. Hepato-Gastroenterology. 1996; 43: 51–5.
23. Tepeš B, Kavčič B, Zaletel-Kragelj L, et al. Two- to four-year histological follow-up of gastric mucosa after Helicobacter pylori eradication. J. Pathol. 1999; 188: 24–9.

24. Ihan A, Tepež B, Gubina M. Diminished interferon gamma production in gastric mucosa T lymphocytes after H. pylori eradication in duodenal ulcer patients. Hepato-Gastroenterology. 1999; 46: 145–9.
25. Kopitar AN, Stegel V, Tepeš B, et al. Specific T cell responses to Helicobacter pylori predict successful eradication therapy. J Infect. 2006; 54: 257–61.
26. Obermajer N, Magister Š, Kopitar AN, et al. Cathepsin X prevents an effective immune response against Helicobacter pylori infection. Eur J Cell Biol. 2009; 88: 461–71.
27. Kopitar AN, Skvarc M, Tepes B, et al. Helicobacter pylori susceptible/resistant to antibiotic eradication therapy differ in the maturation and activation of dendritic cells. Helicobacter. 2013; 18: 444–53.
28. Skvarc M, Stubljar D, Kopitar AN, et al. Inhibition of cathepsin X enzyme influences the immune response of THP-1 cells and dendritic cells infected with Helicobacter pylori. Radiol Oncol. 2013; 30: 258–65.
29. Štubljar D, Jeverica S, Jukič T, et al. The influence of cytokine gene polymorphisms on the risk of developing gastric cancer in patients with Helicobacter pylori infection. Radiol Oncol. 2015; 49: 256–64.
30. Skvarč M, Kofol R, Jeverica S, et al. Multi locus sequence typing (MLST) used as a tool to confirm the ability of susceptible Helicobacter pylori strains to gain resistance to clarithromycin during eradication therapy. Hepato-gastroenterology. 2014; 129: 226–31.

Gorazd Avguštin[1]

Vpliv mikrobioma na človekovo zdravje

The Effect of Microbiome on Human Health

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: mikrobiom, mikrobiota, prebavila, človek, sekvenciranje naslednjih generacij, zdravje

Mikrobiom opisuje vse gene vseh mikroorganizmov, ki naseljujejo določen ekosistem in jih s skupnim terminom imenujemo mikrobiota. Mikrobiota človeških prebavil je izredno bogata in vrstno pestra, saj v vsakem posamezniku živi okrog 10^3 vrst mikrobnih simbiontov ali več, skupno število njihovih celic pa presega skupno število gostiteljevih celic za 100-krat. Podobno je s številom mikrobnih genov, tj. mikrobiomom, katerih produkti lahko vplivajo na gostitelja na različne načine, med drugim so vpleteni v interakcije z imunskim in tudi živčnim sistemom. Danes nas najbolj zanima vloga mikrobiote in mikrobioma prebavil pri nastanku in razvoju pa tudi preprečevanju številnih bolezni, od katerih so mnoge kronične in nekatere avtoimunske. Prav tako zanimive so interakcije z osrednjim živčnim sistemom, ki neposredno vplivajo na vedenje gostitelja.

ABSTRACT

KEY WORDS: microbiome, microbiota, gut, human, next generation sequencing, health

Microbiome embraces all genes of all microorganisms that inhabit a given ecosystem and are described by a common term microbiota. The human gut microbiota is extensively reach and diverse, and each individual is colonized by 10^3 of microbial species or more with a total number of microbial cells exceeding that of the hosts cells for about 100 fold. Similar holds true as far as the total number of microbial genes, i. e. the microbiome, is concerned. Microbiome products can affect the host in various ways, among other by interacting with the immune and nervous system. We are currently most concerned with the role of the gut microbiota and microbiome in development of many diseases, many of them being of chronic and/or autoimmune. Similarly interesting are interactions with the central nervous system, affecting the behavior of the host.

[1] Prof. dr. Gorazd Avguštin, univ. dipl. biol., Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Groblje 3, 1230 Domžale; gorazd.avgustin@bf.uni-lj.si

UVOD

V zadnjem desetletju smo priča fascinantno hitremu napredku na področju preučevanja t. i. mikrobioma človeka. Po prvotni definiciji izraz mikrobiota zajame vse mikroorganizme določenega ekosistema, npr. prebavnega trakta človeka ali tudi celotnega človeka. Kolektivni nabor vseh mikrobnih genov v takšnem ekosistemu (npr. človeku) pa opisuje izraz mikrobiom. Danes mnogi raziskovalci ta izraza dojemajo kot sinonima in uporabljajo izraz mikrobiom tako za opis vseh mikrobnih genov v nekem ekosistemu kot vseh mikroorganizmov. Tako pogosto zasledimo opis vpliva »mikrobioma« na npr. človeka ali konkretneje na človekovo zdravje, kot je namenoma zapisano tudi v naslovu tega prispevka. V bistvu pa je to nesmisel, saj tudi nabora človekovih genov (torej njegovega genoma) ne krivimo za najrazličnejše vplive (pogosto negativne) na ekosistem v katerem biva – za podnebne spremembe, onesnaženje in druge degradacije okolja je kriv človek, ne pa njegov genom.

V prispevku se bomo osredotočili, v skladu s smernicami konference, na mikrobioto in mikrobiom človeškega prebavnega trakta. To področje mikrobiologije je doživelo pravi razcvet, kar med drugim dokazuje tudi strma rast števila znanstvenih člankov v najuglednejših znanstvenih revijah v obdobju zadnjih 15 let. Zasluga za to izrazito povečano aktivnost gre v veliki meri hitremu razvoju novih metod sekvenciranja nukleinskih kislin, sekvenciranju naslednjih generacij (angl. *next generation sequencing*, NGS). Te so končno omogočile izvedbo dovolj poglobljenih molekularno-bioloških raziskav, ki dejansko omogočajo spoznavanje in razumevanje kompleksnih mikrobnih ekosistemov, kamor s stališča mikroorganizmov nedvomno sodi tudi človek in njegova prebavila. Tako smo priča vrsti objav, v katerih raziskovalci vedno bolj podrobno opisujejo vrstno pestrost in strukturo mikrobiote človeškega prebavnega trakta, najprej predvsem debelega črevesa, kasneje pa tudi drugih delov (1–6). Podrobno lahko spremljamo odkritja na področju človeškega mikrobioma tudi na spletni strani ameriškega projekta *Human microbiome project* (http://hmpdacc.org/), spletnega portala *Gut microbiota for health* (http://www.gutmicrobiotaforhealth.com/) ali znanstvene revije *Microbiome* (http://www.microbiomejournal.com/) *(7, 8)*.

METODOLOGIJA PREUČEVANJA MIKROBIOTE IN MIKROBIOMA

Bogatost in kompleksnost mikrobiote prebavnega trakta zahtevata v prvi vrsti odmik od tradicionalno mikrobioloških pristopov, ki temeljijo na osamitvi mikroorganizmov in gojenju le-teh v *in vitro* laboratorijskih razmerah. Zavoljo nezmožnosti gojenja večine mikroorganizmov iz večine naravnih okolij, fenomena, ki so ga raziskovalci opisali že pred 30 leti in poimenovali »*The great plate count anomaly*«, so šele molekularne metode omogočile bolj realističen pogled sprva v sestavo naravnih mikrobiot in kasneje še njihovega mikrobioma *(9, 10)*. V ta namen uporabljamo vrsto različnih metod, ki pa vedno temeljijo na osamitvi skupne mikrobne DNA iz preučevanega vzorca in v večini primerov nato na pomnoževanju izbranih (ali tudi naključnih) odsekov osamljenih mikrobnih genomskih DNA z verižno reakcijo s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR). Mnoge od takšnih metod imajo bolj tipizacijski značaj, tj. na tak ali drugačen način opredelijo nek za preučevano mikrobioto tipičen vzorec (npr. profil fragmentov ali pomnožkov DNA, ki se ločijo bodisi po velikosti ali internem zaporedju nukleotidov). V to skupino sodijo npr. denaturacijska gradientna gelska elektroforeza (DGGE), analiza polimorfizma dolžine (terminalnih) restrikcij-

skih fragmentov (angl. *terminal restriction fragment length polymorphism*, T-RFLP) in druge variante analize razreza izbranih odsekov DNA z restrikcijskimi encimi ter še vrsta podobnih metod. Praviloma ne omogočajo podrobnega vpogleda v strukturo preučevane mikrobiote ali identifikacije vsaj ključnih predstavnikov le-te, niti kvantifikacije posameznih mikrobnih skupin. Kljub temu so še vedno zanimive, ker zaradi enostavnosti in cenenosti omogočajo primerjavo velikega števila vzorcev in odkrivanje (s primerno zalogo sreče) sprememb v strukturi mikrobiote in tako dobro izhodišče za izbor vzorcev za nadaljnje podrobnejše analize.

Te danes izvajamo z masovnim (tudi paralelnim) sekvenciranjem izbranih odsekov skupne mikrobne DNA določenega vzorca z eno od metod NGS (454 pirosekvenciranje ter tehnologije Ilumina, Solid ali Ion torrent) *(11)*. Le izjemoma raziskovalci še vedno uporabljajo klasično sekvenciranje z dideoksi nukleotidi po Sangerju, s katerim običajno analiziramo s PCR pomnožene in v plazmidno knjižnico klonirane informativne odseke skupne mikrobne DNA. Kljub daljšim sekvencam je ta tehnologija prepočasna, predraga in nudi veliko manj informacij kot metode iz nabora NGS. S slednjimi lahko pregledujemo npr. strukturo mikrobiote s t. i. sekvenciranjem amplikonov (s PCR pomnoženih izbranih odsekov genomske DNA, najpogosteje ribosomskih genov, tj. 16S rRNA) ali pa tudi večji ali manjši (naključno zajeti) del mikrobioma – s t. i. naključnim sekvenciranjem celotnega genoma (angl. *whole-genome shotgun sequencing*). Pri tem pristopu ne moremo analizirati velikega števila vzorcev, posebne napore pa zahteva predvsem sestava metagenoma, ki zahteva dobro bioinformacijsko podporo. Tako lahko odkrijemo specifično prisotnost (ali odsotnost) določenih vrst genov (npr. za razgradnjo specifičnih substratov, odpornost na določene antibiotike itd.), kar nam ponudi nov pogled na funkcionalne prilagoditve mikrobioma na določeno okolje, stresne dejavnike itd. V kolikor želimo ugotoviti, kateri deli mikrobiote so bolj aktivni lahko izvedemo omenjeno analizo tako, da izhajamo iz skupne mikrobne mRNA, in ne DNA. Ta pristop (analiza transkriptoma oz. metatranskriptoma) je metodološko sicer zahtevnejši, predvsem zaradi kratke razpolovne dobe mRNA molekul, pa tudi zaradi vrste drugih težav, med katere sodijo npr. različne transkripcijske kinetike genov v različnih mikrobiotah oz. mikrobiomih ter slabe korelacije med količino RNA in odgovarjajočih proteinov v celicah. Ponuja pa, kot rečeno, informacije, ki lahko smiselno dopolnijo spoznanja o sestavi in delovanju mikrobioma.

V tretjo skupino metod lahko prištejemo tiste, ki nam ponudijo kvantitativno informacijo o zastopanosti posameznih zanimivih mikrobnih skupin v mikrobioti nekega ekosistema. V to skupino sodijo opremsko dokaj zahtevne metode, kot so DNA-mikromreže, pa tudi različne izvedbe kvantitativne PCR, od katerih je najbolj razširjena PCR v realnem času. Sem sodi tudi fluorescentna in situ hibridizacija (angl. *fluorescence in situ hybridization*, FISH) in njene izvedenke, npr. CARD FISH (angl. *catalyzed reporter deposition fluorescence in situ hybridization*). Slabost večine omenjenih metod je, da ne moremo odkrivati doslej še neznanih mikroorganizmov v vzorcih in da je z vedno večjim naborom opisanih in v podatkovne baze deponiranih mikrobnih sekvenc vedno težje odkriti kratke odseke DNA (oligonukleotide), ki bi zagotavljali visoko stopnjo specifičnosti in s tem zanesljivosti. Prednosti pa predstavljajo visoka stopnja avtomatizacije in s tem možnost analize velikega števila vzorcev v kratkem času pri prvih dveh in lokacijsko-prostorska informacija, ki jo lahko pridobimo ob mikroskopski analizi v sklopu metode FISH.

SESTAVA MIKROBIOTE IN MIKROBIOMA ČLOVEŠKEGA PREBAVNEGA TRAKTA

Vrstna pestrost mikrobiote, ki naseljuje prebavni trakt človeka je bistveno večja, kot so nakazovali starejši mikrobiološki pristopi, zasnovani na osamitvi in gojenju mikrobov v *in vitro* razmerah.

Povprečno število t. i. molekularnih mikrobnih vrst v prebavnem traktu človeka naj bi bilo okrog 10^3, skupno število vseh bakterijskih celic v tem ekosistemu pa naj bi za 10- do 100-krat presegalo skupno število gostiteljevih celic in naj bilo med 10^{13}–10^{14}.

V mikrobioti prebavnega trakta, predvsem debelega črevesa, ki predstavlja daleč najbogatejši segment tako po številu kot po vrstni pestrosti, popolnoma prevladujejo predstavniki le dveh bakterijskih debel (od danes prepoznanih več kot 70). To so po Gramu pozitivne bakterije iz debla *Firmicutes* (ali po G+ z nizkim deležem G+C, tudi klostridiji – širše gledano) in po Gramu negativne bakterije iz debla *Bacteroidetes* (deblo, ki evolucijsko ni sorodno s proteobakterijami, kot so npr. *Escherichia coli* ipd.).

Mikrobiota vsakega posameznika je zelo specifična na rodovnem in vrstnem nivoju in je, ko dozori, stabilna skozi odraslo dobo življenja do starosti. Specifičnost in edinstvenost mikrobiote vsakega posameznika dokazujejo mnoge študije – le redke mikrobne vrste so odkrili pri več kot polovici preiskanih ljudi.

Daleč največji delež raziskav je omejen na preučevanje mikrobiote in mikrobioma debelega črevesa. Večinoma je to pogojeno z relativno enostavnim odvzemom vzorcev. Poraja pa se vprašanje, ali se mikrobiota črevesne vsebine razlikuje od mikrobiote, ki naseljuje črevesno sluznico oziroma se skriva v debeli plasti sluzi (mukusa), ki sluznico prekriva. Nekatere študije kažejo, da temu ni tako; še več, kaže se tudi, da lahko vsaka vpliva na gostitelja na drugačen način *(12, 13)*. Pri preučevanju tankega črevesa in želodca smo soočeni s še večjimi težavami. Potreben je invazivni odvzem vzorca, pri pacientih s stomo pa se je izkazalo, da je možen vdor kisika lahko pomemben dejavnik, ki postavlja rezultate študij takšnih vzorcev pod vprašaj. To ob metodoloških ovirah postavlja pred raziskovalce tudi etična vprašanja, na katera pogosto ni lahkega odgovora.

Med bakterijami mikrobiote prebavnega trakta človeka prevladujejo predstavniki le dveh filogenetskih debel, ki predstavljajo tudi več kot 90 % vse mikrobiote. Za deblo *Firmicutes* je značilna velika filogenetska raznolikost in njeni predstavniki tvorijo večino t. i. »molekularnih« vrst v mikrobioti prebavnega trakta – bolj primerna je oznaka operacijsko-taksonomske enote (OTE). Ta raznolikost je pri deblu *Bacteroidetes* bistveno manjša, zato pa sodijo njeni predstavniki med najbolj številčne skupine (predvsem tisti iz rodov *Bacteroides* in *Prevotella*). Te bakterije so dokaj slabo poznane v primerjavi z npr. enterobakterijami, čeprav slednje le v izjemnih primerih presežejo več kot 10 % vseh metagenomskih sekvenc v vzorcu. Razlogi za slabše poznavanje bakteroidet so striktna anaerobnost, ki zahteva posebej previdno delo, ter drugačne genetske zakonitosti, kot so npr. drugačni promotorji, odsotnost Shine-Dalgarnovih sekvenc za pozicioniranje ribosomov v procesu translacije in v primeru prevotel slabo poznavanje mehanizmov, ki bi omogočili genetske manipulacije in s tem poglobljen študij *(14, 15)*. Tudi organizacija encimov za razgradnjo ključnih hranil, tj. polisaharidnih molekul, je pri bakteroidetah svojstvena in se kaže v nastanku multiproteinskih kompleksov, lociranih v zunanji membrani, geni, ki jih kodirajo, pa so organizirani v t. i. PUL-sih (angl. *polysaccharide utilization loci*) *(16, 17)*. Predstavniki obeh debel so predvsem dobri razgrajevalci strukturnih polisaharidov in

producenti kratkoverižnih maščobnih kislin, ki nastajajo v fermentacijskih procesih. Posebno pomembni so producenti maslene kisline, ki izkazuje mnoge ugodne učinke za gostitelja, od energetskih do antitumorskih.

Najbolje preučeni mikroorganizmi, ki naseljujejo človeška prebavila, pripadniki družine enterobakterij, predstavljajo kot rečeno le nekaj odstotkov mikrobiote prebavil. Poznani so predvsem zaradi svoje oportunistično-patogene narave in mnogih bolezni, ki jih povzročajo. Opravljajo tudi nekatere ugodne aktivnosti za gostitelja, najbolj poznana med njimi je sinteza nekaterih vitaminov.

Človeška prebavila naseljujejo tudi predstavniki drugega debla po Gramu pozitivnih bakterij, t. i. *Actinobacteria*. Med njimi so zelo zanimive bifidobakterije z znano probiotsko vlogo. Prav pri opisu mikrobiote in mikrobioma z modernimi molekularnimi pristopi pa so v študijah delež bifidobakterij pogosto spregledali zaradi neustrezne izbire začetnih oligonukleotidov pri koraku pomnoževanja ribosomskih genov *(18)*. Bifidobakterije imajo ravno na 5' koncu ribosomskega gena za 16S rRNA svojstveno sekvenco (zaporedje nukleotidov), na katero najbolj običajno uporabljeni začetni oligonukleotidi (t. i. univerzalni, močno evolucijsko ohranjeni) ne naležejo.

V še manjših deležih so v mikrobioti človeških prebavil prisotni tudi predstavniki nekaterih drugih mikrobnih skupin. Kljub majhnemu številu lahko nekateri igrajo pomembno vlogo v določenih specifičnih procesih, kot npr. proteobakterije iz rodu *Oxalobacter*, ki z razgradnjo oksalatov preprečujejo izločanje le-teh skozi sečila in nastanek ledvičnih kamnov *(19)*. Poleg bakterij živijo pri nekaterih ljudeh v prebavilih tudi predstavniki arhej, nekaterih gliv, praživali in seveda so tam prisotni tudi virusi, o katerih pa vsaj zaenkrat vemo bistveno manj kot o bakterijah *(20–22)*.

VLOGA MIKROBIOTE IN MIKROBIOMA

Po prvem obdobju vznesenosti nad možnostjo spoznavanja same strukture, vrstne pestrosti in bogatosti mikrobiote prebavil so se postavila vprašanja, povezana s funkcionalnim pomenom. Prvo odkritje je bilo bolj ali manj slučajno pri laboratorijskih miškah, ko so ugotovili, da miši s sterilnim prebavnim traktom (angl. *germ free*) po naselitvi mikrobiote iz normalnih miši močno poveča zamaščenost telesa *(23)*. Nato so odkrili, da imajo genetske linije suhih oz. debelih miši svojstveno mikrobioto, ki se razlikuje na nivoju debel (več firmikutov in posledično manj bakteroidet pri debelih in obratno). Nakazali so tudi možno vzročno povezavo s prenosom »debele« oz. »suhe« v mikrobiote v gnotobiotske – »germ free« miši in posledično vzpostavitvijo debelega oz. suhega fenotipa *(24)*. Opažanja so potrdili tudi pri ljudeh, nato pa se je vsul plaz podobnih raziskav, v katerih so pričeli odkrivati in opisovati povezave med mikrobioto in nekaterimi boleznimi (25–28). Sem sodijo Crohnova bolezen, razvoj inzulinske rezistence, anoreksija, sladkorna bolezen tipa II in druge *(29–34)*.

Tako so opisovali tudi povezavo med mikrobiomom prebavnega trakta in metabolnim sindromom *(35, 36)*. Opozorili so na pomembno vlogo »*Toll-like*« receptorjev (predvsem TLR5) in prirojene imunosti pri teh procesih, seveda pa ostaja marsikateri aspekt še nerazumljen ali popolnoma nepoznan, tako s stališča gostitelja kot mikrobiote. Ding in sodelavci so pokazali, da je komenzalna mikrobiota odgovorna za proinflamatorne spremembe v tankem črevesu (miši), ki vodijo v nastanek debelosti in inzulinske rezistence *(37)*. Emma Slack s sodelavci pa je opisala, kako pri miših z okvarjenim prirojenim imunskim sistemom spontano naraste titer serumskih protiteles proti komenzalni mikrobioti *(38)*. Tako naj bi pridobljeni

imunski sistem prevzel vlogo vzdrževanja mutualizma med mikrobioto in gostiteljem. Vse torej kaže, da igra komenzalna mikrobiota ključno vlogo pri mnogo večjem številu pomembnih procesov, ki potekajo pri človeku, kot smo domnevali še nedavno.

Zanimiv primer možnega vpliva mikrobiote prebavil na nastanek in razvoj bolezni je rak debelega črevesa in danke (angl. *colorectal cancer*, CRC), ki je četrta najpogostejša smrtna oblika raka na svetu in druga najpogostejša v Sloveniji. Vzrok za bolezen je v določeni meri genetske narave (v cca. 35 % primerov), pomembni pa so tudi drugi dejavniki, kot je starost, življenjski slog, debelost, alkoholizem, kajenje in prehrana. Prehrana je lahko pomemben dejavnik tudi posredno, prek vpliva na črevesno mikrobioto, ki naj bi sodeč po številnih znanstvenih objavah prav tako igrala pomembno vlogo pri razvoju te bolezni ali pa imela vsaj diagnostično vrednost *(39)*. Dosedanje raziskave kažejo, da lahko črevesne bakterije s tvorbo superoksidnih radikalov in genotoksinov ter z indukcijo celične proliferacije in prokancerogenih poti vplivajo na potek kancerogeneze. Poleg omenjenih dejavnikov je pri pacientih s CRC moč opaziti bistveno spremembo v strukturi in diverziteti črevesne mikrobiote v primerjavi z zdravimi prostovoljci. Tako opisujejo sulfat reducirajoče in dehidroksilatne bakterije kot možne dejavnike razvoja kancerogeneze, ker njihovi metaboliti, kot so acetaldehid, vodikov sulfid in sekundarne žolčne soli, povzročajo vnetja in domnevno posledično tudi nastanek tumorjev. Druge črevesne bakterije naj bi bile vpletene s tvorbo superoksidnih radikalov ali toksinov, kot jih proizvajajo enterotoksigeni člani vrste *Bacteroides fragilis (40, 41)*. Novejše študije kot možen vzrok bolezni navajajo tudi samo vnetje črevesne sluznice, ko pride zaradi spremenjene črevesne mikrobiote in posledičnega imunskega odziva do transformacije črevesnih epitelnih celic, npr. z od celic T pomagalk odvisno indukcijo celične proliferacije in s TLR posredovano indukcijo prokancerogenih poti, ki nato vodijo v razvoj CRC *(42)*. Z novejšimi študijami so v zadnjih letih uspeli prepričljivo pokazati, da je črevesna mikrobiota na sluznici v območju črevesnega raka res močno spremenjena. Tako so dokazali povečan delež fusobakterij na mestu črevesnega karcinoma v severno ameriških študijah, pa tudi firmikutov (predvsem iz rodov *Roseburia* in *Faecalibacterium*) in aktinobakterij (*Coriobacteridae*) v evropskih študijah *(42–45)*. Sears in Pardoll sta predlagala, da gre pri patogenezi CRC za tristranski odnos med mikrobioto prebavil, imunskim odzivom sluznice debelega črevesa in epitelijskimi celicami debelega črevesa (angl. *colonic epithelial cells*, CEC) *(46)*.

INTERAKCIJE MED MIKROBIOMOM PREBAVIL IN OSREDNJIM ŽIVČNIM SISTEMOM

Mikrobiota prebavil je vpletena tudi v interakcije z nekaterimi vedenjskimi motnjami. Znano je, da nekateri sevi laktobacilov ugodno vplivajo na pojav depresije pri eksperimentalnih miškah, medtem ko *Campylobacter jejuni* povzroča tesnobo *(47, 48)*. Za avtiste je značilna prav posebna sestava črevesne mikrobiote, v kateri prevladujejo klostridiji, pri avtističnih otrocih pa so pogosto odkrili bakterijo iz rodu *Suterella*, ki je pri zdravih otrocih ni bilo *(49, 50)*. V zadnjih letih so raziskovalci odkrili tudi neposredne interakcije med predstavniki mikrobiote prebavil in osrednjim živčnim sistemom, ki poteka preko 10. kranialnega živca (vagusa) *(51, 52)*. Mikrobiota in mikrobiom prebavil torej očitno sodelujeta ne le pri interakcijah z gostiteljem, ki so tesno vezane na sam prebavni ekosistem, temveč preko možganov tudi na druge organe in organske sisteme ter celotno telo.

LITERATURA

1. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. Science. 2005; 307: 1915–20
2. Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. Nature. 2007; 447: 811–8
3. Mahowald MA, Rey FE, Seedorf H, et al. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. PNAS USA. 2009; 106 (14): 5859–64.
4. Tap J, Mondot S, Levenez F, et al. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. Environ Microbiol. 2009; 11 (10): 2574–84.
5. Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature. 2010; 464: 59–65.
6. Riedel CU, Schwiertz A, Egert M. The stomach and small and large intestinal microbiomes. In: Marchesi JR, ed. The human microbiota and microbiome. Advances in molecular and celular microbiology. CAB International; 2014. p. 1–20.
7. The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature. 2012; 486: 207–14.
8. The Human Microbiome Project Consortium. A framework for human microbiome research. Nature. 2012; 486: 215–21.
9. Amann RI, Ludwig W, Schleifer K-H. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. Microbiol Rev. 1995; 59 (1): 143–69.
10. Staley JT, Konopka A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. Annu Rev Microbiol. 1985; 39: 321–46.
11. Xiao L, Qin J, Shen D, et al. Next-generation sequencing methods to investigate the human microbiome. In: Marchesi JR, ed. The human microbiota and microbiome. Advances in molecular and celular microbiology. CAB International; 2014. p. 147–70.
12. Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, et al. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. Appl Environ Microbiol. 2002; 68: 3401–7.
13. Chen WG, Liu FL, Ling ZX, et al. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. Plos One. 2012; e39743.
14. Bayley DP, Rocha ER, Smith CJ. Analysis of cepA and other *Bacteroides fragilis* genes reveals a unique promoter structure. FEMS Microbiol Lett. 2000; 193 (1): 149–54.
15. Accetto T, Avguštin G. Inability of *Prevotella bryantii* to form afunctional Shine-Dalgarno interaction reflects unique evolution of ribosomebinding sites in *Bacteroidetes*. PLoS ONE. 2011; 6 (8): e22914.
16. Martens EC, Lowe EC, Chiang H, et al. Recognition and degradation of plant cell wall polysaccharides by two human gut symbionts. PLoS Biol. 2011; 9 (12): e1001221.
17. Accetto T, Avguštin G. Polysaccharide utilization locus and CAZYme genome repertoires reveal diverse ecological adaptation of *Prevotella* species. Syst Appl Microbiol. 2015; 38 (7): 453–61.
18. Martinez I, Wallace G, Zhang C, et al. Diet-induced metabolic improvements in a hamster model of hypercholesterolemia are strongly linked to alterations of the gut microbiota. Appl Environ Microbiol. 2009; 75 (12): 4175–84.
19. Li XS, Ellis ML, Knight J. *Oxalobacter formigenes* colonization and oxalate dynamics in a mouse model. Appl Environ Microbiol. 2015; 81 (15): 5048–54.
20. Bang C, Schmitz RA. Archaea associated with human surfaces: not to be underestimated. FEMS Microbiol Rev. 2015; 39 (5): 631–48.
21. Rizzetto L, De Filippo C, Cavalieri D. Richness and diversity of mammalian fungal communities shape innate and adaptive immunity in health and disease. Europ J Immunol. 2014; 44 (11): 3166–81.
22. Ogilvie LA, Jones BV. The human gut virome: a multifaceted majority. Front. Microbiol. 2015; 6: 918.
23. Bäckhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. PNAS USA. 2004; 101: 15718–23.
24. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, et al. Obesity alters gut microbial ecology. PNAS USA. 2005; 102 (31): 11070–5.
25. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. Cell. 2006; 124 (4): 837–48.

26. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. An obesity associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature. 2006; 444 (7122): 1027–31.
27. Nadal I, Santacruz A, Marcos A, et al. Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. Int J Obesity. 2009; 33 (7): 758–67.
28. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. Nature. 2009; 457 (7228): 480–4.
29. Dicksved J, Halfvarson J, Rosenquist M, et al. Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. ISME J. 2008; 2: 716–27.
30. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. Diabetes. 2007; 56: 1761–72.
31. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic diet – induced obesity and diabetes in mice. Diabetes. 2008; 58 (7): 1470–81.
32. Armougom F, Henry M, Vialettes B, et al. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and Methanogens in anorexic patients. Plos One. 2009; 4 (9): e7125.
33. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FWJ, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. Plos One. 2010; 5 (2): e9085.
34. Wu X, Ma C, Han L, et al. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. Curr Microbiol. 2010; 61 (1): 69–78.
35. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, et al. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. Science. 2010; 328 (5975): 228–31.
36. Zhang C, Zhang M, Wang S, et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. ISME J. 2010; 4 (2): 232–41.
37. Ding S, Chi MM, Scull BP, et al. High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. Plos One. 2010; 5 (8): e12191.
38. Slack E, Hapfelmeier S, Stecher B, et al. Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. Science. 2009; 325 (5940): 617–20.
39. Wang T, Cai G, Qiu Y, et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. ISME J. 2011; 6 (2): 1–10.
40. Wexler HM. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. Clin Microbiol Rev. 2007; 20 (4): 593–621.
41. Sears CL. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiotes. Clin Microbiol Rev. 2009; 22 (2): 349–69.
42. Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, et al. Towards the human colorectal cancer microbiome. Plos One. 2011; 6 (5): e20447.
43. Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. Genome Res. 2012; 22 (2): 292–8.
44. Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, et al. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. Genome Res. 2012; 22 (2): 299–306.
45. McCoy AN, Araújo-Pérez F, Azcárate-Peril A, et al. *Fusobacterium* is associated with colorectal adenomas. Plos One. 2013; 8 (1): e53653.
46. Sears C, Pardoll D. Perspective: alpha-bugs, their microbial partners, and the link to colon cancer. J Infect Dis. 2011; 203 (3): 1–6.
47. Gareau MG, Jury J, MacQueen G, et al. Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation. Gut. 2007; 56 (11): 1522–8.
48. Goehler LE, Park SM, Opitz N, et al. *Campylobacter jejuni* infection increases anxiety-like behavior in the holeboard: Possible anatomical substrates for viscerosensory modulation of exploratory behavior. Brain Behav Immun. 2008; 22 (3): 354–66.
49. Finegold SM, Molitoris D, Song Y, et al. Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. Clin Infec Dis. 2002; 35 (1): 6–16.
50. Williams BL, Hornig M, Parekh T, et al. Application of novel PCR-based methods for detection, quantitation, and phylogenetic characterization of *Sutterella* species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances. MBio. 2012; 3 (1): e00261–e00211.
51. Foster JA, McVey Neufeld KA. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. Trends Neurosci. 2013; 36 (5): 305–12.
52. Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. Nature Rev Neurosci. 2012; 13 (10): 701–12.

Enver Melkić[1*], Samo Zver[2]

Prebavila kot vir okužbe pri imunsko kompromitiranih hematoloških bolnikih

Gastrointestinal Tract as a Source of Infection in Immunocompromised Patients

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: prebavila, sluznica, sistemsko zdravljenje, okužbe, nevtropenija, krvne bolezni

Vročina je glavni in pogosto edini znak resne okužbe pri bolnikih, katerih imunski sistem je oslabljen zaradi osnovne maligne bolezni in načina njenega zdravljenja. Čeprav je pojav vročine lahko zavrt zaradi imunosupresivne terapije, ki je pogosto sestavni del zdravljenja, pa večina bolnikov vseeno razvije vročino ob akutni okužbi. Tveganje za akutno okužbo in številne zaplete ob tem je v največji meri odvisno od stopnje in trajanja nevtropenije. Bolniki, pri katerih se nevtropenija razvije po kemoterapiji ali po pripravi na presaditev, so zaradi učinka same kemoterapije na sluznico črevesja in dihal še dodatno izpostavljeni vdoru mikroorganizmov v sistemski obtok. Prebavila so velik rezervoar mikroflore in predstavljajo pomembno vstopno mesto številnih mikroorganizmov v sistemski obtok. Zaradi sistemskega zdravljenja pride ob nastali nevtropeniji do poškodbe črevesne sluznice. Medtem ko praktično vsak mikroorganizem postane invaziven, če je obramba bolnika močno oslabljena, pa bakterije (predvsem po Gramu pozitivne, pa tudi po Gramu negativne) predstavljajo najbolj resno grožnjo za bolnika. Pri bolniku s hudo nevtropenijo so prebavila izvor okvirno 40 % vseh klinično in mikrobiološko dokazanih okužb. Nevtropenični bolniki, ki so deležni citotoksičnega zdravljenja ali presaditve krvotvornih matičnih celic, so dodatno dovzetni še za virusne okužbe kot tudi za okužbe z glivami in paraziti.

ABSTRACT

KEY WORDS: gastrointestinal tract, mucosa, systemic treatment, infections, neutropenia, hematologic diseases

Fever is the main and often the only sign of serious infections in patients whose immune system is weakened due to the underlying malignant disease and its method of treatment. Although the onset of fever may be suppressed due to immunosuppressive therapy, which is often an integral part of the treatment, most patients still develop a fever during acute infection. The risk of acute infection and number of complications are largely dependent on the degree and duration of neutropenia. Patients who develop

[1*] Enver Melkić, dr. med., Klinični oddelek za Hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana; enver.melkic@kclj.si

[2] Izr. prof. dr. Samo Zver, dr. med., Klinični oddelek za Hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana

neutropenia after chemotherapy or »prep« therapy prior to transplantation are further exposed to the invasion of microorganisms into the systemic circulation due to the effect of chemotherapy alone on the intestinal mucosa and respiratory system. Gastrointestinal tract is a major reservoir of flora and represents an important point of entry of many microorganisms into the systemic circulation as a result of damage to the intestinal mucosa due to systemic treatment and the occurrence of neutropenia. While virtually any microorganism can become invasive if the immune system of the patient is greatly impaired, the bacteria (particularly Gram-positive as well as Gram-negative) represent the most serious threat to the patient. In patients with neutropenia, gastrointestinal origin is a source of approximately 40% of all clinically and microbiologically documented infections. Neutropenic patients undergoing cytotoxic therapy or bone marrow transplantation are additionally also susceptible to viral infections, particularly respiratory viruses and herpesviruses, fungi, and parasites.

UVOD

Stopnja in trajanje nevtropenije pri hematoloških bolnikih je eden glavnih dejavnikov, ki prispeva k oslabitvi njegovega imunskega statusa. Bolniki, pri katerih nevtropenija traja 10 dni ali več, imajo dodatno povečano tveganje, ne le za akutne bakterijske okužbe, ampak tudi za dodatne oportunistične okužbe z drugimi bakterijami, glivami in virusi. Bolniki, ki prejemajo intenzivno kemoterapijo, ali tisti s funkcijsko oslabljenim delovanjem kostnega mozga, so dovzetni za resne okužbe. Po intenzivni citotoksični kemoterapiji ali pripravljalni terapiji pred presaditvijo krvotvornih matičnih celic (PKMC), spremembi v celični imunosti in hipogamaglobulinemiji se prag za okužbe dodatno zniža. Poleg tega predstavljajo dodatno tveganje pred okužbo mehanične poškodbe anatomskih ovir – medceličnih stikov epitelnih celic gastrointenstinalnega trakta (GIT) – pri mukozitisu ustne sluznice in celotnega GIT, kar predstavlja lokalno žarišče, kjer je omogočen lažji vstop mikroorganizmov v sistemski krvni obtok.

Tveganje za okužbo pri bolnikih z akutno levkemijo je povezano z ravnjo nevtrofilcev in limfocitov v krvnem obtoku. Za vse okužbe, lokalne ali sistemske, je bolj verjetno, da se bodo zgodile, ko je absolutno število nevtrofilcev in limfocitov nizko. Nadalje, nižja kot je raven teh celic, večja je verjetnost, da bo prišlo do okužbe.

Glede na dostopne vire najdemo različne podatke o tem, v kolikšni meri so prebavila vir okužbe pri hematoloških bolnikih. V raziskavi Biswal in sod., ki je spremljala pojavnost okužb pri 120 hematoloških bolnikih z akutno levkemijo, prebavila v celoti predstavljajo najbolj pogost vir okužb, in sicer 38,4 %. Sledijo dihala z 32,6 % vseh okužb, okužbe sečil s 6,4 % ter kože in mehkih tkiv skupaj s 3,5 % *(2)*.

DEJAVNIKI TVEGANJA ZA OKUŽBO PRI IMUNSKO KOMPROMITIRANEM BOLNIKU Z RAKAVO KRVNO BOLEZNIJO

Tveganje za okužbo pri bolnikih z oslabljenim imunskim sistemom je povečano v vseh primerih, ko je kateri koli izmed glavnih obrambnih sistemov oslabljen. Obramba gostitelja je lahko oslabljena zaradi njegove osnovne bolezni, načina zdravljenja (kemoterapije) in iatrogenih posegov v času hospitalizacije. Nevtropenija je že od leta 1966 opredeljena kot vodilni dejavnik tveganja za okužbo pri imunsko kompromitiranem bolniku in še vedno predstavlja največje tveganje za okužbo pri bolnikih s krvno boleznijo po zdravljenju s kemote-

Tabela 1. Vir okužbe pri bolnikih s febrilno nevtropenijo; N = 112, število febrilnih stanj = 172 *(2)*.

Tip in mesto okužbe	Okužbe *p*	%
okužbe dihalne poti	56	32,6
mukozitis/gingivitis/razjede ustne sluznice	35	20,4
okužbe prebavil	31	18,0
okužbe genitourinarnega trakta	11	6,4
okužbe spodnjih dihal	10	5,9
otitis/mastoiditis	7	4,1
mešane okužbe	7	4,1
okužbe kože in mehkih tkiv	6	3,5
celulitis	3	1,7
herpes zoster	3	1,7
tuberkuloza	2	1,6
okužba sinusov	1	0,6
skupno število vseh okužb	172	100
okužbe večih mest	10	

rapijo *(3)*. Sistemsko zdravljenje s citostatiki, ki jih uporabljamo pri zdravljenju v hematologiji, s svojim specifičnim delovanjem povzroči nastanek nevtropenije. Prav tako pa s svojim neželenim učinkom na hitro deleče se celice povzroča okvaro sluznic ustne votline, požiralnika, želodca in celotnega črevesja. Na ta način nastajajo poškodbe sluznic prebavil in lokalna vnetja v poteku celotne prebavne cevi, kar pri nevtropeničnem bolniku predstavlja vstopno mesto za vdor mikroorganizmov v sistemski krvni obtok.

Osnovna krvna bolezen

Določene rakave krvne bolezni so same po sebi že brez zdravljenja povezane z okrnjenim imunskim delovanjem. Primer so bolniki s kronično limfocitno levkemijo, ki imajo pogosto znižano raven globulinov gama. Slednje vodi v povečano verjetnost nastanka bakterijskih okužb, še posebno s *Streptococcus pneumonie (1)*. Bolniki z diseminiranim plazmocitomom imajo prav tako pogosto funkcijsko in kvantitativno hipogamaglobulinemijo. Pri takšnih bolnikih pogosto opažamo tako imenovani »bifazni« potek okužb *(2)*. Okužbe, katerih povzročitelja sta *S. pneumoniae* in *Haemophilus influenzae*, se pogosteje pojavljajo v zgodnjem obdobju bolezni, medtem ko so bolniki po kemoterapevtskem zdravljenju in v času hude nevtropenije bolj dovzetni za okužbe povzročene s *Staphylococcus auerus* in po Gramu negativnimi patogenimi bakterijami. Bolniki z dlakastocelično levkemijo so nagnjeni k oportunističnim okužbam, ki jih povzročajo netuberkulozni tipi mikobakterij. Bolniki z nezdravljenim ali slabo vodenim Hodgkinovim limfomom so prav tako nagnjeni k okužbam, ki so posledica pomanjkljive T-celične imunosti.

Sistemsko zdravljenje s citostatiki (kemoterapija) in njihov vpliv na sluznico prebavil

Neželeni učinki citostatskega zdravljenja, ki se odražajo na prebavilih, so slabost in bruhanje, izguba apetita, sprememba okusa, stomatitis, ezofagitis, driska in zaprtje. Okvara ustne sluznice (stomatitis), se pojavi že prve dni po zdravljenju s citostatiki. Sprva se kaže z rdečino ustne sluznice,

pozneje pa nastanejo razjede, ki se lahko lokalno okužijo. Pri hudo nevtropeničnem bolniku so takšne razjede izvor sistemske okužbe z bakterijami ali glivami. Nekateri citostatiki, ki jih uporabljamo pri zdravljenju v hematologiji, kot so citarabin ali visoki odmerki metotreksata, povzročijo okvare sluznice v ustih, predelu požiralnika, želodca in celotnega črevesja. Sistemsko zdravljenje s citostatiki s svojim neželenim delovanjem na prebavila pri nevtropeničnem bolniku dodatno poveča verjetnost za razvoj okužbe na dva načina: s spremembo funkcije in integritete sluznice ter z zmanjšanjem števila celic, ki so odgovorne za obrambo pred mikroorganizmi *(6)*.

Sprememba funkcije in integritete sluznice

Sistemsko zdravljenje s citostatiki oslabi delovanje ciliarnega sistema v dihalih in peristaltiko prebavnega trakta ter poškoduje sluznico, ki pri zdravem preprečuje vdor mikroflore v tkiva in krvni obtok. Posledica toksičnega delovanja sistemskih zdravil na resice tankega črevesa se kaže z zmanjšano absorbcijsko površino in drisko kot posledico neuravnotežene sekrecije in absorbcije črevesne sluznice. Ob obnavljanju epitela črevesne sluznice pogosto pride do hiperplazije epitela kript, kjer nezrele, funkcionalno manj vredne celice kript pripotujejo na površino resic tankega črevesa. Zaradi njihove slabše absorbcijske sposobnosti sta sekrecija in absorbcija ponovno v nesorazmerju. Tudi okvare epitela širokega črevesa funkcionalno pomenijo zmanjšano absorbcijsko površino za absorbcijo elektrolitov in vode.

Zmanjšanje števila celic, ki so odgovorne za obrambo pred mikroorganizmi

Kemoterapija zmanjšuje število celic, odgovornih za boj proti mikrobom. V kombinaciji s kortikosteroidi dodatno oslabi celično imunost. Takšen učinek kemoterapije lahko prispeva k aktivaciji latentnih okužb z znotrajceličnimi patogeni, kot so *Pneumocystis jirovecii, Mycobacterium tuberculosis,* herpesvirusi ali dodatno pripomore k možnosti oportunističnih okužb z *Legionella pneumophila, Candida* spp.

Vse omenjene morfološke in funkcijske spremembe črevesne sluznice, vključno s posledično spremembo pH črevesne vsebine, vplivajo tudi na črevesno mikrofloro. Spremenjena črevesna flora je eden od pomembnih dejavnikov razvoja drisk kot neželenega učinka sistemskega zdravljenja malignih krvnih bolezni, dodaten ogrožajoč dejavnik pa je lahko posledična invazivna okužba *(7)*.

Nevtropenija

Nevtrofilni granulociti predstavljajo najpomembnejšo obrambno komponento imunskega sistema proti bakterijam in glivam. Vsaka sprememba v njihovem številu ali funkciji pri imunsko kompromitiranem bolniku z levkemijo bo posledično vodila do večje verjetnosti za okužbo. Pri stopnji nevtropenije pod $0{,}5 \times 10^9$ se izredno poveča tveganje za akutno okužbo. Pri nevtropeniji, manjši od $0{,}1 \times 10^9$, je tveganje za bakterijsko ali glivično okužbo še precej večje. Po drugi strani je pri absolutnem številu nevtrofilcev, večjem od $1{,}0 \times 10^9$, stopnja tveganja za okužbo precej manjša. V praksi vsakega bolnika z vročino in nevtropenijo, manjšo od $0{,}5 \times 10^9$, obravnavamo kot potencialno okuženega, pri čemer je indicirano širokospektralno antibiotično zdravljenje. Čas trajanja nevtropenije je prav tako izredno pomemben dejavnik tveganja za okužbo. Dlje ko je nevtropenija prisotna, večje je tveganje za okužbo (tabela 2). Nevtropenija, manjša od $0{,}5 \times 10^9$, ki traja več kot 10 dni, predstavlja visoko stopnjo tveganja za okužbo kljub profilaktični antibiotični zaščiti. Bolniki, pri katerih je nevtropenija podobne stopnje prisotna med 7 do 10 dni, spadajo v skupino z manjšim tve-

ganjem za resno okužbo, kot tisti, pri katerih je nevtropenija prisotna več kot 10 dni. Nižjo stopnjo tveganja za okužbo imajo tisti bolniki, pri katerih pride do hitrejše regeneracije kostnega mozga po kemoterapevtskem zdravljenju in postopnega naraščanja nevtrofilnih granulocitov. Pri bolnikih, ki jih uvrščamo v skupino z nižjim tveganjem glede na trajanje nevtropenije, je verjetnost ponovne epizode vročine nad 38 °C manj kot 1 %, medtem ko pri bolnikih, ki spadajo v bolj tvegano skupino, ta možnost predstavlja okoli 38 % *(1)*. Nadalje je pri 95 % bolnikov, pri katerih je nevtropenija izražena manj kot en teden, uvedba začetne empirične antibiotične zaščite uspešna, medtem ko je pri dveh tretjinah tistih, pri katerih je nevtropenija prisotna več kot dva tedna, potrebna zamenjava antibiotika.

Tabela 2. Delež okužb pri bolnikih glede na stopnjo nevtropenije in čas njenega trajanja.

	Delež okužb (%) glede na trajanje nevtropenije (tedni)							
	1	2	3	4	6	10	12	14
Stopnja nevtropenije								
$< 1{,}0 \times 10^9$	10	30	45	50	65	70	85	100
$< 0{,}1 \times 10^9$	28	50	72	85	100			

Kortikosteroidi

Zdravljenje z velikimi odmerki kortikosteroidov pomembno vpliva na porazporeditev in funkcijo nevtrofilcev, monocitov in limfocitov. Kortikosteroide pri zdravljenju malignih krvnih bolezni pogosto uporabljamo v kombinaciji z drugimi imunosupresivi. Zdravljenje s kortikosteroidi pogosto prepreči pojav vročine in zabriše znake lokalne okužbe prebavil, kot je peritonitis. Kortikosteroidi onemogočijo nevtrofilne granulocite pri učinkovitem uničevanju hif plesni *Aspergillus fumigatus* in posredno omogočijo njihovo rast *(8)*. Bolniki, ki prejemajo velike odmerke kortikosteroidov, so podvrženi pogostim bakterijskim okužbam in okužbam s *P. jirovecii, Nocardia* spp., mikobakterijam ter oportunističnim glivam in virusom.

V tabeli 3 so prikazani najbolj pomembni dejavnike tveganja za okužbo pri hematološkem, imunsko kompromitira-

Tabela 3. Dejavniki tveganja za okužbo pri bolniku z akutno levkemijo (n = 112) *(2)*.

Dejavnik tveganja		okužba	p
nevtropenija	da	107 (95,5 %)	< 0,05
	ne	5 (4,5 %)	
poškodba sluznične bariere	da	90 (80,4 %)	< 0,05
	ne	22 (19,6 %)	
biopsija in punkcija kostnega mozga	da	100 (89,3 %)	< 0,05
	ne	12 (10,7 %)	
transfuzije krvi	da	63 (56,3 %)	< 0,05
	ne	49 (43,8 %)	
prisotnost intravenskih katetrov	da	76 (67,9 %)	< 0,05
	ne	36 (32,1 %)	
uporaba kortikosteroidov	da	vsi bolniki	< 0,05
	ne	...	

nem bolniku po zaključenem indukcijskem zdravljenju akutne levkemije: nevtropenija (95,5 %), prisotnost centralnih venskih katetrov (67,9 %), poškodba sluznice (80,4 %), predhodna punkcija in biopsija kostnega mozga (89,3 %) in transfuzije krvi (56,3 %) *(2)*.

PREBAVILA KOT VIR OKUŽBE

GIT ima pomembno vlogo v patogenezi okužb pri hematološkem bolniku z nevtropenijo. Prebavila so velik rezervoar mikroflore in predstavljajo pomembno vstopno mesto številnih mikroorganizmov v sistemski krvni obtok, ko zaradi sistemskega zdravljenja s citostatiki pride do poškodbe črevesne sluznice in nastanka nevtropenije. Pri bolniku z nevtropenijo so prebavila odgovorna za okvirno 40 % vseh klinično in mikrobiološko dokazanih okužb *(2)*.

Nevtropenija ob zmanjšanem številu in poškodbi epitelijskih celic zaradi toksičnega učinkovanja kemoterapije pogosto vodi do zapletov, kot je npr. nevtropenični enterokolitis. Bakteremije, ki so posledica vdora bakterij, ki so sicer sestavni del črevesne flore, kot so »koliformni«, *Pseudomonas aeruginosa*, streptokoki ali *Candida* spp., se zgodijo zaradi toksičnega učinkovanja kemoterapije (npr. citarabin pri zdravljenju akutnih levkemij) na sluznico črevesja *(1)*. Pri kronični obliki presadka proti gostitelju (GVHD) in pri alogeniční PKMC je prav tako okvarjena integriteta črevesne sluznice. Zaradi dolgotrajne nevtropenije in zmanjšane obrambe so pri takšnih bolnikih pogoste glivične okužbe sluznic prebavil. Ezofagitis in enterokolitis sta najbolj pogosta zapleta pri hematološkem bolniku z nevtropenijo. Ezofagitis je še posebno pogost pri bolnikih, ki dalj časa prejemajo profilaktično zaščito z antibiotiki. Povzročijo ga lahko virusi, bakterije ali glive, med njimi še posebno pogosto virus herpesa simpleksa tipa 1 in 2 ter *Candida* spp. Bolniki pogosto tožijo zaradi pekoče bolečine za prsnico in motenj požiranja (odinofagije). Za izolacijo povzročitelja je treba opraviti bris ezofagoskopijo/gastroskopijo sluznice in zdraviti glede na mikrobiološki izvid. Simptomi in znaki enterokolitisa so: slabost, bruhanje, občutek napihnjenosti, abdominalni krči, bolečina, zaprtost ali driske (pogosto zelo hude, ko gre za vnetje črevesne sluznice v povezavi z antibiotičnim zdravljenjem).

Vnetje slepiča z nekrozantnim enterokolitisom v področju cekuma je življenjsko ogrožajoč zaplet pri bolnikih z levkemijo, ki so dalj časa nevtropenični in so zaradi tega na dolgotrajni širokospektralni antibiotični zaščiti. Klinični znaki vnetja slepiča vključujejo vročino, bolečino v trebuhu (v začetku je ta omejena na spodnji desni kvadrant trebuha, nato se z razširitvijo okužbe prenese na celoten trebuh), drisko in slabšanje splošnega bolnikovega stanja. Krvavitve in perforacija votlih organov sta poglavitna zapleta vnetega slepiča. Nekrotizirajoči fasciitis je prav tako pogost zaplet pri okužbah s klostridiji, natančneje s *Clostridium septicum*, in pogosto poteka brez pojava vročine.

UKREPI PRI IMUNSKO KOMPROMITIRANEM BOLNIKU Z OKUŽBO PREBAVIL

Pri pojavu driske ali vročine je v prvi vrsti potrebna natančna anamneza in klinični pregled bolnika. Pomembni so podatki o številu iztrebljanj, konsistenci blata, morebitni primesi sluzi in krvi v blatu, pa tudi spremljajoči znaki bolezni, kot so slabost/bruhanje, vročina, mrzlica, bolečine ali krči v abdomnu. Natančno moramo preveriti, katera zdravila bolnik prejema in čas zdravljenja. Naslednji korak je natančen klinični pregled z usmerjenim iskanjem znakov akutnega dogajanja v abdomnu, pregled kože in vidnih sluznic, ocena hidriranosti bolnika in usmerjeno

iskanje znakov okužbe. Med nujne laboratorijske preiskave pri sumu na okužbo prebavil sodijo:

- odvzem krvi za hemokulture,
- krvna slika, vključujoč diferencialno belo krvno sliko,
- elektroliti, parametri vnetja (CRP),
- dušični retenti,
- transaminaze,
- amilaza, lipaza in
- bilirubin.

Na najbolj verjetne povzročitelje okužbe lahko sklepamo na podlagi verjetnega vstopnega mesta, stopnje ter trajanja imunosupresije, vrsto imunske pomanjkljivosti, načina predhodnega zdravljenja in same lokacije okužbe, to je v bolnišnici ali doma. V veliko pomoč so lahko nadzorne kužnine prebavil, ki jih redno jemljemo imunsko pomanjkljivim nevtropeničnim bolnikom. Med preiskave z namenom iskanja povzročitelja driske sodijo odvzemi vzorca blata za kultivacijo, kjer v primarnem nivoju testiranja preverimo rast bakterij (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campilobacter* spp. in *Yersinia* spp.). Prav tako je treba iz vzorca blata preveriti prisotnost toksina *Clostridium difficile* in različnih vrst gliv. Standardni panel za preverjanje virusnih povzročiteljev vključuje molekularne teste za rotaviruse, adenoviruse 40/41, noroviruse in astroviruse. Kljub temu, da je *E. coli* sestavni del normalne črevesne flore, ne smemo pozabiti na seve *Escherichia coli*, ki povzročajo drisko (verotoksigene, enterotoksigene, enteroinvazivne, enteroagregativne in enteropatogene *E. coli*) in jih določamo s kultivacijo ali molekularnimi testi. Med slikovne preiskave pri iskanju vzrokov slabosti in bruhanja največkrat opravimo endoskopske preiskave, kot sta gastroskopija in kolonoskopija. Z gastroskopijo pri bolniku z nevtropenijo lahko najdemo soor v ustni votlini, glivični ezofagitis ali gastritis, ulceracije in nekroze. Med druge slikovne preiskave sodijo še UZ trebuha in CT slikanje. Z omenjenimi preiskavami lahko dokažemo zadebeljeno sluznico črevesja kot znak vnetnega dogajanja. CT slikanje je diagnostično v 80 % primerov *(5)*. V takšnih primerih nam CT najpogosteje pokaže vnetne spremembe črevesne sluznice desnega spodnjega kvadranta, ki je navadno omejen na cekum. Vnetje slepiča je najbolj pogosta najdba pri bolnikih z nevtropenijo in prebavnimi težavami zaradi okužb z *C. difficile*, GVHD prebavil, kolitisom, povzročenim z virusom citomegalije in ishemijo črevesa. Okužbe s *C. difficile* in druge okužbe, ki izvirajo iz prebavil, so pogoste pri bolnikih z dolgotrajno hospitalizacijo in uporabo širokospektralnih antibiotikov. Med težjimi poteki okužb lahko najdemo znake paralitičnega ileusa, toksičnega megakolona in perforacije črevesa.

LITERATURA

1. Glauser MP, Calandra T. Infections in Patients with Haematologic Malignancies. In: Glauser MP, Pizzo PA, eds. Management of Infections in Immunocompromised Patients. London: WB Sanders; 2000. p. 141–89.
2. Biswal S, Godnaik C. Incidence and management of infections in patients with acute leukemia following chemotherapy in general wards [internet]. Ecancermedicalscience 2013. [citirano 2015 Oct 6]. Dosegljivo na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3634721/
3. Rolston KV, Wingard JR. Managing Infections in Patients With Hematologic Malignancies [internet]. Medscape; 2015 [citirano 2015 Oct 6]. Dosegljivo na: http://www.medscape.org/viewarticle/463953
4. Bodey GP. Management of Infections in Immunocompromised Patients. Clin Infect Dis. 2005; 40 Suppl 4: S239.
5. Aquino VM, Tkaezewski Y, Buchanan G. Early discharge of low-risk febrile neutropenic children and adolescents with cancer. Clin Infect Dis. 1997; 25: 74–8.
6. Pajk B. Neželeni učinki sistemskega zdravljenja raka. Onkologija. 2007; 2: 131–39.
7. Škrbinc B. Driska in zaprtje. Onkologija. 2009; 1: 47–50.
8. Roilides E, Uhlig K Venzon D, et al. Prevention of corticosteroid-induced suppression of human polymorphonuclear leukocyte-induced damage of Aspergillus fumigatus hyphae by granulocyte colony-stimulating factor and gammainterferon. Infect Immun. 1993; 61: 4870–7.

Samo Plut[1*], Mateja Pirš[2]

Sindrom bakterijskega preraščanja tankega črevesa

Small Intestinal Bacterial Overgrowth Syndrome

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: bakterijsko preraščanje tankega črevesa, diagnostika, zdravljenje

Bakterijsko preraščanje tankega črevesa je pridobljeno stanje prekomerne razrasti bakterij v tankem črevesu. Je posledica oslabitve oz. disfunkcije zaščitnih mehanizmov: želodčne kislinske pregrade, odsotnosti ali motene peristaltike tankega črevesja, anatomskih sprememb ali motenj imunskega sistema. Po definiciji gre za bakterijsko preraščanje tankega črevesa, če je celokupno število mikroorganizmov > 10^5 kolonije formirajočih enot na mililiter aspirata jejunuma. Klinična slika je pestra in vključuje napihnjenost, napenjanje, bolečine v trebuhu in drisko. V diagnostiki za zlati standard velja kultivacija jejunalnega aspirata, uporabni pa so tudi neinvazivni dihalni testi. Bakterijsko preraščanje tankega črevesa zdravimo vzročno, z opredelitvijo in odstranitvijo vzroka, ter z antibiotiki.

ABSTRACT

KEY WORDS: small intestinal bacterial overgrowth, diagnostics, treatment

Small intestinal bacterial overgrowth is an acquired state of excessive growth of bacteria in the small bowel. It results from a failure of physiological protective mechanisms: gastric acid barrier, small intestinal motility, anatomic alterations or impairment of immune system. The current definition of small intestinal bacterial overgrowth is characterized by > 10^5 of colony forming units per milliliter of jejunal aspirate. Clinical manifestation includes bloating, flatulence, abdominal pain and diarrhea. The golden standard of diagnostics is jejunal aspirate culture; noninvasive breath tests can also be used. Small intestinal bacterial overgrowth is treated by identifying and correcting the underlying cause and with antibiotics.

[1*] Asist. Samo Plut, dr. med., Klinični oddelek za gastroenterologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana; samo.plut@kclj.si

[2] Asist. dr. Mateja Pirš, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; mateja.pirs@mf.uni-lj.si

UVOD IN DEFINICIJA

Ob rojstvu je otrokov prebavni trakt sterilen. V naslednjih nekaj urah ga postopoma kolonizirajo materine bakterije – sprva koliformne bakterije in streptokoki, nato laktobacili in enterokoki *(1)*. Prebavni trakt odraslega človeka naseljuje 10^{14} bakterij, kar je 10-krat več kot je vseh celic v našem telesu *(2)*. Sestava in število mikroorganizmov v prebavnem traktu sta različna glede na anatomsko lokacijo. V želodcu in dvanajstniku je zaradi kislega okolja in peristaltike prisotnih le malo mikroorganizmov (10^1–10^3/ml). To so grampozitivne bakterije (npr. *Streptococcus, Staphylococcus, Lactobacillus, Corynebacterium*). V jejunumu število mikroorganizmov naraste do 10^4/ml. Najdemo laktobacile, enterokoke, grampozitivne aerobe ali fakultativne anaerobe. Število mikroorganizmov se nato v ileumu poveča do 10^9/ml zaradi enterobakterij in ostalih koliformnih bakterij. V debelem črevesu prevladujejo gramnegativni bacili in anaerobi (npr. *E. coli, Klebsiella, Enterobacter, Bacteroides, Clostridium* in *Bifidobacterium*) v številu 10^{12}/ml *(2, 3)*. Normalna gastrointestinalna flora ima pomembno vlogo v homeostazi. Črevesne bakterije so pomembne, ker:

- proizvajajo folat in vitamin K,
- fermentirajo neabsorbirane sladkorje do maščobnih kislin,
- preprečujejo razrast patogenih bakterij in
- imajo pomembno vlogo v metabolizmu nekaterih zdravil.

Navadno v tankem črevesu koliformne bakterije niso prisotne oz. jih najdemo v majhnih koncentracijah (< 10^3/ml). Bakterijsko preraščanje tankega črevesa (angl. *small intestinal bacterial overgrowth*, SIBO) je pridobljeno stanje, ki pomeni nenormalno visoko prisotnost patogenih bakterij ali prekomerno razrast sicer v normalnih okoliščinah prisotnih bakterij *(4)*. Po definiciji govorimo o SIBO v primeru porasta > 10^5 kolonij (angl. *colony-forming unit*, CFU) bakterij na mililiter aspirata tekočine iz proksimalnega jejunuma v kvantitativni aerobni in anaerobni bakterijski kulturi *(2)*.

PATOFIZIOLOGIJA

Številni fiziološki mehanizmi preprečujejo razrast bakterij v prebavilih. Motnja ali sprememba v teh mehanizmih vodi v nastanek SIBO. Poglavitni mehanizem regulacije bakterij je peristaltika v tankem črevesu, ki odstrani bakterije preden le-te kolonizirajo sluznico. Intersticijske Cajalove celice preko oscilacije membranskega potenciala vzpostavljajo intrinzičen črevesni persitaltični ritem, ki določa smer in frekvenco kontrakcij. Pri peristaltiki sodelujeta še enterični nevronski sistem in gladko mišičje v steni črevesja. Želodčna kislina in žolč sta toksična za številne mikroorganizme, prebavni encimi v tankem črevesu pomagajo uničiti v sluz ujete bakterije, ileocekalna zaklopka preprečuje anterogradni dostop bakterij iz debelega v tanko črevo, enterični imunski sistem pa preprečuje adhezijo in translokacijo mikroorganizmov. Anatomske spremembe v tankem črevesu lahko oslabijo obrambne mehanizme in olajšajo razrast bakterij (npr. nastanek divertiklov, striktur in fistul (po operacijah, obsevanju ali zaradi Crohnove bolezni), kirurške rekonstrukcije (Billroth II operacija, enteralne anastomoze)). Pridobljene in prirojene bolezni in stanja imunske pomanjkljivosti so prav tako povezani z višjo pojavnostjo SIBO *(2, 5)*. V tabeli 1 so našteta specifična stanja ali bolezni in vzročni mehanizmi.

POVZROČITELJI

Grampozitivna flora (npr. *Streptococcus, Staphylococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Corynebacterium*) je navadno normalno prisotna v želodcu, dvanajstniku in jejunu-

Tabela 1. Patofiziološki mehanizmi in specifične motnje, povezane z bakterijskim preraščanjem tankega črevesa *(2)*. SIBO – bakterijsko preraščanje tankega črevesa.

Mehanizem	Specifično stanje ali bolezen
motena želodčna kislinska pregrada	atrofični gastritis (avtoimunski, *Helicobacter pylori*) zaviralci protonske črpalke visoka starost s hipoklorhidrijo vagotomija subtotalna ali totalna gastrektomija bariatrični želodčni obvod
moteno praznjenje tankega črevesa	primarne visceralne nevropatije in miopatije sistemske bolezni veziva (npr. skleroderma, polimiozitis, sistemski lupus eritematosus, mešana vezivnotkivna bolezen) poradiacijska enteropatija paraneoplastični sindrom amiloidoza (primarna in sekundarna) mišična distrofija (miotonična, Duchennova, okulofaringealne mišične distrofije) Chagasova bolezen zdravila (opiati, triciklični antidepresivi, antiholinergiki) idiopatski mezenterični ganglionitis
anatomske spremembe tankega črevesa	divertikli dvanajstnika in jejunuma fistule in strikture sindrom slepe vijuge (po Roux-en-Y rekonstrukciji, želodčni obvod) resekcija ileocekalne zaklopke
lokalna ali sistemska imunska pomanjkljivost	navadna kombinirana imunska pomanjkljivost (angl. *common variable immunodeficiency*, CVID) hipogamaglobulinemija T-celična imunska pomanjkljivost AIDS huda podhranjenost
sistemske bolezni, povezane s SIBO	celiakija ciroza nealkoholni steatohepatitis kronični pankreatitis sladkorna bolezen končna ledvična odpoved

mu, vendar v številu < 10^5 CFU/ml. Razrast te flore je navadno povezana z moteno želodčno kislinsko pregrado. Koliformna flora (npr. *Enterobacter, E. coli, Bacteroides, Clostridium, Klebsiella*) normalno v zgornjih prebavilih ni prisotna, tako da je vsaka osamitev teh bakterij patološka. Navadno je razrast tovrstnih bakterij posledica motenega praznjenja tankega črevesa ali spremenjene anatomije (tabela 2) *(6)*.

Tabela 2. Bakterijsko preraščanje tankega črevesa in povzročitelji *(2, 6)*.

	Grampozitivna flora	Gramnegativni bacili
Patogeneza	motena želodčna kislinska pregrada	moteno praznjenje tankega črevesa
Vzrok	*H. pylori* atrofični gastritis, zdravila, aklorhidrija	motnje peristaltike ali anatomske spremembe
Aerobne bakterije	*Streptoccoccus, Staphylococcus, Enterococcus, Micrococcus, Lactobacillus, Corynebacterium*	*E. coli, Klebsiella, Proteus, Acinetobacter, Enterobacter, Neisseria, Citrobacter*
Anaerobne bakterije	*Fusobacterium, Peptostreptococcus*	*Bacteroides, Clostridium*
Prizadeti del prebavil	želodec, dvanajstnik, proksimalni jejunum	tanko črevo

KLINIČNA SLIKA

Klinična slika SIBO je pestra in vključuje številne simptome. Tipični klinični simptomi so:

- bolečina v trebuhu,
- napihnjenost,
- napenjanje,
- spahovanje,
- steatoreja,
- malabsorbcija,
- hujšanje,
- podhranjenost in
- dispepsija.

SIBO je lahko vzrok kronični driski ali malabsorbcijskemu sindromu. Starejši bolniki so lahko tudi povsem asimptomatski *(2)*. Preštevilne bakterije dekonjugirajo žolčne kisline, ki so toksične za črevesno sluznico, in povzročijo vodeno drisko. Motena je absorbcija maščob in lipidotopnih vitaminov A, D, E in K *(7)*. Okvarjena črevesna sluznica je vzrok tudi za moteno absorbcijo ogljikovih hidratov, ki jih bakterije nato razgradijo v maščobne kisline in pline (vodik, metan).

Laboratorijski izvidi so pri večini bolnikov normalni, patološki pa so pri bolnikih s hudo obliko SIBO. Značilna je makrocitna anemija zaradi pomanjkanja vitamina B_{12}, nivo folne kisline in vitamina K je povišan. Povišan je serumski D-laktat, znižan pa je albumin *(8)*.

Endoskopska slika pri bolnikih s SIBO je največkrat normalna ali blago nespecifično patološka. Prisotni so lahko:

- edem sluznice,
- zabrisana žilna risba,
- mestoma pordela sluznica in
- ulkusi.

Mikroskopski pregled največkrat pokaže nespecifične vnetne spremembe, kot so:

- kriptitis,
- skrajšane resice,
- intraepitelijska limfocitoza in
- eozinofilija.

DIAGNOSTIKA

Zlati standard za diagnostiko SIBO je aspiracija in direktna kultivacija jejunalnega aspirata *(2, 7, 8)*. Postopek pridobivanja aspirata je relativno zapleten. Kultivacija jejunalne biopsije je tehnično enostavnejša, vendar manj občutljiva metoda, ki jo bo potrebno še potrditi *(9)*. Z neinvazivnimi dihalnimi testi izmerimo produkte bakterijske razgradnje testnega substrata v izdihanem zraku. Zaradi enostavnosti, neinvazivnosti in nizke cene so dihalni testi kljub nižji občutljivosti in specifičnosti vse pogosteje uporabljani *(9)*.

Kultivacija jejunalnega aspirata

Priprava bolnika pred endoskopskim posegom

Mesec dni pred posegom bolnika ne smemo čistiti za kolonoskopijo, dva tedna pred posegom naj ne jemlje antibiotikov ali probiotikov. Teden dni ne sme jemati odvajal, mehčalcev blata ali dodatnih vlaknin. Dva dni pred posegom naj ne prejema prokinetikov in ne uživa obrokov z visoko vsebnostjo ogljikovih hidratov. Bolnik naj bo tešč 12 ur pred posegom. Pred posegom naj si bolnik spere usta z antiseptično ustno vodico *(2)*.

Odvzem in transport vzorca

Primerna kužnina je aspirat tankega črevesa, ki ga je potrebno odvzeti endoskopsko s sterilnim katetrom oz. sterilno cevko. Z endoskopom je potrebno doseči proksimalni jejunum, navadno uporabimo enteroskop ali pediatrični kolonoskop. Ob odvzemu vzorca se v tanko črevo ne sme vnesti zraka, da se ne zavira rast anaerobov. Odvzeti je treba najmanj 1 ml tekočine. Posebno transportno gojišče ni potrebno, pomembno pa je, da se vzorec takoj dostavi v laboratorij. Če takojšnji transport ni možen, vzorec shranimo pri + 4 °C (v hladilniku) najkasneje v dveh urah po odvzemu, saj se ob daljšem čakanju lahko pomembno spremeni količina bakterij v vzorcu *(2, 10)*.

Na napotnici mora biti jasno označeno, kakšna preiskava je naročena in točna ura odvzema vzorca. Priporočljivo je tudi, da se laboratorij predhodno obvesti o prihodu tovrstnega vzorca. Druge kužnine (npr. aspirat želodčne vsebine) za to preiskavo niso primerne.

Obdelava v laboratoriju

Vzorec po predhodni obdelavi nacepimo na krvni in čokoladni agar, na gojišče za anaerobe (npr. Schaedler agar) ter v tekoče gojišče (npr. tioglikolatni bujon). Vzorec v laboratoriju najprej premešamo. Sledi priprava treh delovnih redčin (10^{-2}, 10^{-4} in 10^{-6}), kužnino redčimo s tekočim gojiščem. Vsako od delovnih redčin nacepimo na krvni, čokoladni in Schaedler agar. Krvni agar inkubiramo 16–24 ur pri 35 °C v aerobni atmosferi, čokoladni agar 16–24 ur pri 35 °C v CO_2, Schaedler agar pa inkubiramo 72 ur pri 35 °C v anaerobni atmosferi *(10)*.

Po končani inkubaciji sledi kvantifikacija kolonij iz plošč, kjer poraste med 30–300 kolonij. Posebej ocenimo skupno število vseh mikroorganizmov in posebej še skupno število aerobno in skupno število anaerobno rastočih mikroorganizmov. Identifikacija bakterijskih vrst ni nujno potrebna, se pa običajno izvede vsaj v zgornjem delu tankega črevesa. Bakterije, ki so normalno prisotne v debelem črevesu (npr. *Enterobacter, E. coli, Bacteroides, Clostridium* in *Klebsiella*), ne bi smele biti prisotne *(2)*. Testiranje občutljivosti za antibiotike se izvaja le po dogovoru, saj je preiskava v osnovi namenjena kvantifikaciji mikroorganizmov.

Če je celokupno število bakterij < 10^5 CFU/ml, je rezultat v mejah normale. Če je celokupno število mikroorganizmov > 10^5 CFU/ml, gre lahko za bakterijsko preraščanje.

Dihalni testi

Dihalni testi izkoriščajo zmožnost bakterij, ki kolonizirajo prebavni trakt, da razgradijo testne sladkorne substrate. Najpogosteje kot substrat uporabljamo laktulozo, glukozo in D-ksilozo, v izdihanem zraku pa merimo produkte (vodik, metan ali radioizotopno označen ogljikov dioksid (CO_2)) *(8)*. Dihalni testi imajo nižjo specifičnost in občutljivost od kulture jejunalnega aspirata in niso standardizirani *(7, 11)*.

Priprava bolnika pred dihalnim testom

Podobno kot pred endoskopsko preiskavo za odvzem jejunalnega aspirata mesec dni pred posegom bolnika ne smemo čistiti za kolonoskopijo, dva tedna pred posegom pa naj ne jemlje antibiotikov ali probiotikov. Teden dni ne sme uživati odvajal, mehčalcev blata ali dodatnih vlaknin. Dva dni pred posegom naj ne prejema prokinetikov in ne uživa obrokov z visoko vsebnostjo ogljikovih hidratov. Bolnik naj bo tešč 12 ur pred posegom. Pred posegom naj si bolnik spere usta z antiseptično ustno vodico *(2)*.

Testni protokoli

Bolnik zaužije 10 g laktuloze. Nato naslednje 3 ure vsakih 15 minut zabeležimo koncentracijo vodika ali metana v izdihanem zraku. Pri zdravih ljudeh se laktuloza ne absorbira vse do prehoda v debelo črevo (tj. po približno 90 minutah). V primeru SIBO pa pride do metaboliziranja laktuloze v tankem črevesu, kar zaznamo kot zgodnje (v manj kot 90 minutah) povišanje koncentracije vodika ali metana v izdihanem zraku za več kot 20 ppm glede na izhodiščno vrednost.

Namesto laktuloze lahko bolnik zaužije 50 g glukoze. Ker se glukoza absorbira že v tankem črevesu, je lahko test krajši in traja le 2 uri. V primeru SIBO glukozo metabolizirajo bakterije v tankem črevesu še preden pride do absorbcije, kar se kaže kot povišanje koncentracije vodika ali metana v izdihanem zraku za več kot 20 ppm glede na izhodiščno vrednost.

D-ksiloza se v črevesju ne absorbira. Navadno jo razgradijo gramnegativni aerobi v debelem črevesu. Pride do izločanja

radioaktivnega izotopa $^{14}CO_2$. Pri bolnikih s SIBO se razgradnja začne že v tankem črevesu in pride do končne akumulacije ^{14}C 4,5 % v štirih urah *(2)*.

ZDRAVLJENJE

Skušamo identificirati in sanirati vzroke SIBO, popraviti vzročni dejavnik in nato zmanjšati število bakterij v tankem črevesu *(2)*. Vzročno zdravljenje oz. eliminacija vzroka za SIBO je najučinkovitejše. Sicer pa skušamo bolniku pomagati z antibiotično terapijo. Cilj je zmanjšanje količine bakterij v prebavilih. Uporabljamo metronidazol, ciprofloksacin, rifaksimin in druge antibiotike. Odmerki in trajanje zdravljenja so opisani v tabeli 3. Ob antibiotični terapiji dietna prehrana (visoka vsebnost maščob, nizka vsebnost ogljikovih hidratov in beljakovin) zmanjša simptome SIBO. Pri shujšanih je potrebna prehranska podpora ter nadomeščanje vitaminov in mikroelementov.

Tabela 3. Antibiotiki za zdravljenje bakterijskega preraščanja tankega črevesa *(2)*.

Antibiotik	Odmerek	Trajanje
tetracikin	250–500 mg 4-krat/dan	7 dni
ciprofloksacin	250–500 mg 2-krat/dan	7–10 dni
doksiciklin	100 mg 2-krat/dan	10 dni
metronidazol	250 mg 2–3-krat/dan	7 dni
neomicin	500 mg 2-krat/dan	10 dni
norfloksacin	400 mg 2-krat/dan	7 dni
amoksicilin-klavulanat	500 mg/125 mg 3-krat/dan	7–10 dni
rifaksimin	400 mg 2-krat ali 3-krat/dan	10 dni

LITERATURA

1. Eggesbo M, Moen B, Peddada S, et al. Development of gut microbiota in infants not exposed to medical inverventions. APMIS. 2011; 119 (1): 17–35.
2. Bohm M, Siwiec RM, Wo JM. Diagnosis and management of small intestinal bacterial overgrowth. Nutr Clin Pract. 2013; 28 (3): 289–99.
3. Walker MM, Talley NJ. Review article: bacteria and pathogenesis of disease in the upper gastrointestinal tract–beyond the era of Helicobacter pylori. Aliment Pharmacol Ther. 2014; 39 (8): 767–79.
4. Gabrielli M, D'Angelo G, Di Rienzo T, et al. Diagnosis of small intestinal bacterial overgrowth in the clinical practice. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2013; 17 (Suppl 2): 30–5.
5. Vanderhoof JA, Pauley-Hunter RJ. Etiology and pathogenesis of small intestinal bacterial overgrowth [internet]. UpToDate; 2015 [citirano 2015 Oct 15]. Dosegljivo na: http://www.uptodate.com/contents/etiology-and-pathogenesis-of-small-intestinal-bacterial-overgrowth
6. Husebye E. The pathogenesis of gastrointestinal bacterial overgrowth. Chemotherapy. 2005; 51 (Suppl 1): 1–22.
7. Miazga A, Osinski M, Cichy W, et al. Current views on the etiopathogenesis, clinical manifestation, diagnostics, treatment and correlation with other nosological entities of SIBO. Adv Med Sci. 2015; 60 (1): 118–24.
8. Vanderhoof JA, Pauley-Hunter RJ. Clinical manifestations and diagnosis of small intestinal bacterial overgrowth [internet]. UpToDate; 2015 [citirano 2015 Oct 15]. Dosegljivo na: http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-small-intestinal bacterial-overgrowth
9. Chandra S, Dutta U, Noor MT, et al. Endoscopic jejunal biopsy culture: a simple and effective method to study jejunal microflora. Indian J Gastroenterol. 2010; 29 (6): 226–30.
10. Ellis BC. Quantitative Culture of Small-Bowel Contents. In: Garcia LS, Isenberg HD, eds. Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM Press; 2010.
11. Khoshini R, Dai SC, Lezcano S, et al. A systematic review of diagnostic tests for small intestinal bacterial overgrowth. Dig Dis Sci. 2008; 53 (6): 1443–54.

Sandra Janežič[1*], Aleksander Mahnič[2], Maja Rupnik[3]

Različni pristopi za študije interakcij črevesne mikrobiote in bakterije *Clostridium difficile*

Different Approaches to Study Interactions between Gut Microbiota and Clostridium difficile

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: črevesna mikrobiota, *Clostridium difficile*, interakcije, disbioza

Črevesna mikrobiota je kompleksen ekosistem različnih mikroorganizmov, ki naseljujejo naše črevo in imajo pomembno vlogo v zdravju in bolezni. Ena od pomembnih vlog črevesne mikrobiote je zaščita pred kolonizacijo s patogenimi mikroorganizmi. Okužbe s *Clostridium difficile* so povezane s porušenjem ravnotežja v sestavi črevesne mikrobiote, ki je največkrat posledica zdravljenja z antibiotiki. To uniči številne predstavnike zdrave črevesne mikrobiote in omogoči kolonizacijo *C. difficile*. Za mikrobioto pri bolnikih, okuženih s *C. difficile*, so značilne manjša gostota in mikrobna pestrost ter razlike v zastopanosti posameznih taksonomskih skupin. Prvi pristopi za proučevanje sestave črevesne mikrobiote so temeljili na gojitvenih tehnikah, katere so potem zamenjale molekularne tehnike, med katerimi je danes metoda izbora sekvenciranje in analiza gena za 16S rRNA. Glavni poudarki pri študijah mikrobiote in *C. difficile* so razlike v zastopanosti mikrobnih skupin med zdravimi ljudmi in bolniki, okuženimi s *C. difficile*, razlike v obnovitvi črevesne mikrobiote po fekalni transplantaciji ter spremembe mikrobiote pri ponavljajočih se okužbah. Raziskani so tudi nekateri mehanizmi kolonizacijske rezistence. Večina študij je opravljenih na ljudeh, nekaj tudi na poskusnih živalih in *in vitro* modelih črevesa.

ABSTRACT

KEY WORDS: gut microbiota, *Clostridium difficile*, interactions, dysbiosis

Gut microbiota is a complex ecosystem of different microorganisms that inhabit our intestinal tract and plays an important role in health and disease. One of the most important roles of the gut microbiota is providing colonization resistance against

[1*] Asist. dr. Sandra Janežič, univ. dipl. mikr., Oddelek za mikrobiološke raziskave, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor; sandra.janezic@nlzoh.si

[2] Aleksander Mahnič, mag. mikr., Oddelek za mikrobiološke raziskave, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; aleksander.mahnic@nlzoh.si

[3] Prof. dr. Maja Rupnik, univ. dipl. biol., Oddelek za mikrobiološke raziskave, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor; Center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana; maja.rupnik@nlzoh.si

pathogenic microorganisms. *Clostridium difficile* infections (CDI) are commonly associated with a disruption of the gut microbiota, often being a result of a decrease of protective microorganisms due to antibiotic treatment. This dysbiosis leads to a loss of colonization resistance and enables *C. difficile* to colonize the gut. In patients with CDI, the gut microbiota is characterized by lower bacterial counts and microbial diversity and differences in the representation of individual taxonomic groups. The first approaches in the studies of the gut microbiota composition were based on cultivation techniques, which were then replaced by molecular techniques, among which sequencing and analysis of 16S rRNA gene became the method of choice. The main emphasis in studies of microbiota in relation to *C. difficile* is the characterization of microbial groups that differ between healthy people and those with CDI, the regeneration of intestinal microbiota by fecal transplantation and changes in recurrent infections. In addition, some of the underlying mechanisms have also been resolved recently. Most of the studies were done on humans, some also on animals and in *in vitro* gut models.

ČREVESNA MIKROBIOTA IN NJEN POMEN

Črevesna mikrobiota je številčen in kompleksen ekosistem različnih mikroorganizmov, ki naseljujejo naše črevo in ki s svojimi raznolikimi biološkimi procesi doprinesejo k presnovni pestrosti, ki je človek tekom evolucije ni razvil sam. Poleg njene vloge pri uravnavanju metabolizma in s tem učinkovitem pridobivanju energije ima črevesna mikrobiota pomembno vlogo tudi pri obrambi pred patogenimi mikroorganizmi ter pri razvoju imunskega sistema. V zadnjem času je vse več dokazov tudi o povezavi črevesne mikrobiote in osrednjega živčnega sistema; preko neposrednih živčnih povezav ali posredno preko imunskega sistema *(1, 2)*.

Najštevilčnejši predstavniki črevesne mikrobiote so različne vrste bakterij, v manjšem deležu pa najdemo tudi glive, arheje, viruse in praživali. Zdravo črevesno mikrobioto sestavlja več kot 1.000 vrst mikroorganizmov, oziroma približno 10^{12} celic na gram fecesa *(1, 2)*. Prevladujejo anaerobne bakterije iz dveh skupin; po Gramu pozitivne firmikute in po Gramu negativne bakteriodete. Med bolj zastopanimi so še aktinobakterije in proteobakterije. Kljub temu, da ima črevesna mikrobiota pri posameznikih zelo podobno funkcijo, pa so razlike v sestavi mikrobiote (predvsem na nižjih taksonomskih nivojih kot sta rod in vrsta) med posamezniki zelo velike *(1, 3)*.

VPLIV ČREVESNE MIKROBIOTE NA KOLONIZACIJO S *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

Kolonizacija prebavnega trakta se začne ob rojstvu. Raznolikost in sestava črevesne mikrobiote se med odraščanjem postopoma spreminja, njena pestrost se povečuje in dozori nekje pri starosti 2–3 let *(1)*. Čeprav je črevesna mikrobiota pri zdravih ljudeh relativno stabilna in se s časom ne spreminja, pa lahko zaradi določenih zunanjih dejavnikov (antibiotiki, prehrana, starost) pride do sprememb v sestavi in s tem tudi funkcionalnosti črevesne mikrobiote. Takšno neravnotežje v sestavi mikrobiote imenujemo disbioza *(2, 4)*. Med pomembnejšimi dejavniki, ki lahko privedejo do disbioze, je npr. zdravljenje z antibiotiki. Ena od glavnih sprememb, ki jo povzročijo antibiotiki je zmanjšana pestrost v sestavi črevesne mikrobiote, kar lahko posledično vodi do izgube odpornosti črevesa pred kolonizacijo s patogenimi mikroorganizmi, med kate-

rimi je zelo pogosta bakterija *Clostridium difficile (5).*

C. difficile je po Gramu pozitivna, striktno anaerobna, sporogena bakterija in je najpogostejša povzročiteljica bolnišničnih črevesnih okužb v številnih državah. Okužba s *C. difficile* (OCD) lahko poteka kot blaga vodena driska, krvava driska ali v težjih primerih kot psevdomembranozni kolitis, ki je lahko tudi smrten. OCD so skoraj vedno povezane z disbiozo črevesne mikrobiote, največkrat kot posledica uporabe antibiotikov, najpogosteje klindamicina, fluorokinolonov ali penicilinov. Ker je *C. difficile* odporen na številne antibiotike, je sposoben kolonizacije ob sočasni protimikrobni terapiji *(5, 6).*

PRISTOPI ZA ANALIZO ČREVESNE MIKROBIOTE

Črevesno mikrobioto so zaradi njene vloge začeli proučevati že v 70-ih letih prejšnjega stoletja. Za študije črevesne mikrobiote se kot vzorec najpogosteje odvzeme feces, redkeje vzorci biopsije. Sestavo črevesne mikrobiote se potem lahko določi na dva glavna načina; z gojitvenimi ali molekularnimi metodami. Gojenje mikroorganizmov je pogosto zahtevno in dolgotrajno ter ne pokaže celotne mikrobne združbe, ki je zastopana v določenem ekosistemu, ampak je omejena samo na nekatere predstavnike, ki se jih da enostavno gojiti *(7).* Molekularne metode pa po drugi strani temeljijo na analizi mikrobne DNA, ki je prisotna v vzorcu, torej brez potrebe po predhodnem gojenju mikroorganizmov v čisti kulturi. Najpogosteje se kot marker uporablja gen za 16S rRNA, ki ga najprej pomnožimo z verižno reakcijo s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction,* PCR) v celokupni DNA, izolirani iz vzorca fecesa. Pomnožene markerske gene se potem lahko analizira z različnimi pristopi; v začetnih študijah so za analizo pomnožkov uporabljali gelsko elektroforezo s temperaturnim (angl. *temperature gradient gel electrophoresis,* TGGE) ali denaturirajočim gradientom (angl. *denaturing gradient gel electrophoresis,* DGGE) ter visokotlačno kromatografijo v denaturirajočih pogojih (angl. *denaturing high-performance liquid chromatography,* DHPLC), danes pa se za proučevanje sestave črevesne mikrobiote najpogosteje uporablja sekvenciranje *(8–11).*

Poleg taksonomske raznolikosti, ki nam jo pokaže analiza na podlagi gena za 16S rRNA, pa danes raziskovalci vse pogosteje segajo tudi po drugih »omika« pristopih, kot sta metagenomika in transkriptomika, ki omogočajo bolj celovit pogled na funkcijske povezave mikrobiote in gostitelja ter identifikacijo genov, ki se v črevesju izražajo in lahko sodelujejo v različnih metabolnih funkcijah *(12).* Vse bolj pomembno ponovno postaja gojenje mikroorganizmov, predvsem zaradi njihove uporabnosti kot potencialnih probiotikov ali bioterapevtikov *(4, 7).*

ŠTUDIJE ČREVESNE MIKROBIOTE IN *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

Glavni poudarek pri študijah črevesne mikrobiote v povezavi s *C. difficile* je karakterizacija mikrobnih skupin, ki se razlikujejo med zdravimi ljudmi in bolniki z OCD, obnovitvi črevesne mikrobiote po fekalni transplantaciji (oblika bioterapije, s katero pri bolnikih, okuženih s *C. difficile,* zamenjajo mikrobioto s črevesno mikrobioto zdravega človeka, največkrat v obliki administracije suspenzije fecesa preko nazogastrične sonde) in spremembe mikrobiote pri ponavljajočih se okužbah *(13–15).* Večina študij je narejena na ljudeh (otrocih, mlajših odraslih in starostnikih), nekaj študij je narejenih tudi na živalskih modelih (miškah, hrčkih in miškah s humanizirano mikrobioto) in na *in vitro* modelih črevesa *(16, 17).*

Glavne in najpogosteje opisane spremembe v črevesni mikrobioti pri bolnikih z OCD so občutno zmanjšana bakterijska

gostota in vrstna raznolikost v primerjavi z zdravimi posamezniki, ki niso kolonizirani s *C. difficile*. Prav tako so v veliko študijah skupna dognanja, da je pri bolnikih z OCD manjši delež bakterij iz rodu *Bacteroides sp.* in bifidobakterij in da so sočasno pogosteje kolonizirani s fakultativnimi anaerobi (enterokoki in enterobakterijami) *(18)*.

Kolonizacija s *C. difficile* naj ne bi bila odvisna samo od prisotnosti posameznih taksonomskih skupin, ampak je pomembna tudi sama kombinacija mikroorganizmov, ki so zastopani v mikrobioti *(11)*. Razen tega obseg sprememb v črevesni mikrobioti ni povezan samo s kolonizacijskim statusom, ampak tudi s prisotnim tipom *C. difficile (11, 19)*. Škraban in sod. so v slovenski študiji pokazali, da imajo bolniki, ki so kolonizirani z bakterijo *C. difficile* PCR-ribotipa 027 (epidemičen sev, ki lahko povzroča težje oblike bolezni), značilno manjšo raznolikost kot bolniki, ki so bili kolonizirani z drugimi PCR-ribotipi. Bolniki, kolonizirani z ribotipom 027, so bili pogosteje kolonizirani tudi z glivami iz rodu *Candida sp. (11)*.

Antibiotiki imajo lahko dolgotrajen učinek na črevesno mikrobioto in vplivajo tako na zmanjšanje mikrobne gostote kot tudi mikrobne raznolikosti. Črevesna mikrobiota se v večini primerov obnovi v nekaj tednih po končani antibiotični terapiji, lahko pa traja tudi več mesecev, da se posamezne skupine povrnejo na začetno raven, ali pa so za vedno izgubljene *(20)*. V tem obdobju, ko se mikrobiota še obnavlja, pogosto pride do ponovitve okužb s *C. difficile*, ki so lahko tudi večkratne *(21)*. Chang in sod. so poročali, da je pri ponovitvah OCD črevesna mikrobiota manj raznolika kot pri primarni okužbi *(13)*. Pri zdravljenju in preprečevanju ponovitev okužb se je kot zelo uspešna pokazala t. i. fekalna transplantacija pri kateri črevesno mikrobioto bolnika z OCD zamenjamo z mikrobioto zdravega človeka ter s tem ponovno vzpostavimo mikrobno simbiozo, ki povrne rezistenco pred kolonizacijo s patogenimi bakterijami *(1, 20)*.

Za okužbe s *C. difficile* so še posebej dovzetni starejši ljudje (> 65 let), ki imajo v primerjavi z zdravimi odraslimi drugačno sestavo črevesne mikrobiote. Medtem ko je mikrobiota pri zdravih odraslih skozi čas relativno stabilna, je pri starostniku bolj dinamična (večje razlike med posamezniki) in manj raznovrstna. Z različnimi študijami so pokazali, da je pri starostnikih zastopanost nekaterih »zaščitnih« skupin manjša (manj bifidobakterij in nekaterih predstavnikov firmikut), več je bakteriodet in proteobakterij *(22, 23)*. Čeprav je možno, da je starost neodvisen dejavnik tveganja za OCD, je mogoče tudi, da je večja dovzetnost za okužbe pri starostnikih posledica njihovega šibkejšega imunskega statusa in večje verjetnosti antibiotične terapije in zdravljenja v bolnišnici, kar so tudi dejavniki tveganja za okužbo s *C. difficile (5, 20)*.

V Sloveniji je bila narejena študija črevesne mikrobiote pri starostnikih (60–85 let), v kateri se je spremljala tudi kolonizacija s *C. difficile*. V raziskavo je bilo vključenih 88 starostnikov in samo 6 jih je bilo pozitivnih na *C. difficile*. Mikrobiota je bila analizirana z DHPLC in sekvenciranjem mikrobne združbe na podlagi gena za 16S rRNA, vendar z nobeno od metod nismo našli statistično pomembnih razlik med koloniziranimi in ne-koloniziranimi osebki. Vzrok za to je lahko bodisi premajhno število *C. difficile* pozitivnih vzorcev bodisi že prej omenjena velika raznolikost v sestavi črevesne mikrobiote med posamezniki (Mahnič in Rupnik, neobjavljeno).

Dojenčki so posebna skupina, ki so pogosto kolonizirani s *C. difficile* (do 50 % dojenčkov naj bi bilo koloniziranih), vendar se pri njih bolezen le redko razvije *(8)*. Črevesna mikrobiota dojenčkov se razlikuje od mikrobiote pri zdra-

vih odraslih, razlike pa bi lahko bile pomembne tako pri kolonizaciji s *C. difficile* kot tudi pri odpornosti pred boleznijo. Zakaj je število OCD pri otrocih nizko, kljub visokemu odstotku koloniziranosti, še ni popolnoma pojasnjeno. Med možnimi vzroki se omenja dejstvo, da otroci še nimajo razvitega receptorja za vezavo toksina, zaščitna vloga materinega mleka (IgA, ki preprečuje vezavo toksina na receptor) ali pa celo zaščitna vloga specifičnih predstavnikov dojenčkove črevesne mikrobiote *(20)*.

Vedno pomembnejši delež študij predstavljajo raziskave mehanizmov, ki prispevajo k preprečevanju rasti in produkcije toksinov bakterije *C. difficile*. Eden izmed njih je tekmovanje za hranila. V mikrobioti po zdravljenju z antibiotiki lahko manjkajo skupine, ki bi porabljale sialično kislino kot vir hranil, ta pa zato ostane na razpolago nekaterim patogenim mikroorganizmom, npr. *C. difficile* in salmonelam *(24)*. Drug pomemben mehanizem je uravnavanje razmerja med primarnimi in sekundarnimi solmi žolčnih kislin. To razmerje namreč lahko vzpodbuja klitje spor *C. difficile* in/ali zavira rast vegetativnih celic *(25, 26)*. Poznavanje teh mehanizmov je pomembno pri razvoju kombiniranih probiotikov.

ZAKLJUČEK

Čeprav je vloga črevesne mikrobiote pri okužbah s *C. difficile* poznana že dolgo in se je razumevanje patogeneze *C. difficile* v zadnjih desetletjih zelo izboljšalo, še vedno nimamo dovolj znanja o tem, katere so ključne komponente črevesne mikrobiote, povezane z zaščitno vlogo pred okužbami s *C. difficile*. Novejši pristopi, kot so nove generacije sekvenciranja DNK in metabolomika, bodo omogočili bolj poglobljeno analizo razlik v strukturi črevesne mikrobiote med zdravimi ljudmi in bolniki, okuženimi s *C. difficile*, in tako prispevali k boljšemu poznavanju vloge posameznih taksonomskih skupin ter predvsem njihove funkcije. Ti izsledki bodo lahko potem uporabni za razvoj alternativnih terapij za zdravljenje ali celo za preprečevanje okužb s *C. difficile*.

LITERATURA

1. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, et al. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. Nature. 2012; 489 (7415): 220–30.
2. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota – masters of host development and physiology. Nat Rev Microbiol. 2013; 11 (4): 227–38.
3. Turnbaugh PJ, Quince C, Faith JJ, et al. Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107 (16): 7503–8.
4. Walker AW, Lawley TD. Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. Pharmacol Res. 2013; 69 (1): 75–86.
5. Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. Clostridium difficile infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. Nat Rev Microbiol. 2009; 7 (7): 526–36.
6. McFarland LV. Antibiotic-associated diarrhea: epidemiology, trends and treatment. Future Microbiol. 2008; 3 (5): 563–78.
7. Lagier JC, Million M, Hugon P, et al. Human gut microbiota: repertoire and variations. Front Cell Infect Microbiol. 2012; 2. doi: 10.3389/fcimb.2012.00136
8. Rousseau C, Levenez F, Fouqueray C, et al. *Clostridium difficile* colonization in early infancy is accompanied by changes in intestinal microbiota composition. J Clin Microbiol. 2011; 49 (3): 858–65.
9. Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, et al. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. J Nutr. 2004; 134 (2): 465–72.
10. Goldenberg O, Herrmann S, Marjoram G, et al. Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography. J Microbiol Methods. 2007; 68 (1): 94–105.
11. Skraban J, Dzeroski S, Zenko B, et al. Gut microbiota patterns associated with colonization of different *Clostridium difficile* ribotypes. PloS One. 2013;8 (2): e58005.
12. Shoaie S, Nielsen J. Elucidating the interactions between the human gut microbiota and its host through metabolic modeling. Front Genet. 2014; 5. doi: 10.3389/fgene.2014.00086
13. Chang JY, Antonopoulos DA, Kalra A, et al. Decreased diversity of the fecal Microbiome in recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. J Infect Dis. 2008; 197 (3): 435–8.
14. Manges AR, Labbe A, Loo VG, et al. Comparative metagenomic study of alterations to the intestinal microbiota and risk of nosocomial *Clostridum difficile*-associated disease. J Infect Dis. 2010; 202 (12): 1877–84.
15. Song Y, Garg S, Girotra M, et al. Microbiota dynamics in patients treated with fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection. PLoS ONE. 2013; 8 (11): e81330.
16. Best EL, Freeman J, Wilcox MH. Models for the study of *Clostridium difficile* infection. Gut Microbes. 2012; 3 (2): 145–67.
17. Collins J, Auchtung JM, Schaefer L, et al. Humanized microbiota mice as a model of recurrent *Clostridium difficile* disease. Microbiome. 2015; 3: 35.
18. Zalig S, Rupnik M. *Clostridium difficile* infection and gut microbiota. Semin Colon Rectal Surg. 2014; 25 (3): 124–7.
19. Lawley TD, Clare S, Walker AW, et al. Targeted restoration of the intestinal microbiota with a simple, defined bacteriotherapy resolves relapsing *Clostridium difficile* disease in mice. PLoS Pathog. 2012; 8 (10): e1002995.
20. Seekatz AM, Young VB. *Clostridium difficile* and the microbiota. J Clin Invest. 2014; 124 (10): 4182–9.
21. Pépin J, Routhier S, Gagnon S, et al. Management and outcomes of a first recurrence of *Clostridium difficile*-associated disease in Quebec, Canada. Clin Infect Dis. 2006; 42 (6): 758–64.
22. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108 (1): 4586–91.
23. Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. Gut. 2001; 48 (2): 198–205.
24. Ng KM, Ferreyra JA, Higginbottom SK, et al. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. Nature. 2013; 502 (7469): 96–9.
25. Buffie CG, Bucci V, Stein RR, et al. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. Nature. 2015; 517 (7533): 205–8.
26. Rupnik M. Toward a true bacteriotherapy for *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med. 2015; 372 (16): 1566–8.

Marija Trkov[1*], Tjaša Žohar Čretnik[2], Mateja Pirš[3], Ingrid Berce[4], Mateja Ravnik[5], Metka Paragi[6]

Problematika odkrivanja bakterij *Escherichia coli*, ki povzročajo črevesne okužbe

Problems of Diarrheagenic Escherichia coli *Detection*

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Escherichia coli*, ki povzročajo črevesne okužbe, odkrivanje, VTEC, EPEC, ETEC, EIEC, EAEC, DAEC

Escherichia coli lahko postane s pridobitvijo mobilnih genetskih elementov visoko prilagojena patogena bakterija, ki povzroča različne bolezni. *E. coli*, ki povzročajo črevesne okužbe, delimo na podlagi specifičnih dejavnikov virulence v šest glavnih skupin – patotipov: enteropatogene, enterotoksigene, enteroinvazivne, enteroagregativne, difuzno adherentne in verotoksigene ali *E. coli*, ki izdelujejo toksine Šiga. V zadnjem času so bile predlagane še adherentno invazivne in toksin Šiga izdelujoče enteroagregativne *E. coli*. Čeprav so vse naštete skupine pomembne povzročiteljice drisk, pa njihova velika genetska raznolikost povzroča težave pri diagnostiki. Uporaba molekularnih metod omogoča, v nasprotju s konvencionalnimi metodami, odkrivanje specifičnih dejavnikov virulence posameznih patotipov, pomembnih za njihovo identifikacijo. V prispevku so predstavljeni posamezni patotipi, njihova vloga kot povzročiteljev drisk in molekularni postopek za njihovo odkrivanje.

ABSTRACT

KEY WORDS: diarrheagenic *Escherichia coli*, detection, VTEC, EPEC, ETEC, EIEC, EAEC, DAEC

Escherichia coli can become, with the inclusion of mobile genetic elements, a highly adapted pathogenic bacteria capable of causing a range of different diseases. On the basis of specific virulence factors, diarrheagenic *E. coli* have been grouped into six main categories: enteropathogenic *E. coli*, enterotoxigenic *E. coli*, enteroinvasive *E. coli*, enteroaggregative *E. coli*, diffusely adherent *E. coli*, and Shiga toxin/Vero cytotoxin-producing

[1*] Dr. Marija Trkov, univ. dipl. inž. živil. tehnol., Oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo Ljubljana, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Grabovičeva ulica 44, 1000 Ljubljana; marija.trkov@nlzoh.si

[2] Asist. mag. Tjaša Žohar Čretnik, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Celje, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Ipavčeva ulica 18, 3000 Celje

[3] Asist. dr. Mateja Pirš, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1104 Ljubljana

[4] Ingrid Berce, dr. vet. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Nova Gorica, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Vipavska cesta 13, 5000 Nova Gorica

[5] Mag. Mateja Ravnik, univ. dipl. kem., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj

[6] Dr. Metka Paragi, univ. dipl. biol., Oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo Ljubljana, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Grabovičeva ulica 44, 1000 Ljubljana

E. coli. Recently two further pathotypes have been suggested: adherent invasive *E. coli* and Shiga toxin producing enteroaggregative *E. coli*. Although diarrheagenic *E. coli* are important causative agents of diarrhea, their high genetic diversity causes problems in diagnosis. The usage of molecular tools, in contrast to conventional methods, enables the detection of specific virulence factors important for identifying pathotypes. This paper presents different pathotypes, their role as the agents of diarrhea and a molecular procedure for detection and identification.

UVOD

Bakterija vrste *Escherichia coli* je najbolj proučevana bakterijska vrsta. Genom te izjemne in zelo raznolike bakterije obsega med 4.200 in 5.500 genov, od katerih je manj kot 2.000 genov skupnih vsem sevom *(1)*. Od običajno neškodljive komenzalne bakterije lahko postane s pridobitvijo različnih mobilnih genetskih elementov visoko prilagojena patogena bakterija. Ti patogeni sevi lahko povzročajo različne bolezni, od izven črevesnih okužb sečil, krvnega obtoka in centralnega živčnega sistema do črevesnih okužb (angl. *diarrheagenic E. coli*, DEC). Breme teh bolezni je v svetovnem merilu vsako leto izjemno visoko *(2)*. Sevi, ki povzročajo drisko, povzročajo posamezne primere okužb in tudi izbruhe. Glede na specifične dejavnike virulence jih razvrščamo v šest osnovnih skupin – patogenih tipov. V prispevku navajamo le najpomembnejše dejavnike virulence, saj uporabljamo njihovo določevanje za prepoznavanje posameznih patogenih tipov. Natančnejši mehanizmi virulence pa so podrobno opisani v literaturi *(2–5)*. *E. coli*, ki povzročajo črevesne okužbe, sodijo med verotoksigene (VTEC/STEC), enteropatogene (EPEC), enterotoksigene (ETEC), enteroinvazivne (EIEC), enteroagregativne (EAEC) in difuzno adherentne *E. coli* (DAEC). Clements in sod. predlagajo še dodatna patogena tipa: adherentno invazivne *E. coli* (AIEC), ki jih povezujejo s Crohnovo boleznijo, in toksin Šiga izdelujoče enteroagregativne *E. coli* (angl. *Shiga-toxin producing enteroaggregative E. coli*, STEAEC) *(2)*. Predstavnik te skupine, sev *E. coli* O104:H4, je povzročil izbruh v Nemčiji leta 2011.

Velika genetska raznolikost teh bakterij povzroča težave pri diagnostiki. Zato v večini medicinskih mikrobioloških laboratorijev po svetu rutinsko ugotavljajo predvsem VTEC. *E. coli* sicer zlahka identificiramo do nivoja vrste, opredeljevanje DEC pa je zahtevno, ker zahteva dodatno laboratorijsko testiranje z ugotavljanjem prisotnosti specifičnih dejavnikov virulence. V prispevku podrobneje opisujemo tiste, ki so pomembni za njihovo identifikacijo, predstavljamo vlogo DEC kot povzročiteljic drisk, s čimer želimo poudariti pomen njihovega učinkovitega odkrivanja in stalnega spremljanja.

ZNAČILNOSTI PATOGENIH TIPOV *E. COLI*, KI POVZROČAJO ČREVESNE OKUŽBE

Enteropatogene *E. coli*

EPEC so ene najpomembnejših povzročiteljic drisk pri otrocih, z ocenjeno prevalenco v državah v razvoju med 6 in 54 %, in ene glavnih povzročiteljic dolgotrajnih drisk *(2, 6)*. Po definiciji, ki je bila sprejeta leta 1995, sta najpomembnejši lastnosti EPEC, da ne izdelujejo verocitotoksinov (VT) in da povzročajo histopatološke spremembe epitelnih celic črevesne sluznice (angl. *attaching and effacing (A/E) lesions*) *(7)*. Te spremembe jim omogočajo zapisi na otoku patogenosti, lokusu za izbris enterocitov (angl. *locus for enterocyte effacement*, LEE). LEE nosi zapise za intimin, se-

krecijski sistem III, protein Tir in različne sekrecijske proteine. Vsi sodelujejo pri pritrjevanju bakterije na celice gostitelja *(4)*. Prisotnost gena za intimin (*eae*) se široko uporablja za molekularno odkrivanje EPEC *(8)*. Vendar naj bi bili nekateri sevi z genom *eae*, t. i. »attaching and effacing« *E. coli* (A/EEC), manj ali pa nepatogeni *(9)*. Od patogenih sevov se jih razlikuje s serotipizacijo *(10)*. Med te seve, t. i. klasične in na novo prepoznane EPEC, sodi namreč le omejeno število serotipov *(7)*. Glede na prisotnost plazmida EAF (angl. *E. coli adherence factor*), ki nosi zapis za gen *bfp*A (angl. *bundle-forming pilus*), delijo EPEC v dve skupini, tipične EPEC (tEPEC) in atipične EPEC (aEPEC). Tipične EPEC imajo plazmid EAF, aEPEC pa ga nimajo *(11)*. Sevi tEPEC so v svojem virulentnem potencialu bolj homogeni kot sevi aEPEC *(6, 8)*. Večina sevov tEPEC sodi med klasične EPEC, večji del sevov aEPEC pa ne, ampak pripadajo številnim serološkim skupinam O *(6, 12)*. Nekateri avtorji navajajo, da sodijo med tEPEC zelo virulentni sevi, med tem ko sodijo manj virulentni, vendar pa pri bolnikih pogosteje prisotni, med aEPEC *(6, 11)*. Mnogi avtorji tudi aEPEC povezujejo z drisko *(13–15)*.

Verotoksigene *E. coli*

Najpomembnejša značilnost VTEC je izdelovanje verocitotoksinov ali toksinov Šiga (STEC). Delimo jih v dve skupini, VT1 (Stx1) in VT2 (Stx2), bakterije pa izdelujejo eno ali pa obe skupini toksinov. Zapise zanje nosijo geni *vtx1* (*stx1*) in *vtx2* (*stx2*). Nekatere VTEC imajo na genomu otok patogenosti LEE, ki je značilen tudi za EPEC. Znotraj obeh skupin verotoksinov razlikujemo različne podtipe in variante. Za podtip Stx1a je poznanih devet variant, za Stx1c štiri, za Stx1d ena, za Stx2a enaindvajset, za Stx2b šestnajst, za Stx2c osemnajst, za Stx2d osemnajst, za Stx2e štirinajst, za Stx2f dve in za Stx2g štiri variante *(1, 16)*. Pri okužbi z VTEC lahko pride do zapletov, kot sta trombotična trombocitopenična purpura (TTP) in hemolitični uremični sindrom (HUS). S težjim potekom bolezni so pogosteje povezani sevi, ki izdelujejo verotoksine 2 in imajo gen za intimin, vendar pa lahko krvavo drisko in HUS povzročajo tudi sevi brez LEE. Z resnejšo klinično sliko bolezni povezujejo tudi seve, ki izdelujejo toksin enterohemolizin, zapis zanj pa nosi gen *ehxA* na plazmidu. Z zapletom HUS so pogosteje povezani sevi s podtipom verotoksina Stx2a *(1)*. Kot zelo virulenten sev se je izkazal hibridni sev STEC-EAEC (STEAEC) O104:H4, ki je povzročil izbruh v Nemčiji leta 2011. Sev je povzročil bolezen brez zapleta HUS pri 3.167 bolnikih, od katerih jih je umrlo 16. Zaplet HUS se je pojavil še pri 908 bolnikih, od katerih jih je umrlo 34. Omenjeni sev je izdeloval verotoksine Stx2a, ni imel gena za intimin, vendar pa so pri njem našli številne gene, značilne za EAEC *(1)*. Sevi VTEC lahko povzročajo posamezne primere okužb in tudi izbruhe, pripadajo pa lahko zelo različnim serološkim skupinam O *(7)*. Po podatkih Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje nalezljivih bolezni (angl. *European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) in tudi slovenskih podatkih sta najpogostejši serološki skupini humanih izolatov VTEC O157 in O26 *(17, 18)*. Preostali izolati, ki so bili osamljeni v naših laboratorijih, pa pripadajo pestri paleti seroloških skupin: O6, O10, O17, O20, O27, O34, O37, O38, O55, O63, O74, O75, O76, O82, O84, O91, O103, O111, O113, O114, O126, O128, O145, O146, O148, O149, O153, O174 in O177.

Enterotoksigene *E. coli*

Za ETEC so značilni številni proteinski kolonizacijski faktorji (angl. *colonization factors*, CFs), poglavitna dejavnika virulence pa sta izdelovanje toplotno stabilnega (ST) in/ali toplotno neobstojnega entero-

toksina (LT). Razlikujemo dva tipa toksina LT. Toksin LT-I je značilen za humane izolate in je soroden toksinu kolere. Toksin LT-II je bolj značilen za nehumane izolate. ETEC lahko izdelujejo tudi druge toksine, ki pa niso značilni zgolj za ta patotip. Drisko povzročajo pri vseh starostnih skupinah ljudi. So najpogostejše povzročiteljice potovalnih drisk, predvsem pri obiskovanju držav s slabšimi higienskimi razmerami *(2, 19)*.

Enteroagregativne *E. coli*

Za EAEC je značilno, da se na celice HEp-2 vežejo v značilnem vzorcu (angl. *stacked--brick*). Bakterije lahko na črevesni sluznici tvorijo biofilm. EAEC so genetsko zelo raznolike, redki dejavniki virulence so skupni vsem sevom, zapisi zanje pa so pogosto na plazmidih. EAEC lahko izdelujejo različne toksine, ki sodijo med serinsko proteazne avtotransporterje enterobakterij (SPATE), kot npr. Pic in Pet. Izdelujejo lahko tudi druge toksine, ki prav tako prispevajo k njihovi virulenci: toplotno stabilen enterotoksin 1 (EAST-1), toksina HlyE in ShET1. Povzročajo potovalno in dolgotrajno drisko, posebne težave pa pri bolnikih z aidsom *(2)*.

Enteroinvazivne *E. coli*

Mehanizem virulence EIEC je podoben mehanizmu virulence šigel, zato so podobni tudi klinični znaki bolezni *(2)*. Za molekularno identifikacijo EIEC se pogosto uporablja prisotnost gena *ipa*H; zapis zanj se v več kopijah nahaja na kromosomu in plazmidu pInv *(9)*.

Difuzno adherentne *E. coli*

Večina sevov DAEC ima fimbrijske (Dr) in nefimbrijske (Afa) adhezine in izdelujejo SPATE Sat *(2)*. Ker so slabše poznane v svojih specifičnih dejavnikih virulence, jih v naših laboratorijih še ne določamo.

V tabeli 1 so zbrani posamezni patotipi DEC, najbolj ogrožene skupine ljudi, splošen opis bolezni in najpomembnejši genetski markerji za identifikacijo posameznih patotipov *(20)*.

Tabela 1. Patotipi DEC, najbolj ogrožene skupine ljudi, opis bolezni in najpomembnejši genetski markerji za identifikacijo patotipov. + prisotnost gena, - gen ni prisoten, tEPEC - tipične enteropatogene *E. coli*, aEPEC atipične enteropatogene *E. coli*, VTEC/STEC - verotoksigene *E. coli*, ETEC - enterotoksigene *E. coli*, EIEC - enteroinvazinve *E. coli*, EAEC - enteroagregativne *E. coli*, DAEC - difuzno adherentne *E. coli*, AIEC - adherentno invazivne *E. coli*, HUS - hemolitični uremični sindrom, LT - toplotno labilni enterotoksin, ST - toplotno stabilni enterotoksin, CFs - proteinski kolonizacijski faktorji (angl. *colonization factors*, CFs).

Patotip	Najbolj ogrožene skupine	Bolezen	Genetski markerji
tEPEC aEPEC	otroci < 5 let, odrasli (ob velikem inokulumu)	obilna vodena driska	*eae*+, *bfp*+, *vtx*- *eae*+, *vtx*-
VTEC/STEC	otroci, odrasli	vodena driska, hemoragični kolitis, HUS	*eae*+/-, *vtx*+
ETEC	otroci < 5 let, potujoči, osebe z oslabljeno imunostjo	dolgotrajna driska, vodena driska	LT, ST, CFs
EIEC/*Shigella*	otroci < 5 let, potujoči, osebe z oslabljeno imunostjo	šigeloza, dizenterija, možen HUS	*ipa*H+, *ial*+, *vtx*+ (*Shigella dysenteriae*)
EAEC	odrasli, otroci	dolgotrajna driska, potovalna driska, HUS (*vtx*+)	*aat*A, *aai*C, *agg*R, drugi
DAEC	otroci, odrasli	dolgotrajna vodena driska pri otrocih	nepoznani skupni markerji
AIEC	odrasli, otroci	povezava s Crohnovo boleznijo	nepoznan

E. COLI, KI POVZROČAJO ČREVESNE OKUŽBE KOT POVZROČITELJICE DRISK - EPIDEMIOLOŠKI PODATKI

Številne raziskave dokazujejo, da so DEC pomembne povzročiteljice drisk tako v razvitih kot manj razvitih državah. Vendar pa se objavljene študije o etiologiji drisk praviloma nanašajo na eno državo in imajo različne omejitve, kot so: različno število preiskanih vzorcev, različne skupine vključenih bolnikov, različne uporabljene metode (različni kultivacijski pristopi, serološke in molekularne metode), testiranje različnih povzročiteljev, poleg tega pa so nekatere raziskave opravljene brez kontrolnih skupin. Rezultati študij o prisotnosti posameznih patotipov DEC se močno razlikujejo glede na geografsko področje, avtorji pa ugotavljajo pogostost mešanih okužb z drugimi povzročitelji drisk. Cohen in sod. so ugotovili statistično značilno razliko v prisotnosti sevov EAEC, DAEC in aEPEC pri otrocih z drisko (skupina GE), starih ≤ 5 let, v primerjavi z otroki iz kontrolne skupine (KS) ter poudarili pogostost mešanih okužb EAEC in DAEC z virusi *(13)*. Olsen in sod. navajajo statistično značilno večjo pogostost rotavirusov, salmonel, norovirusov, adenovirusov, kampilobaktrov, sapovirusov, VTEC, klasičnih EPEC, jersinij in kriptosporidijev v skupini GE glede na KS *(10)*. A/EEC so bile zelo pogoste, vendar zastopane v podobnem deležu v skupini GE kot v KS. Bueris in sod. so ugotovili prisotnost DEC v 25,4 % vzorcev otrok z drisko, starih od enega do deset let, in v 18,7 % vzorcev KS otrok, starih do deset let *(15)*. Čeprav razlika ni bila statistično značilna, poudarjajo pomembnost njihovega odkrivanja in nadaljnjega proučevanja. Najpogostejši patotip so bile EAEC z 11,1% v GE in 8,6% v KS, sledile so aEPEC z 10 % v GE in 5,9 % v KS, ETEC z 3,7 % v GE in 3,2 % v KS, VTEC z 0,5 % v GE in 1,1 % v KS. Pogostost tEPEC je bila zelo nizka. Ben Salem-Ben Nejma in sod. navajajo ETEC, rotaviruse in salmonele kot najpogostejše povzročiteljice drisk pri otrocih do petega leta starosti *(19)*. Visoko prevalenco so ugotovili tudi za EAEC, vendar razlika, v nasprotju s prej naštetimi patogeni, ni bila statistično značilna glede na KS. Enserink in sod. pa so raziskovali prisotnost različnih črevesnih patogenov v iztrebkih otrok brez kliničnih znakov bolezni, vključenih v dnevno varstvo na Nizozemskem *(21)*. Najvišjo prevalenco so ugotovili za bakterije, med njimi najvišjo za EPEC, sledili so paraziti in nato virusi. Avtorji opozarjajo, da lahko ti otroci prenašajo črevesne patogene na druge otroke, osebje in družinske člane. V letošnjem letu so Spina in sod. objavili rezultate študije, v kateri je sodelovalo desetih evropskih držav *(22)*. Testirali so 709 vzorcev iztrebkov bolnikov z drisko, ne glede na starost, odvzetih leta 2014 z avtomatizirano molekularno metodo *FilmArray GI Panel*. V testiranje je bilo vključenih 24 povzročiteljev. V 45,8 % vzorcev niso odkrili nobenega povzročitelja, enega v 37,8 %, več povzročiteljev pa v 16,4 % vzorcev. Najpogostejši povzročitelji so bili naslednji: EPEC, kampilobaktri, toksigeni sevi *Clostridium difficile*, EAEC, norovirusi, ETEC. Zaznali so visok delež mešanih okužb in izjemno visok delež DEC, zlasti z EPEC in EAEC. S klasičnimi metodami so bile EPEC ugotovljene le v treh primerih, EAEC pa v nobenem. V večini laboratorijev namreč teh patogenov s klasičnimi metodami niso iskali. Avtorji opozarjajo na pomembnost nadaljnjega preiskovanja obeh patotipov. Visok delež EPEC in EAEC so v podobni študiji ugotovili Buss in sod., pa tudi drugi avtorji *(10, 23)*. Allerberger poudarja nujnost uporabe molekularnih metod v diagnostiki v bližnji prihodnosti in potrebo po standardizaciji, kar bi omogočilo primerljivost pridobljenih podatkov med državami *(24)*.

Steyer in sod. so med letoma 2010 in 2011 izvedli raziskavo etiologije drisk hospitaliziranih otrok v Ljubljani, mlajših od šest let, v katero je bilo zajeto odkrivanje velikega števila virusov, bakterij (salmonele, kampilobaktri, DEC, jersinije, šigele in *C. difficile)* in parazitov (*Cryptosporidium* spp., *Gardia duodenalis*) *(25)*. Molekularne preiskave odkrivanja DEC so bile izvedene na Oddelku za javnozdravstveno mikrobiologijo Ljubljana Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (OJZML NLZOH), s postopkom, opisanem v naslednjem poglavju. Najpogostejši povzročitelji drisk so bili virusi v 82,5 %, bakterije v 27,3 % in paraziti v 3 %. Med bakterijami so bile najpogostejše patogene *E. coli* (30 oz. 11,7 %) in *C. difficile* (24 oz. 8,1%), vendar pa prevalenca ni bila statistično značilno višja kot v KS (za *E. coli* 5,5 % in *C. difficile* 5,7 %). V skupini otrok z drisko so bile EAEC odkrite v 17, EPEC v 7, VTEC v 4 ter ETEC+EAEC in EPEC+EAEC v po enem vzorcu. Vendar pa je bil gen za intimin odkrit še pri 17 izolatih A/EEC v skupini GE in pri 4 izolatih v KS. Gen za intimin je bil odkrit tudi v 15 mešanih bakterijskih kulturah v GE in eni mešani bakterijski kulturi v KS. Ti vzorci lahko predstavljajo dodaten vir patogenih sevov *E. coli*. Statistično značilna je bila prevalenca kampilobaktrov (5,1 %) in salmonel (4,7%), ki niso bili odkriti v vzorcih iz KS.

Zgolj kot informacijo navajamo rezultate preiskav DEC, izvedenih leta 2014 na OJZML NLZOH, vendar teh podatkov ne moremo smatrati kot podatke o prevalenci DEC. Sodelujoči medicinski laboratoriji NLZOH in Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo so namreč že sami presejalno testirali vzorce z molekularnimi in fenotipskimi metodami ali pa jih selekcionirali na kakšen drugačen način, npr. glede na starost bolnikov, klinično sliko bolezni, potovanje. Testiranih je bilo približno 740 mešanih bakterijskih kultur ali pa izolatov *E. coli*, osamljenih iz iztrebkov bolnikov z drisko. VTEC smo ugotovili v 29 primerih, od tega v dveh le v mešani bakterijski kulturi, klasične EPEC v 32, ETEC v 15 in EIEC v treh primerih (v dveh primerih le v mešani bakterijski kulturi). A/EEC smo ugotovili v 58 primerih, dodatno pa smo gen za intimin ugotovili še v 22 mešanih bakterijskih kulturah. EAEC smo ugotovili v 20 primerih (v 7 primerih v mešani bakterijski kulturi), vendar smo preiskavo opravili samo pri vzorcih, kjer nismo našli genov, značilnih za VTEC, EPEC, ETEC in EIEC (Trkov in sod., neobjavljeni podatki).

ODKRIVANJE *E. COLI*, KI POVZROČAJO ČREVESNE OKUŽBE

Prva prepoznana skupina *E. coli*, ki povzročajo črevesne okužbe, so bile EPEC. Izraz se je široko uporabljal za seve, ki so povzročali drisko pri otrocih, pripadali pa so omejeni skupini seroloških skupin O. Ta nenatančna definicija, ki se je od leta 1955 naprej uporabljala še desetletja in je zato povzročila tudi veliko zmede, je postala zelo problematična z boljšim poznavanjem bakterije. Svetovna zdravstvena organizacija (angl. *World Health Organization*, WHO) je leta 1987 določila nabor EPEC seroloških skupin O, ki pa vključujejo tEPEC in aEPEC *(11)*. Seznam t. i. klasičnih in na novo prepoznanih serotipov EPEC je bil objavljen leta 2005 *(7)*. Vendar pa tudi sama serotipizacija ne omogoča določevanja patogenosti *E. coli* in razvrstitve v posamezne patogene tipe, saj lahko sodijo določene serološke skupine/serotipi *E. coli* v več patotipov ali pa so nepatogene. Tako je npr. *E. coli* O26 (*E. coli* O26:H11) lahko enteropatogena ali pa verotoksigena *(2)*.

Uporaba molekularnih metod je omogočila povsem nov vpogled v poznavanje *E. coli*. Omogočajo nam razlikovanje med *E. coli*, ki so del normalne črevesne mikro-

flore, in patogenimi sevi, prepoznavanje posameznih patotipov in določevanje številnih drugih lastnosti. Na žalost je trenutno vloga DEC še vedno premalo poznana in zato tudi podcenjena. V mnogih državah izvajajo molekularne preiskave samo v referenčnih laboratorijih, pogosto le v primeru obravnave izbruhov ali pa za odkrivanje posameznih patotipov, kot npr. VTEC *(26)*. Po priporočilih CDC (angl. *Centers for Disease Control and Prevention*) naj bi VTEC ugotavljali v vseh vzorcih iztrebkov bolnikov z drisko in bolnikov s sumom na HUS. Grobe smernice odkrivanja DEC podaja tudi ESCMID (angl. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*) *(27, 28)*. Vendar pa je stalno spremljanje in karakterizacija vseh skupin DEC velikega javnozdravstvenega pomena, kar se je še zlasti potrdilo leta 2011 ob izbruhu v Nemčiji.

Za odkrivanje DEC so široko uporabne metode verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR), ki omogočajo istočasno odkrivanje več genov, povezanih z njihovo virulenco. Kljub temu pa moramo biti pri izbiri metod zaradi velikega števila podtipov in variant posameznih genov, kot so *vtx*1, *vtx*2 in *eae*, pazljivi. Odkrivanje gena za intimin je tudi najpogosteje uporabljen način detekcije EPEC, vendar pa številni podatki iz literature kažejo, da vsi *eae* pozitivni sevi niso enako virulentni. Tudi določevanje genov, ki ločuje med tEPEC in aEPEC, ne zadosti ločevanju, saj raziskave kažejo, da so lahko patogeni tudi sevi aEPEC. Če kot EPEC smatramo zgolj intimin pozitivne seve, katerih serotip sodi med klasične in na novo prepoznane serotipe EPEC, pa verjetno ne zajamemo vseh patogenih sevov. Tako je glavna pomanjkljivost diagnostike EPEC trenutno nepoznavanje skupnega genetskega markerja, s katerim bi zanesljivo ločili patogene od nepatogenih sevov, zato je nujno nadaljnje raziskovanje *eae* pozitivnih sevov *(10, 24)*. Pomanjkljivost odkrivanja genov, povezanih z virulenco, direktno iz kliničnih vzorcev, brez izolacije, pa je, da so lahko določeni geni skupni tudi drugim sorodnim bakterijam (npr. geni *vtx* in *ipa*H šigelam).

Na OJZML NLZOH se uporablja naslednji postopek odkrivanja DEC iz vzorcev iztrebkov. Najprej se pripravi lizate iz mešanih bakterijskih kultur, ki so zrasle po nasaditvi vzorca iztrebka na neselektivno gojišče. V prvi preiskavi PCR se odkriva gene *vtx*1 in *vtx*2 sevov VTEC, gen *eae* sevov EPEC, A/EEC in nekaterih VTEC, gena *elt*A in *est*A enterotoksigenih *E. coli* in gen *ipa*H enteroinvazivnih *E. coli (9)*. V drugi preiskavi PCR se išče gene *agg*R, *aai*C in *aat*A enteroagregativnih *E. coli (29, 30)*. Če se s presejalnim testiranjem odkrije kakšnega od preiskovanih genov, se skuša osamiti čiste kulture s ponovnimi testiranji posameznih kolonij. Osamljene čiste kulture bakterij se identificira z biokemijskimi testi. Serotipizacija *eae* pozitivnih sevov omogoča razlikovanje med klasičnimi EPEC in A/EEC *(10)*, pri drugih patotipih pa je namenjena njihovemu spremljanju. Temu pa so namenjene tudi druge molekularne preiskave, ki se jih uporablja za nadaljnjo tipizacijo izolatov DEC.

ZAKLJUČEK

Menimo, da imamo v naši državi vzpostavljeno dobro metodologijo odkrivanja DEC, ki jo je treba čim širše uporabljati v rutinski diagnostiki in z njo preiskati, če ne vse, pa vsaj čim večje število vzorcev bolnikov z drisko. S selekcijo vzorcev glede na npr. starost bolnikov, letni čas in težji potek bolezni, spregledamo veliko okužb z DEC. Kljub temu pa ima tudi metodologija, ki smo jo opisali v prispevku, določene omejitve. Zato je treba stalno slediti novim spoznanjem v raziskovanju DEC in jih upoštevati pri uporabljeni metodologiji, namenjeni njihovemu odkrivanju in tipizaciji.

LITERATURA

1. Scheutz F. Taxonomy meets public health: the case of Shiga toxin-producing Escherichia coli. Microbiol Spectrum. 2014; 2: 1–15.
2. Clements A, Young JC, Constantinou N, et al. Infection strategies of enteric pathogenic Escherichia coli. Gut Microbes. 2012; 3: 71–87.
3. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic Escherichia coli. Clin. Microbiol. Rev. 1998; 11: 142–201.
4. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic Escherichia coli. Nat Rev Microbiol. 2004; 2: 123–40.
5. Jafari A, Aslani MM, Bouzari S. Escherichia coli: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarreal diseases in Iran. Iran J Microbiol. 2012; 4: 102–17.
6. Hu J, Torres AG. Enteropathogenic Escherichia coli: foe or innocent bystander? Clin Microbiol Infect. 2015; 21: 729–34.
7. Scheutz F, Strockbine, N. Genus I. Escherichia. In: Garrity GM, ed. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. Vol. 2. New York: Springer; 2005. p. 607–24.
8. Ochoa TJ, Contreras CA. Enteropathogenic E. coli (EPEC) infection in children. Curr Opin Infect Dis. 2011; 24: 478–83.
9. Persson S, Olsen KE, Scheutz F, et al. A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic Escherichia coli in the routine diagnostic laboratory. Clin Microbiol Infect. 2007; 13: 516–24.
10. Olesen B, Neimann J, Böttiger B, et al. Etiology of diarrhea in young children in Denmark: a case-control study. J Clin Microbiol. 2005; 43: 3636–41.
11. Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. Typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli. Emerg Infect Dis. 2002; 8: 508–13.
12. Schmidt MA. LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. Cell Microbiol. 2010; 12: 1544–52.
13. Cohen MB, Nataro JP, Bernstein DI, et al. Prevalence of diarrheagenic Escherichia coli in acute childhood enteritis: A prospective controlled study. J Pediatr. 2005; 146: 54–61.
14. Shetty VA, Kumar SH, Shetty AK, et al. Prevalence and characterization of diarrheagenic Escherichia coli isolated from adults and children in Mangalore, India. J Lab Phisicians. 2012; 4: 24–9.
15. Bueris V, Sircili MP, Taddei CR, et al. Detection of diarrheagenic Escherichia coli from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102: 839–44.
16. Scheutz F, Teel LD, Beutin L, et al. Multicenter evaluation of sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardardizing Stx nomenclature. J Clin Microbiol. 2012; 50: 2951–63.
17. European centre for disease prevention and control. STEC/VTEC infections in the EU/EEA, 2010-2012. Shiga toxin/verocytotoxin-producing Escherichia coli (VTEC/STEC) infection. Surveillance of seven priority food- and waterborne diseases in the EU/EEA. Stockholm, ECDC. 2015: 116–47.
18. Trkov M, Andlovic A, Berce I, et al. Verotoksigena Escherichia coli v Evropi in Sloveniji – kaj vemo in kako pristopiti k problemu? = Verotoxigenic Escherichia coli in Europe and Slovenia – what do we know and how to approach the problem? In: Petrovec M, ed. 4. Baničevi dnevi, Radenci. Zoonoze. Ljubljana: Med Razgl. 2012; 51 (Suppl 6): 55–61.
19. Ben Salem-Ben Neima I, Hassine Zaafrane M, Hassine F, et al. Etiology of acute diarrhea in Tunisian children with emphasis on diarrheagenic Escherichia coli: prevalence and identification of E. coli virulence markers. Iranian J Publ Health. 2014; 43: 947–60.
20. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli. Clin Microbiol Rev. 2013; 26: 822–80.
21. Enserink R, Scholts R, Bruijning-Verhagen P, et al. High detection rates of enteropathogens in asymptomatic children attending day care. PLoS One. 2014; 9: e89496.
22. Spina A, Kerr KG, Cormican M, et al. Spectrum of enteropathogens detected by the FilmArray GI Panel in a multicentre study of community-acquired gastroenteritis. Clin Microbiol Infect. 2015; 21: 719–28.
23. Buss SN, Leber A, Chapin K, et al. Multicenter evaluation of the BioFire FilmArray gastrointestinal panel for etiologic diagnosis of infectious gastroenteritis. J Clin Microbiol. 2015; 53: 915–23.
24. Allerberger F. Acute diarrhoea: new perspectives. Clin Microbiol Infect. 2015; 21: 717–8.
25. Steyer A, Jevšnik M, Uršič T, et al. Infectious causes of acute gastroenteritis in hospitalized children 0–6 years of age: a prospective case – control study. In: ESCV 2012: one world, one health, one virology: scientific programme and abstracts. 2012. p. 196.

26. Tobias J, Kassem E, Rubinstein U, et al. Involment of main diarrheagenic Escherichia coli, with emphasis on enteroaggregative E. coli, in severe non-epidemic diarrhea in a high-income country. BMC Infect Dis. 2015; 15: 1-7.
27. Centers for disease control and prevention. Recommendations for diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections by clinical laboratories. MMWR. 2009; 58 RR12: 1-14.
28. European society of clinical microbiology and infectious diseases. European manual of clinical microbiology. Cornaglia G, Courcol R, Herrmann JL, et al, eds. 1st ed. ESCMID, London: 2012. p. 171-8.
29. Cerna JF, Nataro JP, Estrada-Garcia T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative Escherichia coli strains. J Clin Microbiol. 2003; 41: 2138-40.
30. Boisen N, Scheutz F, Rasko DA, et al. Genomic characterization of enteroaggregative Escherichia coli from children in Mali. J Infect Dis. 2012; 205: 431-44.

Mateja Pirš[1*], Tjaša Cerar Kišek[2], Jernej Guzej[3], Barbara Stalowsky Poglajen[4], Tina Plankar Srovin[5], Tatjana Lejko Zupanc[6]

Napredki pri diagnostiki klasičnih črevesnih bakterijskih patogenov

New Approaches in Detection of Classical Bacterial Diarrheal Pathogens

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: bakterijska driska, klasična kultivacija, kromogena gojišča, antigenski testi, molekularne metode, sindromsko testiranje

Bakterijska diarealna obolenja so ena izmed najpogostejših obolenj tako v razvitem kot tudi v nerazvitem svetu. Standardni laboratorijski postopek za odkrivanje povzročiteljev bakterijskih drisk, kot so salmonele, šigele, kampilobaktri in jersinije, je kultivacija z uporabo različnih selektivnih in diferencialnih gojišč, odvisno od iskanega patogena. V pomoč nam je lahko tudi uporaba nekaterih kromogenih gojišč. Za nekatere patogene, kot je *Clostridium difficile* ali verotoksigena *Escherichia coli*, v rutinski diagnostiki uporabljamo tudi encimsko-imunske teste in molekularno detekcijo. Molekularne metode nam omogočajo hitrejšo in boljšo detekcijo bakterijskih patogenov. Posebej obetavne so metode, ki omogočajo sočasno zaznavo večih patogenov – bodisi samo bakterijskih patogenov bodisi v sklopu sindromskega pristopa, kjer nabor uskladimo s klinično indikacijo. Molekularne metode nam še posebej lahko koristijo pri iskanju patogenov, pri katerih so kultivacijski postopki zahtevnejši. Kljub prednostim, ki nam jih ponujajo molekularne metode, pa za dokončno opredelitev bakterijskega povzročitelja driske potrebujemo tudi izolat, tako za dokončno identifikacijo kot tudi za določanje njegove občutljivosti za antibiotike in za epidemiološko sledenje.

[1*] Asist. dr. Mateja Pirš, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; mateja.pirs@mf.uni-lj.si

[2] Asist. dr. Tjaša Cerar Kišek, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

[3] Jernej Guzej, dr. med., Interna klinika, Internistična prva pomoč, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana

[4] Barbara Stalowsky Poglajen, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana

[5] Dr. Tina Plankar Srovin, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana

[6] Doc. dr. Tatjana Lejko Zupanc, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana

ABSTRACT

KEY WORDS: bacterial diarrhea, classical cultivation, chromogenic media, antigen detection, molecular methods, syndromic testing

Bacterial gastroenteritis is one of the most common diseases in both the developing and developed worlds. Standard laboratory procedures for identifying etiological agents, such as *Salmonella, Shigella, Campylobacter* or *Yersinia,* rely on bacterial stool culture which includes both selective and differential media. In some cases chromogenic media can also be used. Media selection is adapted according to epidemiological data. For some pathogens such as *Clostridium difficile* or verotoxigenic *Escherichia coli* enzyme immunoassay and molecular tests are also used in routine diagnostics. Molecular methods improve detection and shorten testing times. Particularly promising are multiplex nucleic acid tests which enable simultaneous detection of multiple pathogens. Multiplex tests can be performed for selected bacterial pathogens or combined with other microorganism as part of syndromic diagnostic algorithm depending on the clinical data. Molecular methods are particularly useful for bacterial pathogens with special or difficult cultivation protocols. One very important limitation of this technology is that testing does not yield an isolate that could be used for definitive identification and antimicrobial resistance testing as well as for typing in investigation of outbreaks.

UVOD

Bakterijska diarealna obolenja so ena izmed najpogostejših obolenj tako v državah v razvoju kot tudi v razvitem svetu. Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) letno poročajo o več kot 1,7 milijarde primerih diarealnih obolenj. SZO ocenjuje, da so diarealna obolenja povezana z 2,2 milijonoma smrtnih primerov, od tega je tretjina primerov med otroci. Breme teh obolenj je največje v državah v razvoju, saj so pomembno povezana s slabše razvito infrastrukturo (vodovod in kanalizacija) ter podhranjenostjo v povezavi s pomanjkanjem mikrohranil *(1).* V razvitih državah je breme manjše, vendar diarealna obolenja še vedno predstavljajo enega od pomembnih javnozdravstvenih problemov.

Diarealna obolenja povzročajo različni patogeni, od bakterij do virusov in parazitov. V patogenezi bakterijskega gastroenteritisa so pomembni enterotoksini, dejavniki, ki vplivajo na adherence in kolonizacijo ter invazivnost in sposobnost prodiranja skozi sluznico. Glede na glavne patogenetske mehanizme bakterijskega gastroenteritisa lahko ločimo sekretorni, inflamatorni in invazivni gastroenteritis. Sekretorni gastroenteritis se kaže z vodeno drisko, povzročajo pa ga lahko različni enterotoksini ali adherenca oz. invazija bakterij, kar vodi v spremenjeno izločanje in absorbcijo vode in elektrolitov. Med glavnimi povzročitelji so *Vibro cholerae,* enterotoksigena *Escherichia coli* (ETEC), *Clostridium perfringens, Bacillus cereus* in *Staphylococcus aureus.* Inflamatorni gastroenteritis se kaže z drisko s primesmi krvi ali sluzi oz. dizenterijo in je posledica invazije bakterij ali citotoksinov, ki povzročijo okvaro sluznice s posledičnim vnetjem. Med najpomembnejšimi povzročitelji so: *Shigella, Salmonella* spp. (razen *S.* Typhi/Paratyphi), *Campylobacter, Clostridium difficile, E. coli,* ki izločajo Šigove oz. verotoksine (STEC), in *V. parahaemolyticus.* Invazivni gastroenteritis povzročajo bakterije, ki lahko prodrejo skozi sluznico in vdrejo v retikuloendotelijski sistem, med

glavne povzročitelje pa štejemo *S.* Typhi/Paratyphi in *Yersinia enterocolitica (2).*

Večina obolenj je samoomejujočih, za zdravljenje pa zadoščajo nadomeščanje tekočine in elektrolitov ter poostreni higienski ukrepi za preprečitev morebitnih prenosov *(3).* Identifikacija povzročitelja je priporočljiva za obravnavo bolnika s hudo ali dalj časa trajajočo drisko, pri bolnikih s sumom na invazivno obolenje in pri bolnikih z osnovnimi stanji ali obolenji, ki so lahko povezana z zapleti *(2–4).* Poleg tega pa je identifikacija povzročiteljev bakterijskih drisk v kliničnih mikrobioloških laboratorijih eden od osnovnih pristopov javnozdravstvenih ustanov za odkrivanje in sledenje izbruhov bakterijskih drisk (2, 4).

POSTOPKI ZA ODVZEM IN TRANSPORT VZORCEV

Vzorec izbora je blato v akutni fazi bolezni, torej čim prej po pojavu bolezni. Če je blato tekoče, se odvzame približno 3–5 ml blata, če je blato formirano pa 0,5–2 grama oziroma do 1/3 posodice za blato. Vzorec je priporočljivo dostaviti v laboratorij in obdelati v dveh urah po odvzemu. Čas od odvzema do obdelav v laboratoriju negativno vpliva predvsem na preživetje bakterij iz rodov *Shigella* in *Campylobacter.* V kolikor obdelava v dveh urah po odvzemu ni izvedljiva, je priporočljiva uporaba transportnega gojišča, npr. Cary-Blair, ki ga shranimo pri 4 °C do obdelave v laboratoriju *(2, 5).*

Brisi rektuma v splošnem veljajo za manj primerne vzorce zaradi slabše občutljivosti, vendar pa so lahko zelo koristni pri določenih populacijah bolnikov, npr. pri dojenčkih. Rektalni bris vstavimo približno 3 cm globoko v danko (oziroma 1 cm globlje od analnega sfinktra) in ga nežno vrtimo; blato mora biti na brisu vidno. Bris vstavimo v transportno gojišče, npr. Cary-Blair, in ga pošljemo v laboratorij *(2).* Novejši, flokulirani brisi so enakovredni klasičnim bombažnim brisom. Bolje so se izkazali flokulirani brisi, ki imajo transportno gojišče, specifično namenjeno boljšemu preživetju bakterijskih povzročiteljev drisk *(6).*

POSTOPKI V MIKROBIOLOŠKEM LABORATORIJU

Standardni postopek za odkrivanje povzročiteljev bakterijskih drisk je kultivacija z uporabo različnih selektivnih in diferencialnih gojišč, odvisno od iskanega patogena. Za nekatere patogene v rutinski diagnostiki, kot so *C. difficile* in STEC, uporabljamo tudi encimsko-imunske teste in molekularno detekcijo *(2, 4).*

Kultivacija

Standardni postopek za odkrivanje povzročiteljev bakterijskih drisk je kultivacija. Osnovna preiskava blata običajno zajema preiskave na salmonele, šigele in kampilobaktre, ponekod tudi jersinije. V nekaterih evropskih državah in ZDA se poleg osnovne preiskave blata na salmonele, šigele in kampilobaktre izvaja tudi detekcija STEC *(4).*

Patogeni, ki jih iščemo v posebnih epidemioloških situacijah, so:

- *E. coli,* ki povzročajo drisko pri potovalnih driskah;
- *V. cholerae* pri driski po vrnitvi iz endemskih področij;
- *C. difficile* pri bolnikih na/po antibiotičnem zdravljenju;
- STEC pri krvavi driski in pri sumu na hemolitično uremični sindrom (HUS);
- pri krvavi driski ali pseudoapendicitisu in dolgotrajnejši driski z artralgijami lahko iščemo tudi jersinije *(4).*

Kultivacijo bakterijskih črevesnih patogenov se izvaja s kombinacijo selektivnih in diferencialnih gojišč.

Salmonele in šigele iščemo na gojišču, kot sta npr. ksiloza-lizin-deoksiholat agar (angl. *Xylose lysine deoxycholate agar,* XLD agar) ali *Salmonella Shigella* agar (SS agar).

Izolacijo salmonel in šigel lahko dodatno izboljšamo z uporabo obogatitvenega tekočega gojišča, npr. selenitnega bujona, ki ga po prekonočni inkubaciji subkultiviramo na gojišče za salmonele in šigele. Kampilobaktre iščemo na gojišču za kampilobaktre, ki običajno vsebujejo oglje (npr. Karmali agar, ki ga je potrebno inkubirati v mikroaerofilni atmosferi pri 42 °C). Nabor gojišč lahko vključuje krvni agar, s pomočjo katerega lahko najdemo druge patogene, kot so *Aeromonas* spp., *Plesiomonas* spp. in *Vibrio* spp. V kolikor iščemo *E. coli*, ki povzročajo drisko, se običajno v nabor gojišč doda MacConkey agar; lahko samostojno, lahko pa z vključenim sorbitolom ali cefiksim-teluritom, s čimer izboljšamo detekcijo STEC. Za izolacijo *Clostridum difficile* se za klasično kultivacijo uporablja selektivno gojišče fruktozni agar s cikloserinom in cefoksitinom.

Številne študije so pokazale, da uporaba kromogenih gojišč izboljša izolacijo patogenov, kot so *Salmonella*, STEC, *Clostridum difficile*, *Vibrio* in *Yersinia (7–12)*. Kromogena gojišča za salmonele sicer izboljšajo detekcijo salmonel v blatu, vendar niso primerna za kultivacijo *Shigella* spp., kar pomeni, da z uporabo teh gojišč ne nadomestimo klasičnih selektivnih in diferencialnih gojišč, kot je npr. XLD agar *(10, 13)*.

CHROMagar STEC (CHROMagar, Francija) detektira O157 in preostalih 6 prevladujočih STEC serogrup (O26, O45, O103, O111, O121, in O145). V eni od študij so ugotovili 89,1 % občutljivost in 86,7 % specifičnost *(11)*.

S kombinacijo ChromID *C. difficile* agar (CDIF) (bioMérieux, Francija) in verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) za toksinski gen so odkrili 9 % več pozitivnih vzorcev, kot če bi uporabljali le molekularno metodo. Več kot 90 % vseh izolatov so detektirali že po 24 urah kultivacije *(12)*.

CHROMagar Yersinia (CHROMagar, Francija) je kromogeno gojišče za detekcijo virulentnih sevov *Yersinia enterocolitica* v blatu. Nekaj študij je pokazalo, da je enakovredno refrenčnemu mediju CIN (cefsulodin-irgasan-novobiocin agar), vendar je bolj specifično in z nižjim deležem lažno pozitivnih rezultatov *(8, 14)*.

CHROMagar Vibrio je kromogeno gojišče za detekcijo *Vibrio cholerae* in *V. parahaemolyticus*. Gojišče je enakovredno referenčnemu mediju TCBS (tiosulfat-citrat-žolčne soli-saharoza agar) z enako občutljivostjo (78,5 % pred obogatitvijo in 100 % po obogatitvi z alkalno peptonsko vodo) za detekcijo *V. cholerae (7)*.

Od kultivacije neodvisne metode

Dokazovanje antigenov

V rutinski diagnostiki se široko uporabljajo tovrstni testi predvsem v sklopu laboratorijske diagnostike okužb s *C. difficile*. Dokazujemo lahko prisotnost komponente celične stene glutamatno dehidrogenazo (GDH) in toksine A/B z encimsko-imunskimi testi ali imunokromatografskimi testi. Prisotnost GDH sicer kaže na prisotnost *C. difficile* v vzorcu, vendar je potrebno izvesti še dokaz toksinov A/B z encimsko-imunskimi testi, saj so klinično pomembni toksigeni sevi. Samostojni encimsko-imunski testi za toksin A/B so premalo občutljivi *(15)*.

STEC lahko dokazujemo neposredno iz blata ali obogatitvenega gojišča z uporabo encimsko-imunskih testov, ki imajo občutljivost od 70 % (blato) do 85 % (obogatitveno gojišče). Nekateri izmed imunokromatografskih testov ne zaznavajo posameznih različic *vtx2* gena *(16)*.

Encimsko-imunske teste lahko uporabljamo tudi za odkrivanje kampilobaktrov, kar sicer zelo skrajša čas do detekcije, vendar so v nekaj študijah opažali problem s specifičnostjo testa. Tekom uporabe teh testov v rutinski diagnostiki so namreč opažali slabo pozitivno napovedno vrednost (42 %) *(17)*.

Molekularna diagnostika

Molekularna detekcija gena za toksin pri *C. difficile* je zelo hitra in dobro občutljiva metoda, ki se uporablja v rutinski diagnostiki okužb s *C. difficile* v številnih laboratorijih. Na voljo imamo številne teste različnih proizvajalcev *(15)*.

Dokazovanje okužbe s STEC temelji na molekularni potrditvi prisotnosti gena *vtx1* ali *vtx2 (4)*. Čeprav se test lahko izvaja neposredno iz kužnine, pa je priporočljivo, da se testiranje kombinira s kultivacijskimi metodami, da se opredeli tudi seroskupino STEC *(2, 4)*.

V zadnjem času se vse bolj uveljavlja uporaba molekularnih metod, ki omogočajo hkratni dokaz bakterijskih patogenov, ki povzročajo driske; primer je hkratni PCR (angl. *multiplex* PCR). Z molekularnimi testi lahko dokazujemo le bakterijske povzročitelje, lahko pa jih kombiniramo s testi, ki omogočajo dokaz drugih povzročiteljev v sklopu t. i. sindromskega pristopa. Nabor patogenov je odvisen od mikrobiološkega laboratorija oziroma proizvajalca testa; pri driskah iz domačega okolja brez sumljive epidemiološke anamneze lahko zadošča že ožji nabor testov *(2, 18)*. Z uporabo hkratnega PCR zmanjšamo število klasičnih laboratorijskih tehnik, hkrati pa odkrivanje zlasti bakterijskih patogenov bistveno pospešimo. Brez težav lahko tudi razširimo nabor iskanih patogenov *(19, 20)*.

Različne študije so pokazale, da so molekularni testi bolj občutljivi od kultivacije *(2, 21–23)*. Buchan in sodelavci na primer poročajo, da je molekularna detekcija salmonel, šigel in kampilobaktrov za 25–35 % bolj občutljiva od kultivacije *(23)*. Pri interpretaciji rezultatov panelov s širokim naborom bakterijskih patogenov, moramo upoštevati dejstvo, da so rutinski kultivacijski postopki za detekcijo črevesnih patogenov optimizirani predvsem za detekcijo salmonel, šigel in kampilobaktrov, ponekod tudi za STEC, in da je slabša občutljivost kultivacijskih postopkov za redkejše patogene lahko posledica suboptimalne rutinske kultivacije. Prav pri detekciji patogenov, s katerimi se v laboratoriju redko srečujemo, lahko molekularne metode predstavljajo veliko prednost.

Pri komercialnih testih pogosto ni znano, kateri je tarčni gen za dokaz posameznega patogena *(24)*. Poznavanje tarčnega gena je pomembno predvsem pri patogenih z variabilnim virulentnim potencialom, kjer je za dokončno opredelitev patogenosti potreben fenotipski test. Primer so enteropatogene *E. coli* (EPEC), ki jih običajno molekularno iščemo s pomnoževanjem gena za intimin (*eae*). Vendar niso vsi sevi, pri katerih sicer dokažemo ta gen, enako patogeni. Pomembne so zlasti t. i. tipične EPEC, ki imajo *bfp* gen in pripadajo določenim serotipom. Samo na podlagi molekularnega testiranja blata tako ne moremo opredeliti virulentnega potenciala *(25)*. Podobno je lahko težavna interpretacija molekularnih testov za enteroagregativne *E. coli* (EAEC), saj so genetsko zelo heterogene in ne poznamo zanesljivih molekularnih označevalcev *(26)*. Problematična je lahko tudi molekularna detekcija bakterije *Yersinia enterocolitica*, saj je znano, da so biotipi 1B in 2–5 patogeni, biotip 1A pa naj bi bil nevirulenten, vendar nekatere študije kažejo, da lahko tudi ta biotip povzroča drisko. Ali bo molekularni test zaznal tudi ta biotip je odvisno od izbranega tarčnega gena *(27)*.

Posebna težava se pojavi, kadar sočasno dokažemo DNK večih patogenov, saj se postavi vprašanje, katerega od teh patogenov bi morali zdraviti (v kolikor je usmerjeno zdravljenje indicirano) *(20)*. Dodatno pa nam interpretacijo rezultatov oteži dejstvo, da so v nekaterih študijah opažali prisotnost DNK črevesnih patogenov tudi pri zdravi kontrolni skupini. Liu in sod. so tako opažali, da so se *C. jejuni, C. coli*, EPEC, ETEC, *Shigella* spp., EIEC in *V.*

cholerae pojavljali tako pri otrocih z drisko kot pri zdravih otrocih v kontrolni skupini (zaradi premajhnega števila izolatov niso mogli oceniti pojavnosti *Salmonella* spp.), hkrati pa so ugotovili, da je bila večja količina DNK prisotna pri bolnih otrocih. S tem so pokazali, da je poleg podatka o prisotnosti DNK koristen tudi podatek o količini DNK v vzorcu *(28)*.

Največja slabost molekularne detekcije črevesnih patogenov pa je nedvomno dejstvo, da nimamo na voljo izolata za dokončno opredelitev povzročitelja v primeru salmonel in šigel, pa tudi v primeru STEC. Izolat je nujno potreben tudi za določanje občutljivosti za antibiotike in za epidemiološko sledenje. Določanje občutljivosti za antibiotike je nujno, saj so npr. v Sloveniji kampilobaktri (*Campylobacter jejuni* in *C. coli*) v skoraj dveh tretjinah primerov odporni proti fluorokinolonom, prav tako pa zmanjšana občutljivost za fluorokinokone ni zanemarljiva pri salmonelah (20 %) *(29)*. Molekularna detekcija torej kultivacijskih metod ne nadomesti v celoti. V primeru pozitivnega PCR je tako smiselno, da iz primarnega vzorca izvedemo tudi kultivacijo bakterijskega patogena *(2, 30)*.

NAŠE IZKUŠNJE Z MOLEKULARNIMI METODAMI ZA DETEKCIJO SALMONEL, ŠIGEL, KAMPILOBAKTROV IN JERSINIJ

Metode

Zajeli smo vse bolnike, za katere so iz Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja v obdobju od 1. 6. 2014 do 30. 8. 2014 poslali blato za kultivacijo salmonel, šigel, kampilobaktrov in jersinij. Blato je bilo poslano v transportnem gojišču *AlphaTec ETM*.

Klasična kultivacija

Blato smo nacepili po standardnem postopku na krvni agar, XLD, Karmali agar in selenitni bujon, ki smo ga po prekonočni inkubaciji precepili na XLD agar.

Molekularna detekcija

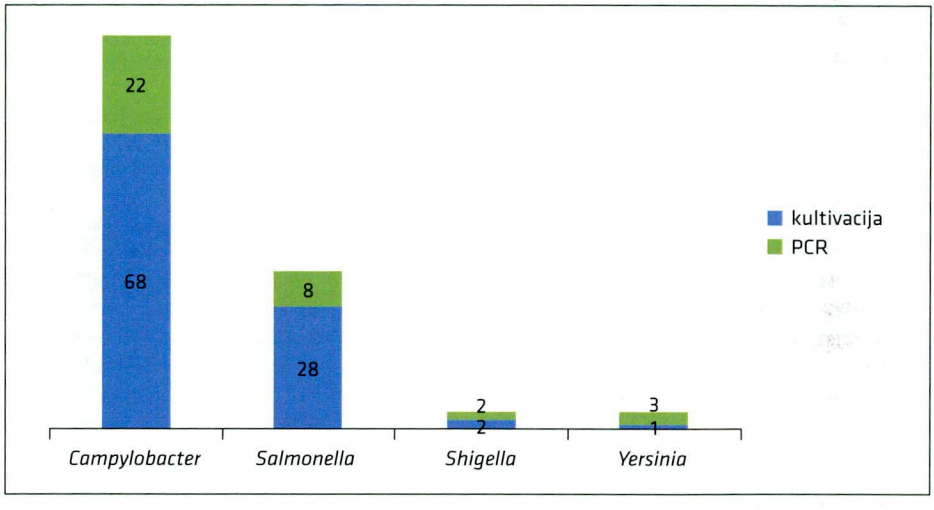
Celokupno nukleinsko kislino smo izolirali z uporabo kita *MagNA Pure Compact Total Nucleic Acid Isolation Kit* (Roche, Nemčija). Molekularni dokaz salmonel, šigel, kampilobaktrov in jersinij s hkratnim PCR v realnem času smo izvedli z uporabo kita *Roche LightMix Modular Assay Gastro – Bacteria* (Roche, Nemčija).

Rezultati

V raziskavo smo vključili 326 vzorcev blata 317 bolnikov. S kultivacijo smo dokazali povzročitelja v 30,4 % (100 bolnikov), z molekularnimi metodami pa v 39,3 % (134 bolnikov). S kultivacijo smo dokazali 68 kampilobaktrov, s PCR pa smo dokazali prisotnost specifičnega tarčnega gena v 90 vzorcih (24,4 % več). Salmonele smo izolirali v 28 vzorcih, s PCR pa smo dokazali prisotnost specifične tarče v 36 vzorcih (22,2 % več). Šigele smo izolirali v dveh primerih, PCR je bil pozitiven še v enem dodatnem vzorcu. Jersinije smo izolirali v enem vzorcu, prisotnost specifičnega odseka DNK pa smo dokazali v treh primerih (slika 1). V vseh primerih, ko smo s kultivacijo izolirali bakterijskega povzročitelja, so bili molekularni testi pozitivni. V 34 primerih s kultivacijo povzročitelja nismo uspeli dokazati, molekularni testi pa so bili pozitivni. V štirih primerih diskrepantnih rezultatov (po dva kampilobaktra in dve salmoneli) so bolniki že prejemali antibiotično terapijo, za 13 bolnikov ni bilo znano, ali so že prejemali antibiotike ali ne, preostali bolniki antibiotika niso prejemali. Devet bolnikov je imelo pred odvzemom blata drisko, ki je trajala teden dni ali več. S kultivacijo dvojih okužb nismo dokazali, s PCR pa smo pri 3 bolnikih dokazali sočasno prisotnost DNK salmonel in kampilobaktrov. Rezultati naše pilotske študije so podobni kot v prej omenjenih študijah *(21–23)*. Interpretacija diskrepantnih rezultatov je težavna, nekaj jih lahko pojasnimo s pred-

hodno antibiotično terapijo oziroma dalj časa trajajočo simptomatiko, kjer bi lahko bili povzročitelji mrtvi, DNK pa je še prisotna v blatu.

Molekularna diagnostika klasičnih bakterijskih patogenov nam omogoča hitrejši dokaz morebitnih povzročiteljev, zlasti v primeru kampilobaktrov, kjer je kultivacija dolgotrajnejša oziroma v primeru jersinij, kjer so kultivacijski postopki lahko zahtevnejši. V idealnih razmerah bi lahko z molekularno diagnostiko hitro ugotovili, ali je prisotna DNK salmonel, šigel, kampilobaktrov in jersinij, dodatno bi lahko vključili še detekcijo verotoksinov, rezultate pa bi potrdili s klasično kultivacijo, s katero bi dokončno identificirali povzročitelja in mu določili občutljivost za antibiotike. V primeru negativnega rezultata molekularnega testiranja bi lahko preiskavo zaključili kot negativno oziroma bi blato nacepili na neselektivno gojišče, kot je npr. krvi agar, kjer bi iskali še nekatere redkejše povzročitelje. Slabost tega pristopa je seveda višja cena za naročnika in večja zahtevnost preiskave za izvajalca, prednost pa je hitrejša opredelitev povzročitelja, kar pripomore k izbiri ustreznega antibiotika, v kolikor je antibiotično zdravljenje indicirano.



Slika 1. Rezultati testiranja vzorcev blata s klasično kultivacijo in z verižno reakcijo s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) za salmonele, šigele, kampilobaktre in jersinije.

ZAKLJUČEK

Klasični diagnostični postopki za odkrivanje bakterijskih povzročiteljev drisk, kot so salmonele, šigele, kampilobaktri in jersinije, obsegajo kultivacijo na selektivnih in diferencialnih gojiščih, v pomoč nam je lahko tudi uporaba nekaterih kromogenih gojišč. Molekularne metode nam omogočajo hitrejšo in boljšo detekcijo bakterijskih patogenov. Posebej obetavne so metode, ki omogočajo sočasno zaznavo večih patogenov, bodisi samo bakterijskih patogenov bodisi v sklopu sindromskega pristopa, kjer nabor uskladimo s klinično indikacijo. Kljub prednostim, ki nam jih ponujajo molekularne metode, pa za dokončno opredelitev povzročitelja, določanje občutljivosti za antibiotike in za epidemiološko sledenje potrebujemo tudi izolat.

LITERATURA

1. WHO Media centre. Diarrhoeal disease [internet]. Geneva: WHO [citirano 2015 Sep 30]. Dosegljivo na: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/
2. Humphries RM, Linscott AJ. Laboratory diagnosis of bacterial gastroenteritis. Clin Microbiol Rev. 2015; 28: 3–31.
3. Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. Clin Infect Dis. 2001. 32: 331–51.
4. Bonacorsi S, Garbarg-Chenon A, Kortbeek L. Gastroenteritis. In: Cornaglia G, Courcol R, Herrmann JL, eds. ESCMID European manual of clinical microbiology. 1st ed. Epernay: Société Française de Microbiologie; 2012. p. 171–8.
5. Linscott. Specimen collection, transport, and acceptability. In: Garcia LS, Isenberg HD, eds. Clinical microbiology Procedures handbook. 3rd ed. Washington: ASM Press; 2010. p. 49–80.
6. Hirvonen JJ, Kaukoranta SS. Comparison of FecalSwab and ESwab devices for storage and transportation of diarrheagenic bacteria. J Clin Microbiol. 2014; 52: 2334–9.
7. Eddabra R, Piémont Y, Scheftel JM. Evaluation of a new chromogenic medium, chromID™ Vibrio, for the isolation and presumptive identification of Vibrio cholerae and Vibrio parahaemolyticus from human clinical specimens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011; 30: 733–7.
8. Renaud N, Lecci L, Courcol RJ, et al. CHROMagar Yersinia, a new chromogenic agar for screening of potentially pathogenic Yersinia enterocolitica isolates in stools. J Clin Microbiol. 2013; 51: 1184–7.
9. Church DL, Emshey D, Semeniuk H, et al. Evaluation of BBL CHROMagar O157 versus Sorbitol-MacConkey medium for routine detection of Escherichia coli O157 in a centralized regional clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol. 2007; 45: 3098–100.
10. Church DL, Emshey D, Lloyd T, et al. Clinical and economic evaluation of BBLTM CHROMagarTM Salmonella (CHROMSal) versus subculture after selenite broth enrichment to CHROMSal and Hektoen enteric agars to detect enteric Salmonella in a large regional microbiology laboratory. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010; 68: 13–9.
11. Gouali M, Ruckly C, Carle I, et al. Evaluation of CHROMagar STEC and STEC O104 chromogenic agar media for detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli in stool specimens. J Clin Microbiol. 2013; 51: 894–900.
12. Luk S, To WK, Ng TK, et al. A cost-effective approach for detection of toxigenic Clostridium difficile: toxigenic culture using ChromID Clostridium difficile agar. J Clin Microbiol. 2014; 52: 671–3.
13. Perez JM, Cavalli P, Roure C, et al. Comparison of four chromogenic media and Hektoen agar for detection and presumptive identification of Salmonella strains in human stools. J Clin Microbiol. 2003; 41: 1130–4.
14. Karhukorpi J, Paivanurmi M. Differentiation of Yersinia enterocolitica biotype 1A from pathogenic Yersinia enterocolitica biotypes by detection of beta-glucosidase activity: comparison of two chromogenic culture media and Vitek2. J Med Microbiol. 2013; 63: 34–7.
15. Humphries RM, Uslan DZ, Rubin Z. Performance of Clostridium difficile toxin enzyme immunoassay and nucleic acid amplification tests stratified by patient disease severity. J Clin Microbiol. 2013; 51: 869–73.
16. Chui L, Patterson-Fortin L, Kuo J, et al. Evaluation of enzyme immunoassays and real-time PCR for detecting Shiga toxin-producing Escherichia coli in Southern Alberta, Canada. J Clin Microbiol. 2015; 53: 1019–23.
17. Giltner CL, Saeki S, Bobenchik AM, et al. Rapid detection of Campylobacter antigen by enzyme immunoassay leads to increased positivity rates. J Clin Microbiol. 2013; 51: 618–20.
18. Gastroenteritis and Diarrhoea [internet]. London: Public Health England. UK Standards for Microbiology Investigations [citirano 2015 Sep 30]. Dosegljivo na: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/344110/S_7i1.pdf
19. Gray J, Coupland LJ. The increasing application of multiplex nucleic acid detection tests to the diagnosis of syndromic infections. Epidemiol Infect. 2013; 142: 1–11.
20. Drancourt M. Multiplex testing of diarrhoea breaks down microbial barriers. Lancet Infect Dis. 2014; 14: 663–4.
21. de Boer RF, Ott A, Kesztyus B, et al. Improved detection of five major gastrointestinal pathogens by use of a molecular screening approach. J Clin Microbiol. 2010; 48: 4140–6.
22. Cunningham SA, Sloan LM, Nyre LM, et al. Three-hour molecular detection of Campylobacter, Salmonella, Yersinia, and Shigella species in feces with accuracy as high as that of culture. J Clin Microbiol. 2010; 48: 2929–33.

23. Buchan BW, Olson WJ, Pezewski M, et al. Clinical evaluation of a real-time PCR assay for identification of Salmonella, Shigella, Campylobacter (Campylobacter jejuni and C. coli), and Shiga toxin-producing Escherichia coli isolates in stool specimens. J Clin Microbiol. 2013; 51: 4001–7.
24. Spina A, Kerr KG, Cormican M, et al. Spectrum of enteropathogens detected by the FilmArray GI Panel in a multicentre study of community-acquired gastroenteritis. Clin Microbiol and Infect. 2015; 21: 719–28.
25. Hu J, Torres AG. Enteropathogenic Escherichia coli: foe or innocent bystander? New Microb Infect. 2015; 21: 729–34.
26. Hebbelstrup Jensen B, Olsen KEP, Struve C, et al. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative Escherichia coli. Clin Microbiol Rev. 2014; 27: 614–30.
27. Huovinen E, Sihvonen LM, Virtanen MJ, et al. Symptoms and sources of Yersinia enterocolitica-infection: a case-control study. BMC Infect Dis. 2010; 10: 122.
28. Liu J, Kabir F, Manneh J, et al. Development and assessment of molecular diagnostic tests for 15 enteropathogens causing childhood diarrhoea: a multicentre study. Lancet Infect Dis. 2014; 14: 716–24.
29. Štrumbelj I, Berce I, Harlander T, et al. Pregled občutljivosti bakterij za antibiotike - Slovenija 2013 [internet]. 1st ed. Ljubljana: Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ); 2014 [citirano 2015 Oct 23]. Dosegljivo na: http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz
30. Allerberger F. Acute diarrhoea: new perspectives. New Microb Infect. 2015; 21: 717–8.

Andrej Steyer[1*], Tina Naglič[2], Marko Kolenc[3], Martin Sagadin[4], Mateja Poljšak-Prijatelj[5]

Novosti na področju virusnih okužb prebavil

Novelties in Gastrointestinal Viral Infections

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: virusni gastroenteritis, diagnostika, epidemiologija, molekularne metode, rotavirusno cepivo, rotavirusi, norovirusi, astrovirusi, enteritični adenovirusi

V prispevku bomo osvetlili novosti na področju virusnih gastroenteritisov. Predstavili bomo povzetek najnovejših spoznanj na področju patogeneze in epidemiologije enteričnih virusov ter podali kritičen pogled na diagnostične postopke, ki so trenutno v uporabi. Znani virusni predstavniki, rotavirusi, norovirusi in astrovirusi, so pomembni predvsem zaradi svoje raznovrstnosti, ki se odraža tako na genomskem kot na antigenskem nivoju, kar ima posledično lahko vpliv na patogenezo in epidemiologijo. Hkrati jih zaradi specifičnih molekularnih in antigenskih metod zlahka zgrešimo v diagnostičnem postopku. Epidemiološko spremljanje enteričnih virusov je osnova za razvoj dobrih diagnostičnih testov. Najboljše orodje za odkrivanje novih ali raznolikosti znanih virusov je metagenomski pristop z naslednjo generacijo sekvenciranja, a je potrebno, predvsem na novo odkrite viruse, opredeliti še v kliničnem pomenu. Posebno pozornost je potrebno posvetiti molekularnim diagnostičnim postopkom, saj zaradi njihove visoke občutljivosti zajemamo tudi asimptomatske okužbe. Za opredelitev le-teh je vsaj za viruse pomembna ocena koncentracije v vzorcu in sindromski pristop v diagnostiki gastroenteritisov. Na področju epidemiologije smo največjo spremembo spremljali po uvedbi uspešnih rotavirusnih cepiv, saj so v državah z visoko precepljenostjo zabeležili močan padec zbolevnosti in hospitalizacije. Slabšo učinkovitost so ugotovili le na področju Afrike, vzrok katerega je drugačna fenotipska sestava populacije, vezana na antigene krvnih skupin.

ABSTRACT

KEY WORDS: viral gastroenteritis, diagnostics, epidemiology, molecular methods, rotavirus, norovirus, astrovirus, enteric adenovirus

In this paper, we present recent findings in the field of viral gastroenteritis, focusing on epidemiology, pathogenesis and a critical review of available microbiological diagnostic procedures. The most known enteric viruses, rotaviruses, noroviruses and astro-

[1*] Znanst. sod. dr. Andrej Steyer, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; andrej.steyer@mf.uni-lj.si

[2] Tina Naglič, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

[3] Marko Kolenc, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

[4] Martin Sagadin, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

[5] Asist. strok. svet. dr. Mateja Poljšak-Prijatelj, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

viruses, are important for their genomic variability which is reflected also at the antigenic level. This consequently may influence viral pathogenesis, epidemiology; due to specific molecular methods in diagnostics procedures false negative results can be common. Thus, epidemiological studies are needed for tracing variable enteric viruses and to upgrade viral diagnostics methods. The best possible tool to detect new or already known but genetically variable viruses is metagenomic approach with next generation sequencing, however, the clinical importance of the newly discovered viruses should be evaluated as well. In viral gastroenteritis diagnostics, the results obtained with molecular methods should be interpreted with care because the methods with high sensitivity can also detect viruses causing asymptomatic infections. An estimated virus concentration in stool sample and syndromic approach are important for predicting clinically important findings for the detected viruses. The most extensive change in the epidemiology of enteric infections happened after the introduction of effective rotavirus vaccines. A significant decrease of rotavirus diarrhea cases and hospitalization for rotavirus disease was recorded in countries with high vaccination coverage. Low efficiency was noted only in the African region, which was most likely due to different population phenotype of histo-blood group antigens.

UVOD

Akutni gastroenteritis je pogosta bolezen, ki največkrat prizadene otroke vseh starosti, pa tudi odrasle v razvijajočih kot tudi razvitih državah. Pomen posameznih povzročiteljev se razlikuje glede na področje sveta, a povsod so virusi najpogostejši *(1)*. Med enteritičnimi virusi dokažemo najpogosteje rotaviruse, sledijo kalicivirusi (norovirusi in sapovirusi), črevesni adenovirusi in astrovirusi *(2)*. Poleg teh se v iztrebkih bolnih pojavljajo tudi koronavirusi, torovirusi, različni pikornavirusi, pikobirnavirusi, reovirusi, parvovirusi, anelovirusi *(3–8)*. Njihov pomen pri bolezni ni popolnoma razjasnjen. Virusni gastroenteritis se pojavlja v dveh epidemioloških vzorcih:

- endemični, sporadični obliki pri otrocih in
- epidemični obliki pri ljudeh vseh starosti.

Virusne driske pri otrocih povzročajo rotavirusi skupine A, norovirusi, črevesni adenovirusi in astrovirusi. Epidemično obliko bolezni povzročajo predvsem norovirusi, ki se pogosto prenašajo s fekalno onesnaženo hrano in vodo. Okužba prizadene ljudi vseh starosti. Zaradi velikega števila antigenskih različic, ki krožijo v naravi in kratkotrajne imunosti prihaja do ponavljajočih norovirusnih okužb v vseh starostnih obdobjih. V zadnjih letih so opisali dolgotrajno norovirusno izločanje pri bolnikih po presaditvi organov in krvotvornih matičnih celic *(9, 10)*. Predhodno zdravi ljudje norovirusno okužbo hitro prebolijo, toda pri bolnikih z drugo osnovno boleznijo, kot je srčno-žilna bolezen, bolnikih po presaditvi in prejemnikih imunosupresivne terapije se lahko stanje resno zaplete *(11)*. S sapovirusi povzročen gastroenteritis se po kliničnih znakih ne loči od tistega, povzočenega z norovirusi, je pa milejši in redko traja več kot tri dni *(12)*. Sporadične okužbe so značilne za mlajše otroke, izbruhi za ljudi vseh starosti *(13, 14)*. Pogosto je vir okužbe kontaminirano živilo in voda *(15)*.

Črevesni adenovirusi vrste F, serotipa 40 in 41 povzročajo bistveno manj okužb kot rotavirusi. Pogosti so pri bolnikih z imunsko pomanjkljivostjo *(16)*.

Simptomatska okužba z astrovirusi se pojavlja predvsem pri mlajših otrocih, redkeje pri starostnikih *(17, 18)*. Od vseh akutnih virusnih okužb pri otrocih, odpade na astroviruse le 2–9 % *(19)*.

Od naštetih virusnih povzročiteljev je okužba z rotavirusi najresnejša. Klinični znaki lahko trajajo več kot 7 dni, 10–12 odvajanj iztrebka dnevno lahko povzroči hudo dehidracijo, zato je pogosto potrebna hospitalizacija bolnika *(20)*. V državah, kjer so uvedli rotavirusno cepivo v nacionalni cepilni program, so opazili znatno znižanje rotavirusnih okužb *(21)*.

Ozdravitev po okužbi z gastroenteritičnimi virusi ne povzroči dolgotrajne imunosti, zato lahko zbolimo večkrat v življenju.

NOVI ENTERITIČNI VIRUSI IN NJIHOV POMEN PRI GASTROENTERITISIH

V zadnjem desetletju so na področju enteritičnih virusov poročali o številnih novih virusih, ki bi jih lahko obravnavali kot potencialne patogene (kosavirusi, bufavirusi, tusavirusi) *(8, 22-24)*. Z metagenomsko analizo iztrebkov otrok z drisko so velikokrat dokazali bodisi komenzale ali pa redkejše povzročitelje drisk. Z dodatnimi prevalenčnimi študijami namreč niso potrdili njihove večje vloge pri gastroenteritisih. Vsekakor pa tovrstna odkritja doprinesejo veliko novih podatkov o evolucijski dinamiki določene širše skupine virusov ali njihovem zoonotskem potencialu. V Sloveniji smo izvedli metagenomske analize iztrebkov otrok z drisko, pri katerih etiologije s širokim naborom molekuarnih testov za dokaz enteritičnih patogenov nismo uspeli pojasniti. Tako smo od 38 testiranih vzorcev enterične viruse dokazali pri 16 (42,1 %). Večinoma so bili to znani povzročitelji (norovirusi, sapovirusi, astrovirusi), ki smo jih zgrešili z našimi metodami. Dokazali smo tudi potencialne povzročitelje drisk, npr. parehoviruse, enteroviruse, a le v enem vzorcu novega predstavnika vrste pikobirnavirusov *(25)*. Pikobirnavirusi so zelo razširjeni enteritični virusi, ki pa vsaj po dosedanjih podatki ne predstavljajo večje vloge pri driskah imunsko kompetentnih oseb *(26)*. Raziskovanje teh virusov je zanimivo predvsem zaradi razjasnitve virusne evolucije in zoonotskega potenciala.

Pred kratkim smo v Sloveniji prvič opisali primer okužbe otroka z nenavadnim reovirusom, ki ni podoben opisanim sesalskim reovirusom pri ljudeh, ampak reovirusom pri evropskih netopirjih *(27)*. Za opisan netopirski reovirus smo zaenkrat dokazali visoko prevalenco pri netopirjih v Sloveniji, a le minimalno vlogo patogena pri driskah med otroci.

Sporadične primere drisk, povzročenih z redkimi virusnimi predstavniki, je priporočeno kljub predvidoma nizkemu patogenemu potencialu pri ljudeh obravnavati previdno. S sindromskim pristopom diagnostike gastroenteritisa je potrebno preveriti sočasno okužbo z drugimi patogeni. Šele na tak način lahko prepoznamo njihov patogeni potencial. Pri spremljanju tovrstnih okužb moramo posebej obravnavati imunsko oslabljene osebe, pri katerih se okužba lahko odraža s popolnoma drugačno težo bolezni.

POJAVLJANJE NOVIH RAZLIČIC ZNANIH VIRUSNIH PREDSTAVNIKOV

Norovirusi

Za noroviruse, predstavnike družine *Caliciviridae*, je značilna velika raznolikost. To določa aminokislinsko zaporedje za glavno virusno beljakovino VP1, zaradi katere so virusi razporejeni v šest genskih skupin (GI do GVI) in več kot 40 genotipov *(28, 29)*. Raznolikost genotipov je posledica točkovnih mutacij in rekombinacij ter evolucijskega odgovora na selektivni pritisk človeškega imunskega sistema *(30)*. Najpogosteje okužbe pri ljudeh pov-

zročajo norovirusi GII (največkrat genotip GII.4), GI in zelo redko GIV. Norovirusna genska skupina GII se v 37–38 % nukleotidnega zaporedja razlikuje od prototipnega seva GI.1 Norwalk. Tudi znotraj GII.4 se aminokislinska zaporedja razlikujejo v 5–7 %, celo med samimi sevi so razlike v 2,8 %. Zaradi rekombinacij na mestu prekrivanja odprtega bralnega okvira ORF 1 in ORF 2 se približno na 3 leta pojavijo nove različice znotraj GII.4, ki sovpadajo z novimi epidemijami norovirusnega gastroenteritisa *(31)*. V zadnjih dvajsetih letih je krožilo devet variant GII.4:

- GII.4-1996 (Grimsby),
- GII.4-2002 (Farmington Hills),
- GII.4-2004 (Hunter),
- GII.4-2006a (Laurens),
- GII.4-2006b (Minerva),
- GII.4-2008a (OC07138/Jap), 2008b (Appledorm),
- GII.4-2010 (New Orleans) in
- GII.4-2012 (Sidney) *(32)*.

Spreminjale so se tudi vezavne lastnosti virusov GII.4 na receptorje v črevesju, posledica česar je večja dovzetnost gostiteljske populacije. Pozimi 2014/15 je epidemijo v Aziji povzročil nov sev GII.17-2014 (Kawasaki), ki se je sporadično pojavljal že 13 let in zamenjal genotip GII.4-2012 (Sidney) *(33)*. Sporadično so te viruse določili tudi v Ameriki, Avstraliji, Novi Zelandiji, Franciji, Italiji, na Nizozemskem, pojavil pa se je tudi v Sloveniji *(34)*.

Astrovirusi

Z metagenomskim pristopom so iz iztrebkov bolnikov z nepojasnjenim gastroenteritisom dokazali nove astroviruse, ki niso sorodni znanim osmim serotipom človeških astrovirusov (angl. *human astrovirus*, HAstV), danes imenovanih klasični HAstV *(35)*. Prve neklasične astroviruse so dokazali v iztrebku otroka leta 2008 v Avstraliji ter jih poimenovali HAstV-MLB. Sorodne seve so našli še drugod po svetu, tudi v Evropi – MLB1, MLB2 MLB3 *(36)*. Naslednje leto so odkrili novo skupino HAstV-VA v Virginiji, ZDA, ter HAstV-HMO (angl. *human, mink, ovine-like astroviruses*) v Nigeriji, Pakistanu in Nepalu, toda do sedaj jih v Evropi še niso dokazali *(5, 37)*. S serološkimi študijami v ZDA so potrdili visoko prevalenco virusov HAstV-HMO. Viruse so osamili pri bolniku s celiakijo; izven črevesni razsoj v živčnem tkivu so potrdili tudi pri otroku z imunsko pomanjkljivostjo in encefalitisom *(38, 39, 40)*. Viruse HastV-MLB so našli tudi v nosnem žrelu in plazmi bolnikov, tako da verjetno niso omejeni le na gastrointestinalni trakt in bo njihovo vlogo pri okužbah prebavil potrebno še razjasniti *(41)*.

Rotavirusi

Rotavirusi skupine A so glavni povzročitelji virusnih gastroenteritisov pri otrocih do petega leta starosti. Ocenjujejo, da rotaviroze letno povzročijo 453.000 smrti, 2,4 milijonov hospitalizacij, 24 milijonov obiskov pri zdravniku in 114 milijonov primerov, prebolelih v domači oskrbi *(42)*. Rotaviruse označuje njihova velika genetska variabilnost. Rezultati raziskav določanja genotipov po svetu kažejo, da se pri ljudeh najpogosteje pojavlja genotip G1P[8]. Najpogostejši je v Ameriki (43 %), Evropi (33 %) in zahodnem Pacifiku (47 %). Pogosto se v Evropi pojavlja tudi genotip G4P[8] (23 %), v zahodnem Pacifiku pa G3P[8] (25 %). V vzhodnem Mediteranu ima prevladujočo vlogo genotip G2P[4] (41 %) in ostali redki genotipi (31 %). Za Afriko in jugovzhodno Azijo so značilni netipični rotavirusni genotipi, kot so G2P[6], G3P[6], G12P[8], G12P[6] in G9P[6], ki v Afriki predstavljajo 35 %, v jugovzhodni Aziji pa kar v 55 % opisanih sevov *(43)*.

V Sloveniji se najpogosteje pojavljajo genotipi G1P[8], G2P[4], G4P[8] ter G9P[8]. Opažamo pa veliko razliko v pojavljanju genotipov v posameznih sezonah

(44). V sezoni 2013/14 je bil najpogostejši genotip G2P[4] (37 %), sledila sta mu G1P[8] (30 %) in G4P[8] (22 %) *(25)*. V sezoni 2014/15 je bil najpogostejši genotip G1P[8] (78 %), ostale genotipe smo dokazali v manj kot 10 %.

Znano je, da se veliko novih različic in rotavirusnih genotipov prenese medvrstno, z živali na človeka *(45)*. Redko opazimo zoonotski prenos virusnega seva, ki bi dolgoročno pri ljudeh povzročal pogoste okužbe. V zadnjih dvajsetih letih smo zabeležili dva takšna primera zoonotskih rotavirusov, genotipa G9 in G12, a sta postala pomembna patogena pri ljudeh šele po večjih genomskih spremembah *(46, 47)*.

KAJ JE NA PODROČJU GASTROENTERITISOV SPREMENILO ROTAVIRUSNO CEPIVO IN KAKŠNI SO OBETI?

Doslej je največjo spremembo na področju pojavljanja virusnih okužb prebavil povzročila uporaba dveh uspešnih cepiv proti rotavirusnim okužbam. Monovalentno cepivo Rotarix® (Glaxo-Smith Kline, Brentford, Velika Britanija) in petvalentno cepivo RotaTeq (Merck Sharp&Dohme, New Jersey, ZDA) sta upravičila evforične napovedi iz kliničnih študij, da bosta uspešno zaščitili pred rotavirusnimi driskami. Takrat so napovedovali 84,8–94,5 % učinkovito zaščito pred hujšimi oblikami bolezni *(48, 49)*. V osmih letih po pridobitvi licence in uvedbi obširne imunizacije v nekaterih državah, smo lahko v literaturi za obe cepivi zasledili veliko podatkov o učinkovitosti. V Evropi, Severni in Južni Ameriki ter Avstraliji cepivo dosega pričakovano visoko učinkovitost *(50)*. Pri spremljanju učinkovitosti cepiva v Afriki in nekaterih azijskih državah pa opažajo negativen odklon, kar bi lahko pripisali številnim dejavnikom *(51)*. Najbolj verjeten in zanimiv je povezan z antigeni krvnih skupin (angl. *histo-blood group antigens*, HBGAs) in izražanjem teh antigenov na sluznicah, saj je učinkovita vezava na te antigene odvisna od rotavirusnega genotipa *(52)*. Fenotip krvnih skupin se razlikuje med etničnimi skupinami. Primer je antigen Lewis, ki ga izraža le 4–6 % belopoltih, medtem ko so ta fenotip dokazali v več kot 30 % populacije v Afriki in Latinski Ameriki. Omenjeni fenotip je najverjetnejši vzrok za različen genotipski profil rotavirusov in nizko učinkovitost rotavirusnega cepiva na tem geografskem področju *(52)*.

Po večletni uporabi cepiva in spremljanju uspešnosti lahko iz različnih raziskav zaključimo naslednje:

1. Cepivo je varno, saj ni dokazane vzročne povezave s pogostejšimi zapleti po cepljenju otrok *(53, 54)*.
2. Cepivo nudi učinkovito zaščito pred težjo obliko rotavirusne driske (68–98 %) in zmanjša število hospitalizacij za 65–84 % *(50, 55)*.
3. V raziskavah učinkovitosti zaščite z rotavirusnim cepivom so ocenili 22–24,9 % učinek čredne zaščite *(56)*.
4. Čeprav so rotavirusi genetsko in antigensko zelo raznoliki, uporaba cepiva in visoka precepljenost za zdaj nista povzročila s selekcijskim pritiskom povzročene osamitve rotavirusnega seva, ki bi lahko povzročal okužbo in bolezni pri precepljenih otrocih *(57)*.
5. Po cepljenju traja imunska zaščita vsaj prvi dve leti *(58)*.

Z rotavirusnim cepivom smo dobili močno orožje v boju z najpogostejšim povzročiteljem hudih drisk pri otrocih. Po podatkih raziskave primerov in kontrol med hospitaliziranimi otroci do šestega leta starosti v Sloveniji so rotavirusi povzročitelji drisk pri 55,6 %, norovirusi pa pri 17,8 % primerov *(25)*. Po uvedbi rotavirusnega cepiva se v državah z visoko precepljenostjo ob absolutnem znižanju primerov drisk na prvo mesto po prevalenci enteritičnih patogenov uvrščajo prav norovirusi *(59, 60)*. Znano je še, da so noro-

virusi pomembni povzročitelji drisk tako pri otrocih kot pri odraslih in jih povezujejo s številnimi izbruhi drisk, tudi v povezavi s hrano in vodo *(61, 62)*. Z uspešnim cepivom proti obema patogenoma bi uspeli bistveno zmanjšati težo te nalezljive bolezni, ki v državi predstavlja veliko neposredno in posredno finančno breme. Zato ni presenetljivo, da so v razvoju tudi že cepiva proti norovirusnim okužbam *(63)*. Zanimiv pristop k boju proti glavnima virusnima povzročiteljema drisk so predstavili finski raziskovalci, ki so že izdelali primer kombiniranega mrtvega cepiva proti rotavirusom in norovirusom *(64)*. Začetne faze preizkušanja so v teku.

V Sloveniji smo po podatkih Nacionalnega inštituta za javno zdravje (NIJZ) do danes zabeležili najvišjo precepljenost novorojenčkov v letu 2009, ko je znašala 26,94 %, kar je premalo, da bi lahko opazili trende zmanjševanja obolevnosti ali hospitalizacije. Po uradnih podatkih NIJZ smo med leti 2008 in 2013 zabeležili nekoliko nižjo incidenco hospitalizacije in obolevnosti zaradi rotavirusnih okužb, a za zdaj oprijemljivih dokazov o učinkih cepljenja ni *(44)*. Cepivo je v Sloveniji na voljo v samoplačniški obliki, kar je verjetno eden od dejavnikov nizke precepljenosti.

TEŽAVE PRI DIAGNOSTIKI VIRUSNIH POVZROČITELJEV GASTROENTERITISOV

Po podatkih iz literature se je z uvedbo molekularnih metod za dokaz virusnih povzročiteljev drisk delež etiološko nepojasnjenih primerov znatno zmanjšal. Vsekakor je potrebno podatke pregledati kritično in ugotoviti, ali je dokaz nekega potencialnega virusnega patogena v iztrebku dovolj za opredelitev povzročitelja driske. Dilema glede pomena dokazane virusne nukleinske kisline v iztrebku je postala večja z vpeljevanjem občutljivih molekularnih metod in množico raziskav z metagenomskimi pristopi, s katerimi so poročali o morebitnih novih patogenih *(8, 23, 24)*. V raziskavi primerov in kontrol smo z molekularnimi metodami pri hospitaliziranih otrocih z drisko dokazali viruse v 82,5 % primerih, kar 43,7 % od teh je bilo v sočasni okužbi z vsaj enim dodatnim virusnim, bakterijskim ali parazitskim patogenom. Dodatno smo virusne patogene razmeroma pogosto dokazali tudi pri kontrolni skupini (15,9 %), najpogosteje noroviruse, sapoviruse in parehoviruse *(25)*. Skladno z našimi podatki so tudi v drugih raziskavah ugotovili relativno velik delež asimptomatskih okužb z enteritičnimi virusi, kar v diagnostiki predstavlja dodatno težavo. Pomembno vlogo pri pravilni opredelitvi etiološke vloge različnih virusov, dokazanih v vzorcu bolnika, ima kazalnik koncentracije dokazanega virusa *(65)*. Z molekularnimi metodami, verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. *real time polymerase chain reaction*, RT-PCR), lahko do neke mere ta kazalnik izrazimo z vrednostjo mejnega cikla (angl. *cycle of treshold*, Ct), točko v reakciji pomnoževanja nukleinske kisline, ko zaznamo signal pomnoževanja naše tarče. V nekaterih raziskavah so že ovrednotili mejne vrednosti Ct, pri kateri se dokaz rotavirusov in norovirusov upošteva kot pomemben pri etiološki opredelitvi driske. Za rotavirus je ta meja blizu meje detekcije encimsko-imunskih testov (vrednost Ct 25), pri norovirusih pa je ta meja višja (vrednost Ct 30-31) *(66, 67)*. Zato za rotaviruse iz skupine A kot najprimernejši test za dokazovanje akutnih okužb predlagajo kar encimsko-imunski test (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), saj lahko s preobčutljivo molekularno metodo zajamemo veliko asimptomatskih okužb. Pri norovirusih je ta meja višja, zato se ob zavedanju mejne vrednosti Ct za opredelitev vloge patogena v akutni okužbi kot najprimernejša uporablja molekularna

metoda. V kolikor se za diagnostiko enteritičnih virusov uporabljajo molekularne metode, je zelo pomembno, da imamo vpogled v celoten potek reakcije in analizo pomnoženega signala tarče, saj lahko le na tak način presodimo o analitični, in v dobri komunikaciji s kliniki, tudi klinični vrednosti našega rezultata. Zaprti komercialni sistemi molekularnega dokazovanja širokih naborov enteritičnih patogenov so v tem kontekstu lahko močno zavajajoči in ob pomanjkanju informacij o poteku reakcije in analizi dobljenih signalov dobimo analitični del rezultata, ki pa v kliničnem kontekstu nima vrednosti.

Kljub uporabnosti zanesljivih in občutljivih molekularnih metod je pri spremljanju in pojasnjevanju virusnih gastroenteritisov, predvsem pri izbruhih, pomembna elektronska mikroskopija (EM). Metoda je v preteklosti pustila pečat na mejniku v diagnostični virologiji, tudi na področju gastroenteritisov. Glavni virusni povzročitelji drisk, norovirusi in rotavirusi, ki še danes veljajo za najpomembnejše, so bili odkriti prav s to metodo *(68, 69)*. Prednost EM je v možnosti hitre diagnostike pri okužbah bolnikov z akutnim virusnim gastroenteritisom, ko se v vzorcu bolnika izloča veliko število virusnih delcev (10^6 delcev/mL), predvsem pri akutnih okužbah z rotavirusi. EM nam omogoča »odprti pogled« in s tem določitev drugih virusnih povzročiteljev v vzorcih bolnikov, ki jih z molekularnimi metodami in antigenskimi testi lahko zgrešimo *(27)*. Je edina metoda, kjer virusnega povzročitelja opredelimo neposredno na podlagi morfoloških značilnosti, zato so lažno pozitivni rezultati izjemno redki. Slabost EM je poleg nizke občutljivosti tudi v tem, da za izvajanje diagnostike potrebujemo drago opremo in izkušenega mikroskopista z znanjem o virusni morfologiji.

Pri imunokromatskih testih je potrebna velika previdnost pri njihovi uporabi, saj najpogosteje ne dosegajo dovolj visoke občutljivosti za primerno diagnostiko, hkrati pa pri nekaterih testih opažamo nizko specifičnost *(70, 71)*.

ZAKLJUČEK

Glavni izziv na področju virusnih okužb prebavil je vzpostaviti pravilen sistem dokazovanja in interpretacije rezultatov. Sindromski pristop je nujen za pravilno in učinkovito mikrobiološko diagnostiko in mora biti podprt z epidemiološkimi raziskavami o variabilnosti, spreminjanju virusov in pojavom morebitnih novih patogenov.

Z razvojem novih molekularnih metod je na področju diagnostike virusnih gastroenteritisov delež etiološko nepojasnjenih gastroenteritisov močno upadel. Hkrati smo priča povečevanju deleža mešanih okužb, saj zaradi visoke občutljivosti uporabljenih metod dokažemo tudi prisotne patogene v nizkih koncentracijah, ki ne vplivajo nujno na težo bolezni v danem trenutku. Opredeljevanje pomena specifičnih patogenov v mešanih okužbah pri gastroenteritisih je izjemno težko, a vsaj za virusne povzročitelje lahko na podlagi relativno ocenjene koncentracije ugotovimo, kakšen pomen ima v akutni fazi bolezni.

Kljub uvedbi rotavirusnega cepiva, ki v državah z visoko precepljenostjo bistveno zmanjša število drisk pri otrocih, ni zaznati novih virusnih povzročiteljev, ki bi tako kot rotavirusi prevzeli vodilno vlogo med povzročitelji gastroenteritisov. V bodoče bo pomembno spremljanje redkih virusnih povzročiteljev, tudi zoonotskih, ki bi lahko povzročili izbruhe ali predstavljali težavo pri imunsko oslabljenih osebah.

LITERATURA

1. Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, et al. Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children < 5 Years of Age: A Systematic Review. PLoS One. 2013; 8.
2. Glass RI, Bresee J, Jiang B, et al. Gastroenteritis viruses: an overview. Novartis Foundation symposium. 2001; 238: 5–19; discussion-25.
3. Caul EO, Paver WK, Clarke SK. Letter: Coronavirus particles in faeces from patients with gastroenteritis. Lancet. 1975; 1: 1192.
4. Lodha A, de Silva N, Petric M, et al. Human torovirus: a new virus associated with neonatal necrotizing enterocolitis. Acta Paediatr. 2005; 94: 1085–8.
5. Kapoor A, Li L, Victoria J, et al. Multiple novel astrovirus species in human stool. J Gen Virol. 2009; 90: 2965–72.
6. Reuter G, Boros A, Pankovics P. Kobuviruses – a comprehensive review. Rev Med Virol. 2011; 21: 32–41.
7. Castrignano SB, Nagasse-Sugahara TK, Kisielius JJ, et al. Two novel circo-like viruses detected in human feces: complete genome sequencing and electron microscopy analysis. Virus Res. 2013; 178: 364–73.
8. Smits SL, Schapendonk CM, van Beek J, et al. New viruses in idiopathic human diarrhea cases, the Netherlands. Emerg Infect Dis. 2014; 20: 1218–22.
9. Poljšak-Prijatelj M, Kolenc M, Furar Š, et al. Chronic norovirus infection in renal transplant recipients. XV International Congress of Virology IUMS; 2011 Sep 11–16; Sapporo, Japan.
10. Steyer A, Sagadin M, Kolenc M, et al. Quantitative detection and dynamic of norovirus excretion in immunocompromised patients with chronic norovirus infections. 2011 Sep 21–24; 14th Annual Meeting of the European Society of Clinical Virology ESCV; Funchal, Madeira.
11. Roddie C, Paul JP, Benjamin R, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and norovirus gastroenteritis: a previously unrecognized cause of morbidity. Clin Infect Dis. 2009; 49: 1061–8.
12. Pang XL, Honma S, Nakata S, et al. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. J Infect Dis. 2000; 181 Suppl 2: S288–94.
13. Pang XL, Preiksaitis JK, Lee BE. Enhanced enteric virus detection in sporadic gastroenteritis using a multi-target real-time PCR panel: a one-year study. J Med Virol. 2014; 86: 1594–601.
14. Hansman GS, Saito H, Shibata C, et al. Outbreak of gastroenteritis due to sapovirus. J Clin Microbiol. 2007; 45: 1347–9.
15. Gallimore CI, Pipkin C, Shrimpton H, et al. Detection of multiple enteric virus strains within a foodborne outbreak of gastroenteritis: an indication of the source of contamination. Epidemiol Infect. 2005; 133: 41–7.
16. Hierholzer JC. Adenoviruses in the immunocompromised host. Clin Microbiol Rev. 1992; 5: 262–74.
17. Moser LA, Schultz-Cherry S. Pathogenesis of astrovirus infection. Viral Immunol. 2005; 18: 4–10.
18. Gray JJ, Wreghitt TG, Cubitt WD, et al. An outbreak of gastroenteritis in a home for the elderly associated with astrovirus type 1 and human calicivirus. J Med Virol. 1987; 23: 377–81.
19. De Benedictis P, Schultz-Cherry S, Burnham A, et al. Astrovirus infections in humans and animals – molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. Infect Genet Evol. 2011; 11: 1529–44.
20. Bernstein DI. Rotavirus overview. Pediatr Infect Dis J. 2009; 28: S50–3.
21. Curns AT, Steiner CA, Barrett M, et al. Reduction in acute gastroenteritis hospitalizations among US children after introduction of rotavirus vaccine: analysis of hospital discharge data from 18 US states. J Infect Dis. 2010; 201: 1617–24.
22. Li L, Victoria J, Kapoor A, et al. A novel picornavirus associated with gastroenteritis. J Virol. 2009; 83: 12002–6.
23. Phan TG, Sdiri-Loulizi K, Aouni M, et al. New parvovirus in child with unexplained diarrhea, Tunisia. Emerg Infect Dis. 2014; 20: 1911–3.
24. Phan TG, Vo NP, Bonkoungou IJ, et al. Acute diarrhea in West African children: diverse enteric viruses and a novel parvovirus genus. J Virol. 2012; 86: 11024–30.
25. Steyer A, Jevšnik M, Uršič T, et al. Rotaviruses in hospitalised children with diarrhoea in Slovenia – still the leading cause. 2015 May 17–20; Sixth European Rotavirus Biology Meeting; Dijon, France. p. 39
26. Ganesh B, Banyai K, Martella V, et al. Picobirnavirus infections: viral persistence and zoonotic potential. Rev Med Virol. 2012; 22: 245–56.
27. Steyer A, Gutierrez-Aguire I, Kolenc M, et al. High similarity of novel orthoreovirus detected in a child hospitalized with acute gastroenteritis to Mammalian orthoreoviruses found in bats in europe. Journal of Clinical Microbiology. 2013; 51: 3818–25.

28. Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. Virology. 2006; 346: 312–23.
29. Donaldson EF, Lindesmith LC, Lobue AD, et al. Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. Nat Rev Microbiol. 2010; 8: 231–41.
30. Lindesmith LC, Beltramello M, Donaldson EF, et al. Immunogenetic mechanisms driving norovirus GII.4 antigenic variation. PLoS Pathog. 2012; 8: e1002705.
31. Eden JS, Tanaka MM, Boni MF, et al. Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. J Virol. 2013; 87: 6270–82.
32. Dai YC, Zhang XF, Xia M, et al. Antigenic Relatedness of Norovirus GII.4 Variants Determined by Human Challenge Sera. PLoS One. 2015; 10: e0124945.
33. Matsushima Y, Ishikawa M, Shimizu T, et al. Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. Euro Surveill. 2015; 20.
34. de Graaf M, van Beek J, Vennema H, et al. Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 era? Euro Surveill. 2015; 20.
35. Finkbeiner SR, Allred AF, Tarr PI, et al. Metagenomic analysis of human diarrhea: viral detection and discovery. PLoS Pathog. 2008; 4: e1000011.
36. Finkbeiner SR, Holtz LR, Jiang Y, et al. Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses. Virol J. 2009; 6:161.
37. Finkbeiner SR, Li Y, Ruone S, et al. Identification of a novel astrovirus (astrovirus VA1) associated with an outbreak of acute gastroenteritis. J Virol. 2009; 83: 10836–9.
38. Burbelo PD, Ching KH, Esper F, et al. Serological studies confirm the novel astrovirus HMOAstV-C as a highly prevalent human infectious agent. PLoS One. 2011; 6: e22576.
39. Smits SL, van Leeuwen M, van der Eijk AA, et al. Human astrovirus infection in a patient with new-onset celiac disease. J Clin Microbiol. 2010; 48: 3416–8.
40. Quan PL, Wagner TA, Briese T, et al. Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. Emerg Infect Dis. 2010; 16: 918–25.
41. Holtz LR, Wylie KM, Sodergren E, et al. Astrovirus MLB2 viremia in febrile child. Emerg Infect Dis. 2011; 17: 2050–2.
42. Dennehy PH. Rotavirus Infection: A Disease of the Past? Infectious disease clinics of North America. 2015.
43. Jain S, Vashistt J, Changotra H. Rotaviruses: is their surveillance needed? Vaccine. 2014; 32: 3367–78.
44. Steyer A, Sagadin M, Kolenc M, et al. Molecular characterization of rotavirus strains from pre- and post-vaccination periods in a country with low vaccination coverage: the case of Slovenia. Infect Genet Evol. 2014; 28: 413–25.
45. Cook N, Bridger J, Kendall K, et al. The zoonotic potential of rotavirus. J Infect. 2004; 48: 289–302.
46. Rahman M, Matthijnssens J, Yang X, et al. Evolutionary history and global spread of the emerging g12 human rotaviruses. J Virol. 2007; 81: 2382–90.
47. Ramachandran M, Kirkwood CD, Unicomb L, et al. Molecular characterization of serotype G9 rotavirus strains from a global collection. Virology. 2000; 278: 436–44.
48. Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, et al. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. N Engl J Med. 2006; 354: 23–33.
49. Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR, et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. N Engl J Med. 2006; 354: 11–22.
50. Tate JE, Parashar UD. Rotavirus vaccines in routine use. Clin Infect Dis. 2014; 59: 1291–301.
51. Clarke E, Desselberger U. Correlates of protection against human rotavirus disease and the factors influencing protection in low-income settings. Mucosal Immunol. 2015; 8: 1–17.
52. Nordgren J, Sharma S, Bucardo F, et al. Both lewis and secretor status mediate susceptibility to rotavirus infections in a rotavirus genotype-dependent manner. Clin Infect Dis. 2014; 59: 1567–73.
53. Parashar UD, Cortese MM, Payne DC, et al. Value of post-licensure data on benefits and risks of vaccination to inform vaccine policy: The example of rotavirus vaccines. Vaccine. 2015.
54. Vazquez M. Safety of second-generation rotavirus vaccines, intussusception. Curr Opin Pediatr. 2014; 26: 101–5.

55. Karafillakis E, Hassounah S, Atchison C. Effectiveness and impact of rotavirus vaccines in Europe, 2006–2014. Vaccine. 2015; 33: 2097–107.
56. Pollard SL, Malpica-Llanos T, Friberg IK, et al. Estimating the herd immunity effect of rotavirus vaccine. Vaccine. 2015; 33: 3795–800.
57. Bucardo F, Nordgren J. Impact of vaccination on the molecular epidemiology and evolution of group A rotaviruses in Latin America and factors affecting vaccine efficacy. Infect Genet Evol. 2015; 34: 106–13.
58. Cortese MM, Immergluck LC, Held M, et al. Effectiveness of monovalent and pentavalent rotavirus vaccine. Pediatrics. 2013; 132: e25–33.
59. Hemming M, Rasanen S, Huhti L, et al. Major reduction of rotavirus, but not norovirus, gastroenteritis in children seen in hospital after the introduction of RotaTeq vaccine into the National Immunization Programme in Finland. Eur J Pediatr. 2013; 172: 739–46.
60. Bucardo F, Reyes Y, Svensson L, et al. Predominance of norovirus and sapovirus in Nicaragua after implementation of universal rotavirus vaccination. PLoS One. 2014; 9: e98201.
61. Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2014; 14: 725–30.
62. Belliot G, Lopman BA, Ambert-Balay K, et al. The burden of norovirus gastroenteritis: an important foodborne and healthcare-related infection. Clin Microbiol Infect. 2014; 20: 724–30.
63. Lindesmith LC, Ferris MT, Mullan CW, et al. Broad blockade antibody responses in human volunteers after immunization with a multivalent norovirus VLP candidate vaccine: immunological analyses from a phase I clinical trial. PLoS Med. 2015; 12: e1001807.
64. Tamminen K, Lappalainen S, Huhti L, et al. Trivalent combination vaccine induces broad heterologous immune responses to norovirus and rotavirus in mice. PLoS One. 2013; 8: e70409.
65. Platts-Mills JA, Liu J, Houpt ER. New concepts in diagnostics for infectious diarrhea. Mucosal Immunol. 2013; 6: 876–85.
66. Phillips G, Lopman B, Tam CC, et al. Diagnosing norovirus-associated infectious intestinal disease using viral load. BMC Infect Dis. 2009; 9: 63.
67. Phillips G, Lopman B, Tam CC, et al. Diagnosing rotavirus A associated IID: Using ELISA to identify a cut-off for real time RT-PCR. J Clin Virol. 2009; 44: 242–5.
68. Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. J Virol. 1972; 10: 1075–81.
69. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, et al. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. Lancet. 1973; 2: 1281–3.
70. Vyas K, Atkinson C, Clark DA, et al. Comparison of five commercially available immunochromatographic tests for the detection of norovirus in faecal specimens. J Hosp Infect. 2015; 91: 176–8.
71. Gautam R, Lyde F, Esona MD, et al. Comparison of Premier Rotaclone(R), ProSpecT, and RIDASCREEN(R) rotavirus enzyme immunoassay kits for detection of rotavirus antigen in stool specimens. J Clin Virol. 2013; 58: 292–4.

Monika Jevšnik[1*], Andrej Steyer[2], Miroslav Petrovec[3]

Okužbe prebavil pri majhnih otrocih

Gastrointestinal Infections in Small Children

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: gastroenteritis, okužba dihal, molekularne metode, otroci, prospektivna raziskava, enterični patogeni

V prispevku predstavljamo rezultate raziskav, v kateri smo poskušali z molekularnimi metodami opredeliti vlogo nekaterih enteričnih patogenov pri otrocih, starih do 6 let, ki so bili bolnišnično obravnavani zaradi akutnega gastroenteritisa. Za boljšo opredelitev posameznih povzročiteljev smo v prospektivno raziskavo vključili kontrolno skupino zdravih otrok brez znakov okužbe dihal. Enteritične viruse smo ob sprejemu v vzorcih iztrebkov potrdili pri 79,4 % otrok. Najpogosteje smo dokazali rotaviruse (50,5 %), ki so poleg norovirusov in adenovirusov vrste F statistično bolj pogosto prisotni pri bolnih kot pri zdravih otrocih. Z dokazovanjem bakterijskih in parazitskih povzročiteljev smo dodatno potrdili etiologijo akutnega gastroenteritisa še pri 9,8 % otrok. Sočasno okužbo prebavil in dihal smo zaznali pri 57,8 % otrok, pri večini je bila omejena na okužbo zgornjih dihal (56,4 %). Za natančno opredelitev sočasno potekajočih okužb dihal in prebavil bo v prihodnje potrebno dodatno testiranje nekaterih virusov, ki bi morda lahko bili vpleteni v to problematiko.

ABSTRACT

KEY WORDS: gastroenteritis, respiratory infections, molecular methods, children, prospective study, enteric pathogens

In this report, we present the study in which we aimed to determine enteric pathogens by using molecular methods in children aged up to 6 years of age who needed hospital treatment. In order to establish a causal relationship, a control group of healthy children was included in this prospective study as well. We detected enteric viruses in 79.4% of children with acute gastroenteritis. Rotaviruses (50.5%) were the most frequently detected, followed by noroviruses and adenoviruses species F. All were statistically more frequently present in cases than in the control group. By including bacterial and parasitic pathogens in the diagnostics scheme, we further confirmed the etiology for 9.8% of children. Both gastrointestinal and respiratory symptoms were noted in 57.8% of the children and the majority of them had upper respiratory

[1*] Asist. dr. Monika Jevšnik, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; monika.jevsnik@mf.uni-lj.si

[2] Znanst. sod. dr. Andrej Steyer, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

[3] Prof. dr. Miroslav Petrovec, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

tract infection (56.4%). A further investigation of other viruses that may have been involved in dual respiratory and gastrointestinal infections will clarify the concurrent infection.

UVOD

Akutna okužba prebavil (angl. *acute* gastroenteritis, AGE) je še vedno zelo pogost vzrok za sprejem otroka v bolnišnico, v nerazvitem svetu pa tudi vzrok umrljivosti. Povzročajo jo različni patogeni, najpogosteje enteritični virusi, kot so rotavirusi (RoV) in norovirusi (NoV), od bakterij pa enteropatogena in enterotoksigena *Escherichia coli (1, 2)*. V razvitem svetu je pogostnost AGE pri otrocih še vedno razmeroma visoka, vendar je umrljivost nizka. Okužbe pogosteje povzročajo virusi kot bakterije *(3)*. Delež nepojasnjenih AGE je med različnimi raziskavami med 25 % do 49 % *(4)*.

POTEK RAZISKAVE

V prispevku predstavljamo preliminarne rezultate raziskav, v katerih smo želeli z molekularnimi metodami in novimi molekularnimi tehnikami, kot je naslednja generacija sekvenciranja, opredeliti pomembne povzročitelje AGE pri majhnih otrocih, ki so bili zaradi tega bolnišnično obravnavani. V ta namen smo v prospektivno raziskavo, ki je bila sestavljena iz dveh ločenih sledečih si raziskav, vključili otroke, stare do 6 let, ki so jih od oktobra 2009 do oktobra 2012 zaradi AGE obravnavali na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja v Ljubljani. Vključeni so bili otroci, ki so v zadnjih 12 urah več kot trikrat odvajali tekoče blato in katerih starši so po obrazložitvi podali pisno soglasje k sodelovanju v raziskavi. Raziskava je bila predhodno odobrena s strani Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko in opravljena v skladu z načeli Helsinško-tokijske deklaracije ter prijavljena na register kliničnih raziskav pri Clinical Trials.gov. Za opredelitev pomena posameznih povzročiteljev smo v raziskavo vključili tudi kontrolno skupino zdravih otrok (KO) brez znakov okužbe prebavil in dihal, ki so jih zaradi elektivnega kirurškega posega sprejeli na Klinični oddelek za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

Skupini otrok z AGE in KO, ki so bili vključeni v raziskavo, so odvzeli vzorec iztrebka. V literaturi smo zasledili podatek, da se pri več kot polovici otrok z AGE pojavlja tudi okužba dihal, zato smo v prvih dveh letih raziskave vsem vključenim otrokom odvzeli tudi bris nosnega dela žrela in kri *(5)*. Prav tako smo v prvih dveh letih raziskave klinične podatke v raziskavo vključenih otrok pridobili z vprašalnikom, ki smo ga izpolnili ob sprejemu in na kontrolnem pregledu po 14 dneh, ko smo jim ponovno odvzeli vse tri vzorce. V drugem delu raziskave, ki je zajemalo zadnje raziskovalno leto, smo vključenim otrokom odvzeli le iztrebek; niso bili klicani na kontrolni pregled po 14 dneh, smo pa v tej skupini otrok iztrebke pregledali še na prisotnost bakterijskih in parazitskih povzročiteljev.

VIRUSNI POVZROČITELJI

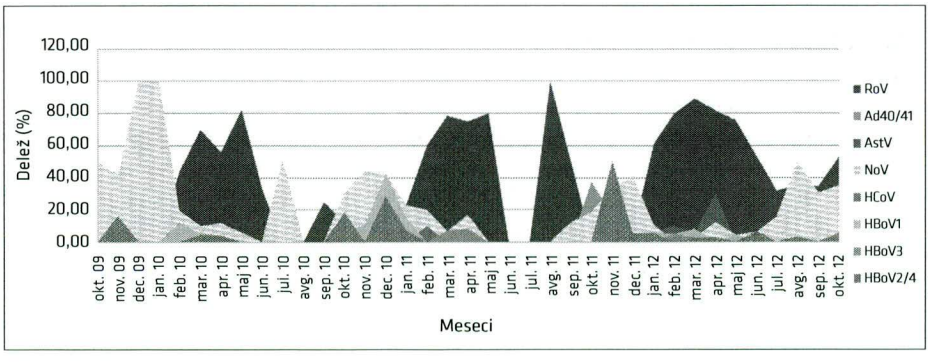
V raziskavo, ki je vključevala triletno obdobje, smo vključili 519 otrok, starih do 6 let, z AGE in 239 otrok v skupini KO. Glede na povprečno starost so bili otroci z AGE mlajši od skupine KO (23,0 mesecev otroci z AGE in 29,2 mesecev skupina KO) in v obeh skupinah je bilo vključenih več dečkov kot deklic (55,5 % dečkov z AGE in 85,3 % dečkov KO). Enteritične viruse smo ob sprejemu v vzorcih iztrebkov potrdili pri 79,4 % otrok z AGE. Najpogosteje smo

dokazali RoV (50,5 %, 262/519), ki so poleg adenovirusov vrste F (AdV F) in NoV statistično bolj pogosto prisotni pri bolnih kot pri zdravih otrocih (tabela 1). Vloga ostalih virusov je pri otrocih z AGE vprašljiva, saj ni statistično značilne razlike med bolnimi in zdravimi otroci. Podobno kot v naši raziskavi, so tudi v drugih v Evropi dokazali enteritične viruse pri 82,5 % otrok z AGE, ki ga je večinoma povzročal RoV (55,6 %) *(6, 7)*. V Avstriji, na Finskem in v Belgiji je precepljenost z rotavirusnim cepivom visoka, zato se s tem sorazmerno zmanjšuje tudi število otrok z AGE, ki potrebujejo bolnišnično obravnavo *(8–10)*.

V naši raziskavi je bilo število vključenih otrok odvisno od sezonskega pojavljanja okužb in je bilo povečano v zimskih in spomladanskih mesecih, takrat pa je bilo tudi največje število dokazanih okužb, in sicer od januarja do maja leta 2010, novembra do aprila 2011 in marca do maja 2012. Na sliki 1 vidimo prikaz posameznih virusnih povzročiteljev po mesecih.

Tabela 1. Pregled dokazanih virusnih povzročiteljev pri otrocih z akutnim gastroenteritisom. AGE – skupina otrok z akutnim gastroenteritisom, KO – kontrolna skupina zdravih otrok, RoV – rotavirusi, AdV F – adenovirusi vrste F, AstV – astrovirusi, NoV – norovirusi, HCoV – človeški koronavirusi, HBoV1, HBoV2/4, HBoV3 – človeški bokavirusi genotipov 1–4, P – vrednost P.

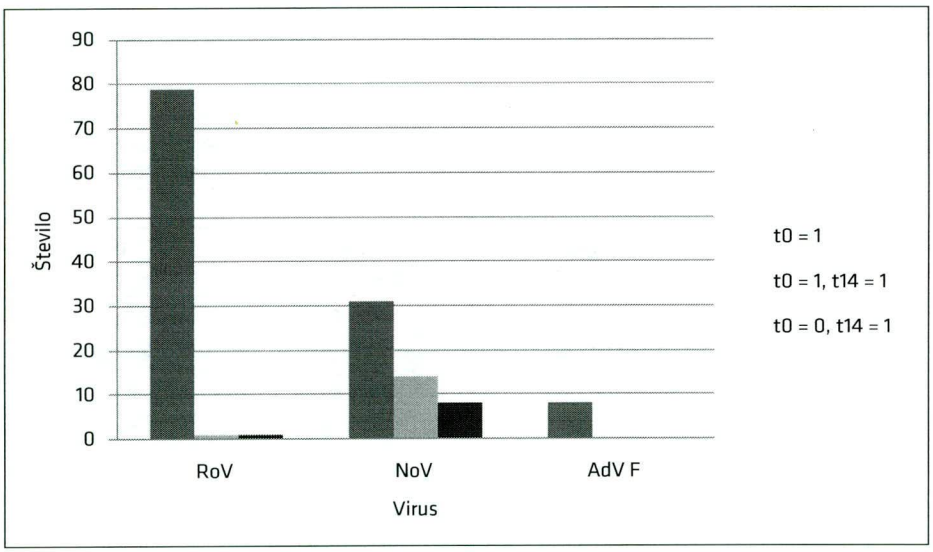
Virus	AGE Število (%)	KO Število (%)	P
RoV	262/519 (50,5)	1/239 (0,4)	< 0,001
AdV F	34/519 (6,5)	0/239 (0)	< 0,001
AstV	19/519 (3,7)	5/239 (2,1)	0,25
NoV	99/519 (19,1)	10/239 (4,2)	< 0,001
HCoV	8/519 (1,5)	1/239 (0,4)	0,184
HBoV1	18/519 (3,5)	7/239 (2,9)	0,699
HBoV2/4	16/519 (3,1)	4/239 (1,7)	0,2607
HBoV3	4/519 (0,8)	0/239 (0)	0,173



Slika 1. Prikaz sezonskega spreminjanja virusnih povzročiteljev pri otrocih z akutnim gastroenteritisom glede na število vseh poslanih vzorcev v posameznem mesecu. RoV – rotavirusi, AdV F – adenovirusi vrste F, AstV – astrovirusi, NoV – norovirusi, HCoV – človeški koronavirusi, HBoV1, HBoV2/4, HBoV3 – človeški bokavirusi genotipov 1–4.

Izločanje virusov ob kontrolnem pregledu

Na kontrolnem pregledu po 14 dneh smo v iztrebku dokazovali posamezne viruse, podobno kot ob sprejemu. Otroci z AGE in dokazanim AdV F v iztrebku virusa po 14 dneh niso več izločali, RoV smo po 14 dneh dokazali le pri enem otroku, medtem ko je 14/31 (45,2 %) otrok z dokazanim NoV ob sprejemu virus po 14 dneh še vedno izločalo (slika 2). Viremijo z RoV smo dokazali pri 41/79 (51,9 %) otrocih. Mediana vrednosti Ct za RoV dokazane v krvi je bila 33,7. Viremijo smo potrdili tudi pri 5/8 (62,5 %) AdV F in 1/31 (3,2 %) NoV. Viremijo so do sedaj že dokazali v drugih raziskavah pri RoV, NoV in enterovirusih (EV) *(11–14)*.



Slika 2. Prikaz števila dokazanih virusov ob sprejemu v bolnišnico (t0) in pri istih bolnikih na kontrolnem pregledu čez 14 dni (t14) pri otrocih z AGE. 1 = virus dokazan, 0 = virus ni dokazan. RoV – rotavirusi, NoV – norovirusi, AdV F – adenovirusi vrste F.

BAKTERIJSKI IN PARAZITSKI POVZROČITELJI

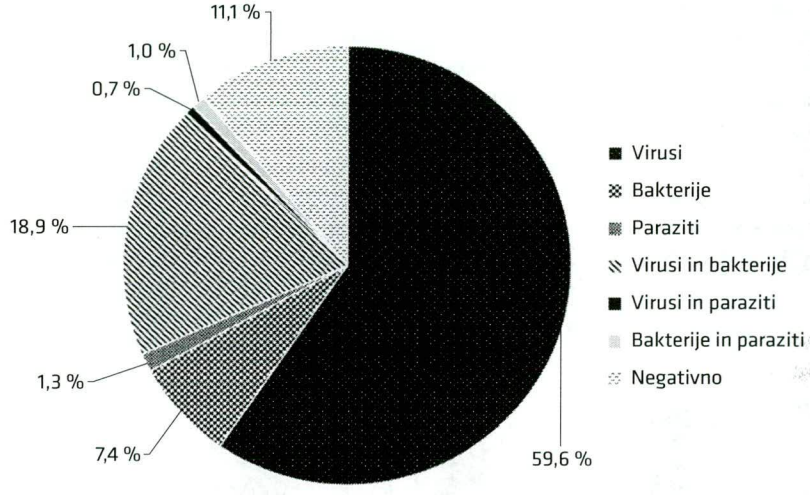
Bakterijske okužbe so pri majhnih otrocih manj pogoste kot virusne. V Evropi, ZDA in Avstraliji poročajo, da bakterije povzročajo 5–20 % AGE pri starostni skupini otrok, primerljivi s skupino v naši raziskavi *(1, 7)*. Prav tako so parazitske okužbe bolj pomembne v nerazvitem svetu, medtem ko je v Evropi pogostnost nizka *(15–19)*. V zadnjem letu raziskave smo zaradi jasne etiološke opredelitve posameznih patogenov dodatno dokazovali patogene bakterije (patogene skupine *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Shigella* spp. in *Clostridium difficile*, ki tvorijo toksin) in parazite (*Cryptospodium* spp. in *Giardia duodenalis*) (tabela 2), s katerimi smo dodatno potrdili etiologijo AGE še pri 9,8 % otrok (slika 3).

SOČASNE OKUŽBE PREBAVIL IN DIHAL

Pri otrocih se zelo pogosto pojavlja sočasna okužba prebavil in akutna okužba dihal (angl. *acute respiratory infection*, ARI). Do sedaj so v brisih nosnega dela žrela že dokazali viruse, ki primarno povzročajo

Tabela 2. Pregled dokazanih povzročiteljev pri otrocih z akutnim gastroenteritisom v obdobju od oktobra 2011 do oktobra 2012. AGE – skupina otrok z akutnim gastroenteritisom, KO – kontrolna skupina zdravih otrok, P – vrednost P.

Bakterija	AGE Število (%)	KO Število (%)	P
Escherichia coli	30/257 (11,7)	4/73 (5,5)	1,000
Campylobacter jejuni/coli	15/295 (5,1)	0/88 (0)	0,031
Salmonella spp.	14/295 (4,7)	0/88 (0)	0,037
Yersinia spp.	0/295 (0)	0/88 (0)	/
Shigella spp.	1/295 (0,3)	0/88 (0)	1,000
Clostridium difficile	24/295 (8,1)	5/88 (5,7)	0,480
Parazit			
Cryptosporidium spp.	8/295 (2,7)	1/88 (1,1)	0,468
Giardia duodenalis	1/295 (0,3)	0/88 (0)	1,000



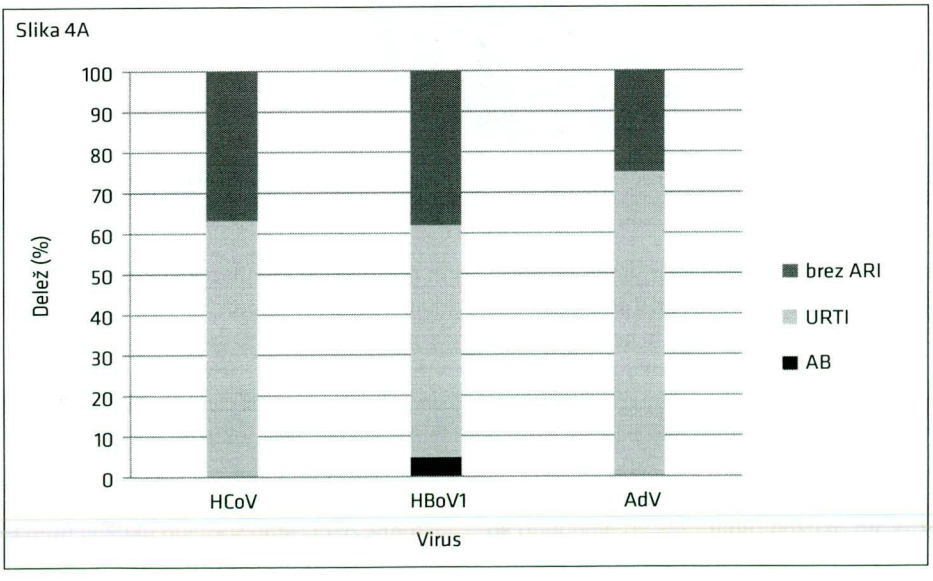
Slika 3. Pogostnost virusnih, bakterijskih in parazitskih povzročiteljev pri otrocih z akutnim gastroenteritisom v tretjem letu raziskave (oktober 2011 do oktober 2012).

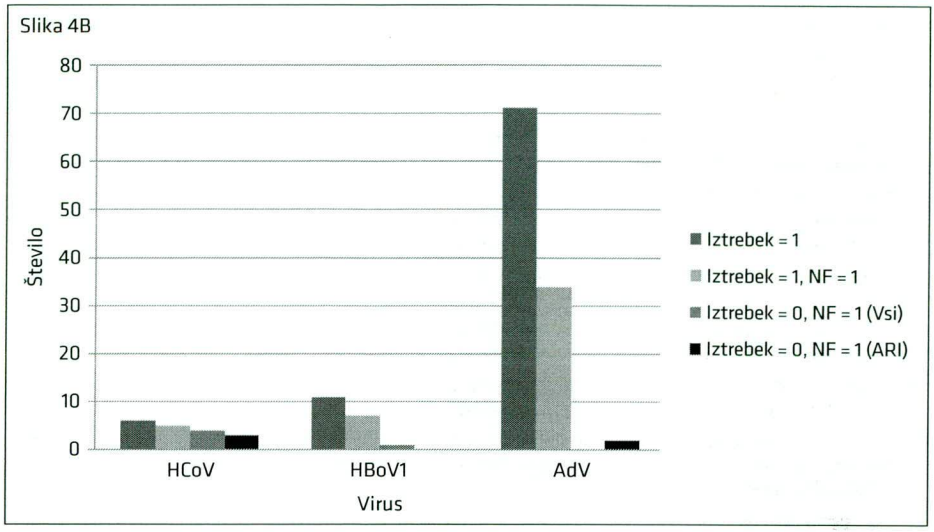
okužbe prebavil, vendar njihova vloga ni popolnoma razjasnjena. RoV so predhodno že dokazali v brisih žrela, v brisu nosnega dela žrela pa NoV pri otroku z vročino, ki ni bruhal in ni imel znakov okužbe prebavil *(20, 21)*. Po drugi strani pa so v vzorcu iztrebkov dokazali HCoV, AdV (ne iz vrste F) in enteroviruse (EV), ki primarno povzročajo okužbo dihal *(22–24)*. Podobno so HCoV sočasno dokazali v iztrebkih in brisih nosnega dela žrela pri otrocih z AGE in ARI, vendar je njihova vloga zaradi premajhnega števila pozitivnih vzorcev ostala nerazjasnjena *(5, 25)*. Nasprotno je pri virusu SARS (angl. *severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus*) znano, da lahko poleg hude okužbe spodnjih dihal povzroča tudi drisko *(26, 27)*. V prvih dveh letih naše raziskave (od oktobra 2009 do oktobra 2011) smo sočasno okužbo prebavil in dihal ugotovili pri 57,8 % (126/218) otrok. Pri večini otrok smo zaznali okuž-

bo zgornjih dihal (angl. *upper respiratory tract infections*, URTI) (56,4 %, 123/218) in le pri manjšini okužbo spodnjih dihal v obliki akutnega bronhiolitisa (AB) (1,4 %, 3/218). Pri vseh otrocih smo v brisih nosnega dela žrela dokazovali viruse, ki povzročajo okužbe dihal, saj smo želeli ugotoviti, ali gre za vzročno povezavo med dvojno simptomatiko in dokazanim povzročiteljem. Raziskava je še vedno v teku, saj do sedaj še nismo dokazovali določenih virusov, ki bi lahko bili možni kandidati za razrešitev te problematike. Pri otrocih z AGE smo v brisih nosnega dela žrela najpogosteje dokazali AdV, ki je bil v 80 % povezan s simptomatiko okužbe dihal, za razliko od rinovirusov (hRV), ki smo jih pri 18/43 (41,9 %) dokazali pri otrocih brez simptomatike okužbe dihal. Pri primerjavi dvojne simptomatike smo se osredotočili na viruse HCoV, HBoV in AdV (slika 4). Pri večini otrok, pri katerih smo dokazali virusa HCoV in HBoV v iztrebku, smo jih sočasno dokazali tudi v brisih nosnega dela žrela (5/6, 83,3 % za HCoV in 7/11, 63,6 % za HBoV) za razliko od AdV, kjer smo jih sočasno dokazali v obeh vzorcih pri 34/71 (47,9 %) otrok. Vendar pa je velik delež otrok z AGE, pri katerih smo dokazali prisotnost teh virusov v brisih nosnega dela žrela, brez znakov okužbe dihal, kar oteži razlago njihove prisotnosti v zgornjih dihalih. Lahko bi govorili o asimptomatski okužbi, vendar pa z izjemo AdV pri zdravih otrocih niso pogosto prisotni.

ZAKLJUČEK

Večino AGE povzročajo enteritični virusi kot so RoV, NoV, AdV F in AstV, s katerimi lahko potrdimo etiologijo pri 80 % otrok. Pri nepotrjenih AGE bi bilo smiselno testirati še bakteriji *Campylobacter* spp. in *Salmonella* spp., s katerimi bi lahko razjasnili še nadaljnjih 10 % okužb. Vloga posameznih virusov pri otrocih, ki imajo simptomatiko AGE in ARI, še ni popolnoma razjasnjena; predvsem zato, ker se določeni virusi pogosto pojavljajo tako pri otrocih z AGE, ki imajo ARI, in pri tistih, ki nimajo ARI, kljub temu, da ti virusi niso pogosto prisotni pri zdravih otrocih.





Slika 4. Prikaz dokazanih virusov v brisih nosnega dela žrela pri otrocih z akutnim gastroenteritisom glede na sočasne respiratorne znake okužb (slika 4A) in prikaz sočasno dokazanih virusov v iztrebkih in brisih nosnega dela žrela (slika 4B). 1 = virus dokazan, 0 = virus ni dokazan. HCoV – človeški koronavirusi, AdV – adenovirusi, HBoV1 – človeški bokavirusi genotip 1.

LITERATURA

1. Elliott EJ. Acute gastroenteritis in children. Bmj. 2007; 334 (7583): 35–40.
2. Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, et al. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. PLoS One. 2013; 8 (9): e72788.
3. Wang H, Chauhan J, Hu A, et al. Disruption of Myc-Max heterodimerization with improved cell-penetrating analogs of the small molecule 10074-G5. Oncotarget. 2013; 4 (6): 936–47.
4. Simpson R, Aliyu S, Iturriza-Gomara M, et al. Infantile viral gastroenteritis: on the way to closing the diagnostic gap. J Med Virol. 2003; 70 (2): 258–62.
5. Paloniemi M, Lappalainen S, Vesikari T. Commonly circulating human coronaviruses do not have a significant role in the etiology of gastrointestinal infections in hospitalized children. J Clin Virol. 2015; 62: 114–7.
6. Amar CF, East CL, Gray J, et al. Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4,627 faecal samples: re-examination of the English case-control Infectious Intestinal Disease Study (1993-1996). Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2007; 26 (5): 311–23.
7. Lorrot M, Bon F, El Hajje MJ, et al. Epidemiology and clinical features of gastroenteritis in hospitalised children: prospective survey during a 2-year period in a Parisian hospital, France. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011; 30 (3): 361–8.
8. Paulke-Korinek M, Kollaritsch H, Aberle SW, et al. Sustained low hospitalization rates after four years of rotavirus mass vaccination in Austria. Vaccine. 2013; 31 (24): 2686–91.
9. Lappalainen S, Tamminen K, Vesikari T, et al. Comparative immunogenicity in mice of rotavirus VP6 tubular structures and virus-like particles. Hum Vaccin Immunother. 2013; 9 (9): 1991–2001.
10. Standaert B, Gomez JA, Raes M, et al. Impact of rotavirus vaccination on hospitalisations in Belgium: comparing model predictions with observed data. PLoS One. 2013; 8 (1): e53864.
11. Blutt SE, Kirkwood CD, Parreno V, et al. Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? Lancet. 2003; 362 (9394): 1445–9.
12. Takanashi S, Hashira S, Matsunaga T, et al. Detection, genetic characterization, and quantification of norovirus RNA from sera of children with gastroenteritis. J Clin Virol. 2009; 44 (2): 161–3.

13. Welch JB, McGowan K, Searle B, et al. Detection of enterovirus viraemia in blood donors. Vox Sang. 2001; 80 (4): 211–5.
14. Holtz LR, Wylie KM, Sodergren E, et al. Astrovirus MLB2 viremia in febrile child. Emerg Infect Dis. 2011; 17 (11): 2050–2.
15. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. Lancet. 2013; 382 (9888): 209–22.
16. Davies AP, Campbell B, Evans MR, et al. Asymptomatic carriage of protozoan parasites in children in day care centers in the United kingdom. Pediatr Infect Dis J. 2009; 28 (9): 838–40.
17. Vandenberg O, Robberecht F, Dauby N, et al. Management of a Cryptosporidium hominis outbreak in a day--care center. Pediatr Infect Dis J. 2012; 31 (1): 10–5.
18. Caprioli A, Pezzella C, Morelli R, et al. Enteropathogens associated with childhood diarrhea in Italy. The Italian Study Group on Gastrointestinal Infections. Pediatr Infect Dis J. 1996; 15 (10): 876–83.
19. Friesema IH, de Boer RF, Duizer E, et al. Etiology of acute gastroenteritis in children requiring hospitalization in the Netherlands. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012; 31 (4): 405–15.
20. Ushijima H, Xin KQ, Nishimura S, et al. Detection and sequencing of rotavirus VP7 gene from human materials (stools, sera, cerebrospinal fluids, and throat swabs) by reverse transcription and PCR. J Clin Microbiol. 1994; 32 (12): 2893–7.
21. Esposito S, Daleno C, Scala A, et al. Detection of norovirus in respiratory secretions in children with respiratory tract infection. Pediatr Infect Dis J. 2014; 33 (3): 314–6.
22. Risku M, Lappalainen S, Rasanen S, et al. Detection of human coronaviruses in children with acute gastroenteritis. Journal of Clinical Virology. 2010; 48 (1): 27–30.
23. Esper F, Ou Z, Huang YT. Human coronaviruses are uncommon in patients with gastrointestinal illness. Journal of Clinical Virology. 2010; 48 (2): 131–3.
24. Paloniemi M, Lappalainen S, Salminen M, et al. Human bocaviruses are commonly found in stools of hospitalized children without causal association to acute gastroenteritis. Eur J Pediatr. 2014; 173 (8): 1051–7.
25. Jevsnik M, Steyer A, Zrim T, et al. Detection of human coronaviruses in simultaneously collected stool samples and nasopharyngeal swabs from hospitalized children with acute gastroenteritis. Virology journal. 2013; 10: 46.
26. Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. N Engl J Med. 2003; 348 (20): 1967–76.
27. Peiris JS, Lai ST, Poon LL, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. Lancet. 2003; 361 (9366): 1319–25.

Mateja Pirš[1*], Tjaša Cerar Kišek[2], Barbara Šoba[3], Miha Skvarč[4], Andrej Steyer[5], Marko Kolenc[6], Mateja Poljšak-Prijatelj[7]

Sindromski pristop v diagnostiki črevesnih okužb

Syndromic Approach in Diagnostics of Enteric Infections

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: sindromski pristop, gastroenteritis, molekularne metode

Diarealna obolenja povzročajo različni patogeni mikroorganizmi, od bakterij do virusov in parazitov. Standardni postopek za odkrivanje povzročiteljev bakterijskih drisk je kultivacija z uporabo različnih selektivnih in diferencialnih gojišč, za nekatere patogene v rutinski diagnostiki pa tudi encimsko-imunski testi in molekularno dokazovanje. Ciste in jajčeca parazitov dokazujemo z mikroskopskim pregledom blata, pri nekaterih patogenih pa se lahko uporablja direktna imunofluorescenca. Okužbe z virusi, ki povzročajo gastroenteritis, se običajno diagnosticira s kombinacijo encimsko-imunskih in molekularnih metod. Zgolj na podlagi klinične slike ni mogoče predvideti povzročitelja gastroenteritisa. Molekularne metode nam omogočajo hitrejšo in boljšo detekcijo povzročitelja gastroenteritisa. Posebej obetavne so metode, ki omogočajo sočasno zaznavo večih patogenov v sklopu sindromskega pristopa, kjer nabor patogenov zožimo na najpogostejše povzročitelje (bakterije, viruse in parazite) v skladu s klinično indikacijo – t. i. sindromski pristop. Predpogoj za tovrstno omejeno sindromsko testiranje pa so dobri podatki s strani klinika o tem, ali gre za okužbo v domačem ali bolnišničnem okolju, morebitnem jemanju antibiotika ter o potovanju in trajanju driske pred odvzemom vzorca. Z uporabo sindromskega pristopa za dokazovanje patogenov, ki povzročajo drisko, lahko bistveno pospešimo in razširimo nabor iskanih patogenov. Metode so zelo obetavne, vendar so dražje in tehnično zahtevnejše od ustaljenih postopkov, poleg tega pa je potrebna previdnost pri interpretaciji rezultatov.

[1*] Asist. dr. Mateja Pirš, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; mateja.pirs@mf.uni-lj.si

[2] Asist. dr. Tjaša Cerar Kišek, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

[3] Asist. dr. Barbara Šoba, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

[4] Asist. dr. Miha Skvarč, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

[5] Znanst. sod. dr. Andrej Steyer, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

[6] Marko Kolenc, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

[7] Asist. strok. svet. dr. Mateja Poljšak-Prijatelj, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

ABSTRACT

KEY WORDS: syndromic approach, gastroenteritis, molecular methods

The microbiological etiology of gastroenteritis may include bacterial, viral, or protozoal pathogens. Bacterial agents are identified by bacterial stool culture, which includes both selective and differential media, for some pathogens enzyme immunoassay and molecular tests are also used in routine diagnostics. Cysts and ova can be identified using microscopical stool examination that can be combined with direct immunofluorescence. A combination of enzyme immunoassay and molecular tests is usual employed in diagnosis of viral gastroeneteritis. Presumptive etiology based on clinical presentation alone is undependable. Molecular methods improve the detection of pathogens and shorten testing times. Particularly promising are multiplex nucleic acid tests which enable simultaneous detection of multiple pathogens (bacterial, viral or protozoal) as part of a syndromic diagnostic algorithm where the selection of pathogens depends on clinical data. Such a diagnostic approach requires good clinical data regarding the duration of symptoms, whether the diarrhea is community or hospital-acquired, previous antibiotic treatment or travel. The syndromic approach for determining the etiology of gastroenteritis shortens testing times and improves the detection of pathogens. Such molecular methods are very promising, however, they are more expensive and technically complex and the results must be carefully considered in conjunction with clinical data.

IZHODIŠČA

Diarealna obolenja povzročajo različni patogeni mikroorganizmi, od bakterij do virusov in parazitov. Glede na glavne patogenetske mehanizme gastroenteritisa lahko ločimo:

- sekretorni,
- inflamatorni in
- invazivni gastroenteritis.

Sekretorni gastroenteritis se kaže z vodeno drisko. Povzročajo ga lahko različni enterotoksini ali adherenca oz. invazija patogenov, kar vodi v spremenjeno izločanje in absorbcijo vode in elektrolitov. Med glavnimi povzročitelji so *(1)*:

- *Vibro cholerae,*
- enterotoksigene *E. coli* (ETEC),
- *Clostridium perfringens,*
- *Bacillus cereus,*
- *Staphylococcus aureus,*
- *Giardia duodenalis,*
- rotavirusi,
- norovirusi,
- *Cryptosporidium* spp.,
- *Microsporidia* spp. in
- *Cyclospora cayetanensis.*

Inflamatorni gastroenteritis se kaže z drisko s primesjo krvi ali sluzi oz. dizenterijo in je posledica invazije bakterij ali citotoksinov, ki povzročijo okvaro sluznice s posledičnim vnetjem. Med najpomembnejšimi povzročitelji so *(1)*:

- *Shigella* spp.,
- *Salmonella* spp. (razen *S.* Typhi/Paratyphi),
- *Campylobacter* spp.,
- *Clostridium difficile,*
- *E. coli,* ki izločajo Šigove oziroma verotoksine (STEC) ali enteroinvazivne *E. coli* (EIEC),
- *Vibrio parahaemolyticus* in
- *Entamoeba histolytica.*

Invazivni gastroenteritis povzročajo bakterije, ki lahko prodrejo skozi sluznico in vdrejo v retikuloendotelijski sistem. Med glavnimi povzročitelji so *S.* Typhi/Paratyphi in *Yersinia enterocolitica (1).*

Večina obolenj je sicer samoomejujočih, za zdravljenje pa zadoščajo nadomeščanje tekočine in elektrolitov ter poostreni higienski ukrepi za preprečitev morebitnih prenosov *(2)*. Identifikacija povzročitelja je priporočljiva za obravnavo bolnika s hudo ali dalj časa trajajočo drisko, pri bolnikih s sumom na invazivno obolenje in pri bolnikih z osnovnimi stanji ali obolenji, ki so lahko povezana z zapleti *(2–4)*. Poleg tega pa je identifikacija povzročiteljev drisk v kliničnih mikrobioloških laboratorijih eden od osnovnih pristopov javnozdravstvenih ustanov za odkrivanje in sledenje izbruhov drisk *(3, 4)*.

Standardni postopek za odkrivanje povzročiteljev bakterijskih drisk je kultivacija z uporabo različnih selektivnih in diferencialnih gojišč, odvisno od iskanega patogena. Za nekatere patogene (npr. *C. difficile* in STEC) v rutinski diagnostiki uporabljamo tudi encimsko-imunske teste in molekularno dokazovanje. Ciste in jajčeca parazitov dokazujemo z mikroskopskim pregledom blata, za dokazovanje *Cryptosporidium* in *Giardia duodenalis* pa se lahko uporablja direktna imunofluorescenca (DIF). Verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) v realnem času se v parazitološki diagnostiki redko uporablja v rutinskem testiranju. Okužbe z virusi, ki povzročajo gastroenteritis, se običajno diagnosticira s kombinacijo encimsko-imunskih (npr. rotavirusi, adenovirusi 40/41) in molekularnih metod (npr. norovirusi, astrovirusi) *(3–5)*.

MOLEKULARNA SINDROMSKA DIAGNOSTIKA

Zgolj na podlagi klinične slike ni mogoče predvideti povzročitelja gastroenteritisa. Čeprav je nabor možnih povzročiteljev širok, lahko na podlagi geografskega položaja, starosti bolnika in nekaterih drugih zdravstvenih in demografskih podrobnosti nabor patogenov v laboratorijski diagnostiki zožimo na najpogostejše povzročitelje, vključujoč bakterije, viruse in parazite – t. i. sindromski pristop. Za sindromsko diagnostiko drisk so na voljo številni komercialni testi (pa tudi t. i. hišni testi), ki večinoma temeljijo na metodi hkratnega (angl. *multiplex*) PCR. Nekateri testi imajo ustaljen nabor iskanih patogenov. Druga možnost so testi, ki omogočajo različne kombinacije bakterijskih, virusnih in parazitarnih patogenov, tretja možnost pa je popolnoma poljubna kombinacija molekularnih testov (tabela 1).

PRIMER UPORABE SINDROMSKE DIAGNOSTIKE – EVROPSKA ŠTUDIJA EUCODI

Evropska multicentrična točkovno-prevalenčna raziskava v domačem okolju povzročene driske (angl. *European, multi-centre, quarterly point prevalence study of community-acquired diarrhoea*, EUCODI) je potekala v letu 2014 v 10 evropskih državah (Avstrija, Finska, Francija, Nemčija, Grčija, Irska, Italija, Portugalska, Romunija in Velika Britanija). Iz vsake države je sodeloval en laboratorij, ki je enkrat na četrtletje v študijo vključil do 20 vzorcev, ki so jih prejeli na dan vključevanja v študijo. Vključili so vzorce neformiranega blata bolnikov z akutnim, v domačem okolju pridobljenim gastroenteritisom. Vsak laboratorij je vzorce obdelal po lastnem ustaljenem postopku, del vzorca pa so poslali v centralni laboratorij na Dunaj, kjer so izvedli molekularno metodo dokazovanja 22 povzročiteljev driske z uporabo *FilmArray GI Panel* (BioFire Diagnostics, Salt Lake City, ZDA/BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija). Skupno so obdelali 709 vzorcev. Z uporabo *FilmArray GI Panel* so povzročitelja dokazali v 384 vzorcih (54,2 %). Najpogosteje so dokazali DNK:

- enteropatogene *E. coli* (EPEC),
- *Campylobacter* spp.,
- toksigenih sevov *C. difficile*,
- enteroagregativne *E. coli* (EAEC),
- norovirusov in
- ETEC.

Tabela 1. Primeri komercialnih testov, ki omogočajo sindromsko diagnostiko gastroenteritisa *(6–15)*.

	FilmArray Gastrointestinal Panel	Nanosphere Verigene Enteric Pathogens Test	Luminex xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel	BD MAX System Enteric Bacterial Panel + Enteric Viral Panel (v razvoju Enteric Ovum and Parasite Panel)	EntericBio Gastro Panel 2 + *Clostridium Difficile* (Singleplex) (v razvoju Norovirus Singleplex)	Seeplex Diarrhea ACE	FTD Bacterial gastroenteritis + FTD Viral gastroenteritis + FTD Stool parasites	RIDA® GENE Gastrointestinal Infections	Diagenode Gastroeneteritis	TIB MOLBIOL LightMix Modular Gastro Bacteria + Virus + Parasite
Kombinacija testov	**stalna**	**stalna**	**stalna**	**modularna**	**modularna**	**modularna**	**modularna**	**modularna**	**modularna**	**modularna**
Bakterije										
Campylobacter spp.	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Plesiomonas shigelloides	•									•
Clostridium difficile (toksin A/B ali B)	•		•		•	•	•	•	•	
Salmonella spp.	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Vibrio spp.	•	•	•			•				
Yersinia enterocolitica	•	•	•			•	•	•		•
Clostridium perfringens						•				
Aeromonas spp.						•				•
Shigella spp.		•	•		•	•			•	
Enteroagregativne *E. coli* (EAEC)	•							•		
Enteropatogene *E. coli* (EPEC)	•							•		
Enterotoksigene *E. coli* (ETEC) *lt/st*	•		•					•		
E. coli, ki izločajo Šigove toksine (STEC) *stx1/stx2*	•	•	•	•	•	•	•	•		•
Shigella/ Enteroinvazivne *E. coli* (EIEC)	•			•			•	•		•

	FilmArray Gastrointestinal Panel	Nanosphere Verigene Enteric Pathogens Test	Luminex xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel	BD MAX System Enteric Bacterial Panel + Enteric Viral Panel (v razvoju Enteric Ovum and Parasite Panel)	EntericBio Gastro Panel 2 + *Clostridium Difficile* (Singleplex) (v razvoju Norovirus Singleplex)	Seeplex Diarrhea ACE	FTD Bacterial gastroenteritis + FTD Viral gastroenteritis + FTD Stool parasites	RIDA® GENE Gastrointestinal Infections	Diagenode Gastroeneteritis	TIB MOLBIOL LightMix Modular Gastro Bacteria + Virus + Parasite
Kombinacija testov	stalna	stalna	stalna	modularna	modularna	modularna	modularna	modularna	modularna	modularna
Paraziti										
Cryptosporidium spp.	•		•	•	•		•	•	•	•
Cyclospora cayetanensis	•									
Entamoeba histolytica	•		•	•			•	•	•	•
Giardia duodenalis	•		•	•	•		•	•	•	•
Dientamoeba fragilis								•	•	•
Blastocystis										•
Virusi										
Adenovirusi 40/41	•		•			•	•	•		•
Astrovirusi	•					•	•			•
Norovirusi GI/GII	•	•	•	•		•	•	•	•	•
Rotavirusi A	•	•	•	•		•	•	•	•	•
Sapovirusi (I, II, IV and V)	•						•			•

V 116 od 384 (30,2 %) vzorcev so dokazali več povzročiteljev hkrati. Z rutinskimi postopki so dokazali povzročitelja le v 18,1 %, najpogosteje:

- *Campylobacter* spp.,
- *Salmonella* spp,
- toksigene seve *C. difficile*,
- rotaviruse in
- noroviruse.

S kultivacijskimi metodami so dokazali več povzročiteljev hkrati le v 1,0 % vzorcev. Večina laboratorijev ni izvajala diagnostike za EPEC, noben laboratorij pa ni testiral EAEC, kar pomembno prispeva k veliki razliki med dokazanimi patogeni *(16)*.

Študija je prinesla nekaj zanimivih rezultatov. Med najbolj zanimivimi ugotovitvami so naslednje *(16–18)*:

- Pogosto so dokazali gene za EPEC in EAEC, v večini primerov v kombinaciji z drugimi patogeni. Tovrstni rezultati vzbujajo dvom v klinični pomen dokazovanja specifičnih genov patogenih bakterij brez gojitve in dokončne opredelitve izolatov.
- Z raziskavo so ugotovili, da rotavirusi in salmonele niso več prevladujoči povzročitelji drisk v domačem okolju v Evropi.
- Kot pomembni patogeni, ki povzročajo drisko v domačem okolju, so se izkazali norovirusi, kampilobaktri in toksigeni sevi *C. difficile*.

PREDNOSTI SINDROMSKEGA PRISTOPA V DIAGNOSTIKI DRISK

Z uporabo molekularnih metod, npr. s hkratnim PCR, s katerim lahko sočasno dokazujemo različne patogene, se je izboljšala diagnostika povzročiteljev drisk, kar je prineslo zelo dragocene epidemiološke podatke *(16, 19, 20)*. Z uporabo molekularnih metod zmanjšamo število laboratorijskih tehnik, ki jih potrebujemo za dokazovanje bakterijskih, virusnih in parazitarnih patogenov in ki vključujejo vse mikroskopiranje, gojitvene tehnike, encimsko-imunske metode in posamezne PCR. Hkrati pa odkrivanje zlasti bakterijskih patogenov bistveno pospešimo in lažje razširimo nabor iskanih patogenov.

SLABOSTI SINDROMSKEGA PRISTOPA V DIAGNOSTIKI DRISK

Pri komercialnih molekularnih testih pogosto ne vemo, katero genomsko področje je bilo izbrano za dokazovanje posameznih patogenov *(16)*. Poznavanje tarčnega odseka genoma je pomembno predvsem pri patogenih z variabilnim virulentnim potencialom, kjer so za dokončno opredelitev patogenosti potrebni fenotipski testi. Tak primer so EPEC, ki jih običajno iščemo z dokazovanjem gena za intimin (*eae*). Vendar niso vsi sevi enako patogeni. Pomembne so zlasti t. i. tipične EPEC, ki imajo *bfp* gen in pripadajo določenim serotipom. Samo na podlagi molekularnega testiranja iztrebka tako ne moremo dokončno opredeliti njihovega virulentnega potenciala *(18)*. Podobno je lahko težavna interpretacija molekularnih testov za EAEC, saj so genetsko zelo heterogene in ne poznamo zanesljivih molekularnih označevalcev *(21)*. Problem lahko predstavlja tudi molekularno dokazovanje bakterije *Yersinia enterocolitica*, za katero je znano, da so biotipi 1B in 2–5 patogeni, biotip 1A pa naj bi bil nevirulenten. Kljub temu pa nekatere raziskave kažejo, da tudi ta biotip lahko povzroča drisko. Ali bo molekularni test ta biotip zaznal je odvisno od izbranega tarčnega gena *(22)*. Nekateri molekularni testi ne ločujejo med patogeno amebo *E. histolytica* in nepatogeno amebo *E. dispar (16)*.

Posebno težavo predstavlja sočasni dokaz DNK več patogenov, saj se postavi vprašanje, okužbo s katerim od teh pa-

togenov bi morali zdraviti (v kolikor je usmerjeno zdravljenje sploh indicirano). Na podlagi teh opažanj bomo sčasoma lažje opredelili pomen sočasne izolacije različnih patogenov *(19, 23)*.

Glede na to, da so molekularne tehnike zelo občutljive in da lahko zaznajo mrtve bakterije ali neinfektivne viruse, so v nekaterih raziskavah naredili primerjavo med bolniki z drisko in zdravo kontrolno skupino. V vseh tovrstnih raziskavah so dokazali DNK črevesnih patogenov tudi pri zdravih kontrolnih skupinah, kar oteži interpretacijo rezultatov pri bolnikih. Liu in sod. so tako opažali, da so se tako pri otrocih z drisko kot pri zdravih kontrolah pojavljali:

- *C. jejuni,*
- *C. coli,*
- EPEC,
- ETEC,
- rotavirusi,
- *Shigella* spp.,
- EIEC in
- *V. cholerae.*

Zaradi premajhnega števila izolatov nismo mogli oceniti pojavnosti *Salmonella* spp. Hkrati so opazili, da je bila pri bolnih otrocih prisotna večja količina DNK patogena. S tem so pokazali, da je poleg podatka o prisotnosti DNK koristen tudi podatek o količini DNK v vzorcu *(19)*. Podobno so Bruijnesteijn van Coppenraet in sod. z molekularnimi metodami dokazali bakterijske in/ali virusne povzročitelje v 54 % vzorcev bolnikov z drisko in pri 49 % zdravih kontrol. Opažali so povečano pogostost in večjo količino DNK *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., ETEC in *Cryptosporidium* v skupini bolnikov. Podobno so opazili tudi pri določenih starostnih skupinah za *C. difficile* (21–50 let), EAEC (21–50 let) in atipične EPEC (< 5 let), kar nakazuje na vzročno povezavo. Pri pozitivnem rezultatu PCR za STEC/EHEC ali pražival *Dientamoeba fragilis* vzročne povezave niso opazili *(24)*. Tovrstne raziskave še dodatno potrjujejo dejstvo, da je potrebno pozitivne rezultate interpretirati v skladu s klinično sliko.

Sistematična uporaba molekularnega sindromskega pristopa pomembno izboljša dokaz diarealnih patogenov. V kolikor izvajamo diagnostiko le v skladu s klinično oceno o verjetni bakterijski ali virusni etiologiji, lahko zgrešimo pomembne patogene tako v domačem kot tudi v bolnišničnem okolju *(25)*.

KDAJ BI LAHKO UPORABILI MOLEKULARNI SINDROMSKI PRISTOP V KLINIKI?

Večina diarealnih obolenj je samoomejujočih, za zdravljenje pa zadoščajo nadomeščanje tekočine in elektrolitov ter poostreni higienski ukrepi za preprečitev morebitnih prenosov, zato se kliniki pogosto ne odločajo za mikrobiološko opredelitev povzročitelja *(2)*. Mikrobiološka diagnostika je smiselna predvsem pri bolnikih s hudo ali dolgotrajno drisko, pri sumu na invazivno obolenje in pri bolnikih z osnovnimi stanji ali obolenji, ki so lahko povezani z zapleti *(2–4)*.

V tabeli 2 so prikazane možnosti za zmanjšanje nabora patogenov in s tem stroškov testiranja glede na klinično sliko, ki so prirejene po priporočilih Public Health England za sindromsko diagnostiko gastroenteritisa *(5)*. Predpogoj za tovrstno omejeno sindromsko testiranje pa so podatki s strani klinika, ali gre za okužbo v domačem ali bolnišničnem okolju, morebitnem jemanju antibiotika in potovanju. Dobro je, da je laboratorij pred odvzemom vzorca obveščen tudi o trajanju driske, o morebitnih primeseh krvi v blatu in o konsistenci blata, še posebej, če naročnik uporablja transportno gojišče. Dodatno je nabor patogenov odvisen tudi od lokalnih razmer.

Tabela 2. Možnosti za zmanjšanje nabora patogenov in s tem stroškov testiranja glede na klinično sliko. Za tovrstni način testiranja mora imeti laboratorij dobre klinične in epidemiološke podatke *(5)*. DO – driska v domačem okolju, DOA – driska v domačem okolju po jemanju antibiotika, BO – driska v bolnišničnem okolju, IOB – driska pri imunsko oslabelem bolniku, PO – driska pri popotniku, e – v skladu z epidemiološkimi podatki, k – glede na klinično sliko, kp – glede na klinično sliko dalj časa trajajoče driske.

	DO	DOA	BO	IOB	PO
Bakterije (molekularni test se kombinira s kultivacijo)					
Campylobacter spp.	•	•	•	•	•
Salmonella spp.	•	•	•	•	•
Plesiomonas shigelloides	e	e			•
Clostridium difficile (toksin A/B)		•	•	•	
Shigella/enteroinvazivne *E. coli* (EIEC)	•	•	•	•	•
Vibrio cholerae					e
Yersinia enterocolitica	k	k		•	•
E. coli, ki izločajo Šigove toksine (STEC) *stx1/stx2*	•	•		•	•
druge *E. coli*, ki povzročajo drisko				k	•
Virusi					
Adenovirusi F 40/41	•	•	•	•	•
Astrovirusi			•	•	•
Norovirusi GI/GII	•	•	•	•	•
Rotavirusi A	•	•	•	•	•
Sapovirusi (I, II, IV in V)			•	•	•
Paraziti					
Cryptosporidium spp.	kp			•	•
Entamoeba histolytica				•	•
Giardia duodenalis	kp			•	•

ZAKLJUČEK

Z uporabo sindromskega pristopa za dokazovanje patogenov, ki povzročajo drisko, lahko bistveno pospešimo in razširimo nabor iskanih patogenov. Ker so molekularne metode zelo občutljive, je potrebno rezultate interpretirati v skladu s klinično sliko.

LITERATURA

1. Steiner TS, Guerrant RL. Principles and syndromes of enteric infection. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas and Bennett's principles and practices of infectious diseases. 8th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2015. p. 1335–51.
2. Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. Clin Infect Dis. 2001; 32 (3): 331–51.
3. Humphries RM, Linscott AJ. Laboratory diagnosis of bacterial gastroenteritis. Clin Microbiol Rev. 2015; 28 (1): 3–31.

4. Bonacorsi S, Garbarg-Chenon A, Kortbeek L. Gastroenteritis. In: Cornaglia G, Courcol R, Herrmann J-L, eds. ESCMID European Manual of Clinical Microbiology. 1st ed. Epernay: Société Française de Microbiologie; 2012. p. 171–178.
5. UK Standards for Microbiology Investigations. Gastroenteritis and Diarrhoea [internet]. London: Public Health England; 2013 [citirano 2015 Sep 30]. Dosegljivo na: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/344110/S_7i1.pdf
6. FilmArray Gastrointestinal Panel [internet]. FilmArray; c2002–2014 [citirano 2015 Sep 30]. Dosegljivo na: http://filmarray.com/assets/pdf/Info-Sheet-GI-Panel-MRKT-PRT-0234-07.pdf
7. Nanosphere's Verigene® Enteric Pathogens Test [internet]. Nanosphere; c2014 [citirano 2015 Sep 30]. Dosegljivo na: http://www.nanosphere.us/products/enteric-pathogens-test
8. Luminex xTAG® Gastrointestinal Pathogen Panel [internet]. Luminex; c2006–2015 [citirano 2015 Sep 30]. Dosegljivo na: https://www.luminexcorp.com/clinical/infectious-disease/gastrointestinal-pathogen-panel/
9. BD MAX™ System Enteric [internet]. Becton Dickinson; c2015 [citirano 2015 Sep 30]. Dosegljivo na: http://moleculardiagnostics.bd.com/enteric/
10. EntericBio Gastro Panel 2 [internet]. EntericBio; c2015 [citirano 2015 Sep 30]. Dosegljivo na: http://www.entericbio.com
11. Fast Track Diagnostics Gastroenteritis [internet]. Fast Track Diagnostics; c2015 [citirano 2015 Sep 30]. Dosegljivo na: http://www.fast-trackdiagnostics.com/products/
12. RIDA GENE Gastrointestinal Infections [internet]. R-biopharm AG; c2015 [citirano 2015 Sep 30]. Dosegljivo na: http://www.r-biopharm.com/products/clinical-diagnostics/molecular-diagnostics
13. Diagenode Gastroenteritis [internet]. Diagenode Diagnostics; c2015 [citirano 2015 Sep 30]. Dosegljivo na: http://www.diagenodediagnostics.com/en/list-products-2.php
14. LightMix Modular Assays & Panels [internet]. Roche Diagnostics, c2014 [citirano 2015 Sep 30]. Dosegljivo na: https://www.roche.de/res/content/7870/lightmix-modular-assays-neu.pdf
15. Seeplex Diarrhea ACE Detection [internet]. Seegene Inc.; c2015 [citirano 2015 Sep 30]. Dosegljivo na: http://www.seegene.com/neo/en/products/Gastrointestinal/seeplex_DIARRHEA.php
16. Spina A, Kerr KG, Cormican M, et al. Spectrum of enteropathogens detected by the FilmArray GI Panel in a multicentre study of community-acquired gastroenteritis. Clin Microbiol Infect. 2015; 21 (8): 719–28.
17. Olesen B, Neimann J, Bottiger B, et al. Etiology of diarrhea in young children in Denmark: a case-control study. J Clin Microbiol. 2005; 43 (8): 3636–41.
18. Hu J, Torres AG. Enteropathogenic Escherichia coli: foe or innocent bystander? Clin Microbiol Infect. 2015; 21 (8): 729–34.
19. Liu J, Kabir F, Manneh J, et al. Development and assessment of molecular diagnostic tests for 15 enteropathogens causing childhood diarrhoea: a multicentre study. Lancet Infect Dis. 2014; 14 (8): 716–24.
20. Khare R, Espy MJ, Cebelinski E, et al. Comparative evaluation of two commercial multiplex panels for detection of gastrointestinal pathogens by use of clinical stool specimens. J Clin Microbiol. 2014; 52 (10): 3667–73.
21. Hebbelstrup Jensen B, Olsen KE, Struve C, et al. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative Escherichia coli. Clin Microbiol Rev. 2014; 27 (3): 614–30.
22. Huovinen E, Sihvonen LM, Virtanen MJ, et al. Symptoms and sources of Yersinia enterocolitica-infection: a case-control study. BMC Infect Dis. 2010; 10: 122.
23. Drancourt M. Multiplex testing of diarrhoea breaks down microbial barriers. Lancet Infect Dis. 2014; 14 (8): 663–4.
24. Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Dullaert-de Boer M, Ruijs GJ, et al. Case-control comparison of bacterial and protozoan microorganisms associated with gastroenteritis: application of molecular detection. Clin Microbiol Infect. 2015; 21 (6): 592.e9–592.e19.
25. McAuliffe GN, Anderson TP, Stevens M, et al. Systematic application of multiplex PCR enhances the detection of bacteria, parasites, and viruses in stool samples. J Infect. 2013; 67 (2): 122–9.

Nina Zidar[1*], Ivan Ferkolj[2], Miroslav Petrovec[3]

Kolitis, povzročen z virusom citomegalije

Cytomegalovirus Colitis

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: citomegalovirus, kolon, diagnoza, imunohistokemija, PCR

Virus citomegalije je pomemben povzročitelj bolezni prebavil, zlasti pri imunosuprimiranih bolnikih in pri kritično bolnih. Klinični in endoskopski znaki so neznačilni. Diagnozo lahko postavimo iz biopsije prizadetega organa na podlagi celic velikank z jedrnimi inkluzijami z videzom sovjega očesa, vendar so le-te v sluznici debelega črevesa pogosto maloštevilne in neznačilnega videza. V takih primerih lahko diagnozo postavimo le s pomočjo imunohistokemične preiskave in/ali kvantitativne verižne reakcije s polimerazo. Naše izkušnje kažejo, da lahko v diagnostiki kolitisa, povzročenega z virusom citomegalije, uporabimo obe metodi, vendar je imunohistokemija bolj specifična, kvantitativna verižna reakcija s polimerazo pa bolj občutljiva. V klinično pomembnih okoliščinah bi bilo zato potrebno uporabiti obe metodi. Zaradi opisanih značilnosti je diagnostika kolitisa, povzročenega z virusom citomegalije, zahtevna in bo uspešna le ob dobrem sodelovanju med kliniki, patologi in mikrobiologi.

ABSTRACT

KEY WORDS: cytomegalovirus, colon, diagnosis, immunohistochemistry, PCR

Cytomegalovirus is an important cause of gastrointestinal disease, particularly in immunosuppressed and critically-ill patients. Clinical and endoscopic features are nonspecific. Diagnosis can be based on the detection of nuclear inclusions with the characteristic owl-eye appearance in a biopsy tissue samples of the affected organ. However, inclusions are not always present and can be atypical, particularly in cytomegalovirus colitis. Immunohistochemistry and/or quantitative polymerase chain reaction is therefore needed in such cases. In our experience, both methods can be used for diagnosing cytomegalovirus colitis, with immunohistochemistry being more specific and quantitative polymerase chain reaction being more sensitive. Both methods should therefore be used in clinically important situations. A reliable diagnosis of cytomegalovirus colitis can only be performed with collaboration of clinicians, pathologists and microbiologists.

[1*] Prof. dr. Nina Zidar, dr. med., Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova ulica 2, 1000 Ljubljana; nina.zidar@mf.uni-lj.si

[2] Izr. prof. dr. Ivan Ferkolj, dr. med., Klinični oddelek za gastroenterologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana

[3] Prof. dr. Miroslav Petrovec, dr. med. Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

UVOD

Virus citomegalije (CMV) povzroča okužbe povsod po svetu, pri osebah vseh starosti, brez sezonskega nihanja in epidemij. Primarna okužba povzroči pri osebah z normalnim imunskim odzivom infekcijski mononukleozi podobno bolezen z neznačilnimi znaki in simptomi, ki večinoma mine brez zapletov. Pri osebah z zmanjšanim imunskim odzivom ima hujši potek in se lahko konča smrtno. Najslabšo napoved imajo intersticijska pljučnica, retinitis, encefalitis, hepatitis in pankreatitis *(1, 2)*. Po primarni okužbi preide CMV v latentno obliko. Virus se lahko kasneje kadarkoli reaktivira in povzroči simptomatsko bolezen, zlasti v stanjih zmanjšane imunske odzivnosti. Prekuženost odraslih je visoka, v razvitem svetu med 40 % in 100 %, in narašča s starostjo *(3–5)*.

Reaktivacija CMV pri zmanjšani imunski odzivnosti lahko prizadene različne organe in vodi v nastanek pljučnice, hepatitisa, retinitisa, kolitisa, encefalitisa. Prebavila, še posebej debelo črevo, so med najpogosteje prizadetimi organi *(3)*. Kljub mnogim raziskavam je v zvezi s prizadetostjo prebavil pri reaktivaciji CMV še mnogo nejasnosti; npr. kateri so klinični in histopatološki diagnostični kriteriji, katere diagnostične metode so optimalne in katere bolnike je potrebno zdraviti s protivirusnimi zdravili *(6, 7)*.

KLINIČNE, MAKROSKOPSKE IN MIKROSKOPSKE ZNAČILNOSTI KOLITISA, POVZROČENEGA S CMV

Okužba s CMV prizadene v prebavilih najpogosteje debelo črevo, redkeje požiralnik in želodec, izjemoma ustno votlino in žrelo *(8–11)*. Običajno gre za reaktivacijo virusa. Prizadetost kolona je lahko izolirana ali del sistemske CMV-bolezni. Ogroženi so predvsem imunosuprimirani bolniki, npr. po presaditvi organov ali kostnega mozga, pri zdravljenju s kortikosteroidi, citostatiki, pri okužbi s HIV, pa tudi kritično bolni (npr. bolniki s sepso, cirozo, opeklinami) *(12–14)*. Posebej ogroženi so tudi bolniki s kronično vnetno črevesno boleznijo, zlasti tisti z ulceroznim kolitisom, ki so zdravljeni s kortikosteroidi *(3, 7)*. V novejšem času opozarjajo, da lahko klinično pomembna CMV-bolezen v prebavilih prizadene tudi sicer zdrave osebe *(15, 16)*.

Klinična slika je neznačilna. Najpogostejši klinični znaki so driska, krvavitev in bolečine v trebuhu, pogosto tudi slabost, bruhanje, zvišana telesna temperatura in izguba telesne teže, kot zaplet se lahko razvije perforacija *(17)*.

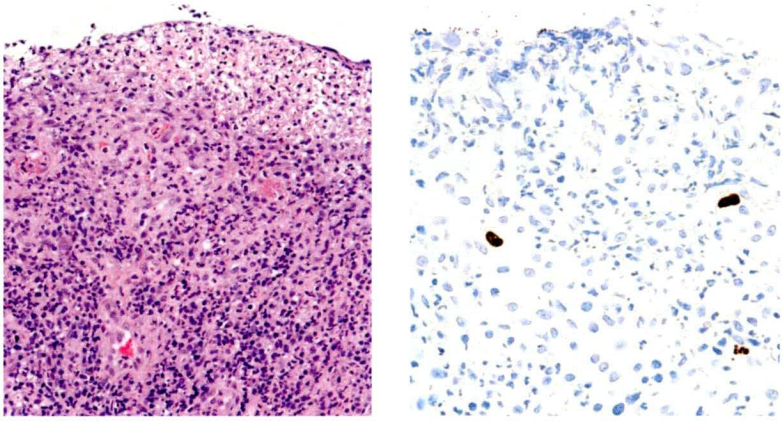
Makroskopske (endoskopske) spremembe so nespecifične: pri večini bolnikov so prisotne erozije ali ulkusi, ulkusi so pogosto multipli in veliki. Lahko so prisotni tudi eritem, edem sluznice, zadebeljene sluznične gube, vnetni polipi *(11, 18, 19)*.

Mikroskopsko so za CMV-bolezen diagnostične velike celice z bazofilnimi jedrnimi in/ali citoplazmatskimi inkluzijami s halojem (videz sovjega očesa), ki jih z lahkoto prepoznamo. Za potrditev je priporočljivo opraviti imunohistokemično reakcijo. Značilne celice velikanke z inkluzijami pa so v debelem črevesu pogosto maloštevilne. Kambham in sod. so analizirali gostoto CMV pozitivnih celic v debelem črevesu pri bolnikih z ulceroznim kolitisom z reaktivacijo CMV in ugotovili nizko gostoto – le 0,01 do 2,65 celic/mm^2 *(20)*. Poleg tega po naših izkušnjah v debelem črevesu pogosto ne najdemo značilnih celic velikank z virusnimi inkluzijami (slika 1 levo). V literaturi na to značilnost kolitisa, povzročenega z virusom citomegalije (CMV-kolitisa), opozarjajo le redki avtorji. Kambham in sod. so pri desetih bolnikih z imunohistokemično potrjenim CMV-kolitisom našli značilne virusne inkluzije pri treh bolnikih, atipične inkluzije pri treh bolnikih, pri ostalih bolnikih pa v biopsijskih vzorcih niso opazili inkluzij *(20)*.

DIAGNOSTIKA KOLITISA, POVZROČENEGA S CMV

Za ugotavljanje okužbe s CMV je na voljo več metod z različno občutljivostjo in specifičnostjo, ki jih lahko izvajamo na vzorcih krvi, seruma, levkocitov, izoliranih iz periferne krvi, telesnih tekočin ali na tkivnih vzorcih *(21)*. Metode, ki se izvajajo na vzorcih krvi ali levkocitov, imajo v diagnostiki CMV-bolezni v prebavilih omejeno vrednost, ker je CMV-bolezen v prebavilih običajno posledica reaktivacije pri seropozitivnih osebah in ker običajno ni del sistemske CMV-okužbe. Nudijo le podatke o predhodni izpostavljenosti CMV in identificirajo osebe, pri katerih lahko pride do reaktivacije virusa *(22, 23)*.

CMV-kolitis najbolj zanesljivo ugotovimo s histopatološkim pregledom tkivnega vzorca. Histopatološka diagnoza temelji na celicah velikankah z virusnimi inkluzijami. Slabost je predvsem v majhni občutljivosti (10–87 %), saj so značilne inkluzije maloštevilne in v biopsiji lahko niso zajete, poleg tega so v prebavilih pogosto neznačilne (atipične) (slika 1 levo) in jih ne prepoznamo *(3, 23–25)*. Če ob histopatološkem pregledu biopsije naredimo tudi imunohistokemijo (slika 1 desno) ali *in situ* hibridizacijo, občutljivost poraste na približno 93 % *(3, 23, 24, 26)*. Pri tem običajno uporabimo komercialna protitelesa proti zgodnjemu jedrnemu antigenu, ki se pojavi od 9 do 96 ur po okužbi oz. reaktivaciji virusa. Pozitivna imunohistokemična preiskava torej kaže na zgodnjo aktivno virusno replikacijo *(20, 27)*.



Slika 1. Kolitis, povzročen z virusom citomegalije, pri bolniku z ulceroznim kolitisom. Levo: proliferacija granulacijskega tkiva v dnu ulkusa brez značilnih inkluzij. Desno: pozitivna imunohistokemična reakcija na virus citomegalije v endotelijskih celicah v kapilarah v granulacijskem tkivu.

Novejša priporočila svetujejo tudi uvedbo kvantitativne tkivne verižne reakcije s polimerazo (angl. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR), ki je sicer najbolj natančna in občutljiva metoda za dokazovanje virusne okužbe, vendar zaenkrat še ni jasnih priporočil o uporabi te metode pri diagnostiki CMV-kolitisa *(23)*. Nekateri avtorji menijo, da lahko pozitivna reakcija pomeni le prisotnost virusa (latentna okužba), ne pa tudi aktivne bolezni *(3, 28)*.

V naši raziskavi smo zato primerjali obe metodi in ugotovili dobro korelacijo med gostoto pozitivnih celic, ugotovljeno imunohistokemično, in številom virusnih kopij, ugotovljenim s qPCR. Pomembna je tudi ugotovitev, da je bila v vzorcih slu-

znice, v katerih je bila imunohistokemična reakcija na CMV negativna, tudi qPCR negativna ali pa smo ugotovili le izredno nizko število virusnih kopij *(29)*. Naše izkušnje torej kažejo, da lahko za diagnostiko CMV-kolitisa uporabimo obe metodi, vendar je imunohistokemija bolj specifična, qPCR pa bolj občutljiva. V klinično pomembnih okoliščinah bi bilo zato potrebno uporabiti obe metodi.

ZAKLJUČEK

Reaktivacija CMV v prebavilih, zlasti v kolonu, je pomemben vzrok obolevnosti in umrljivosti pri imunosuprimiranih in kritično bolnih, posebej ogroženi so bolniki s kronično vnetno črevesno boleznijo, zdravljeni s kortikosteroidi. Klinična in endoskopska slika sta običajno neznačilni. Zanesljiv način diagnostike reaktivacije CMV v prebavilih je biopsija. Značilne celice velikanke z virusnimi inkluzijami v prebavilih, zlasti v debelem črevesu, pogosto niso prisotne, zato je potrebno narediti imunohistokemično preiskavo in qPCR za dokaz CMV pri vseh imunosuprimiranih bolnikih in pri vseh z nepojasnjenimi ulkusi in erozijami v prebavilih. Zaradi opisanih značilnosti je diagnostika CMV-bolezni v prebavilih zahtevna in bo uspešna le ob dobrem sodelovanju med kliniki, patologi in mikrobiologi.

LITERATURA

1. Koren S, Meško Meglič K, Jeverica S. Herpesvirusi. In: Poljak M, Petrovec M, eds. Medicinska virologija. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011. p. 15–30.
2. Crough K, Khanna R. Immunobiology of cytomegalovirus: from bench to bedside. Clin Microbiol Rev. 2009; 22: 76–98.
3. Garrido E, Carrera E, Manzano R, et al. Clinical significance of cytomegalovirus infection in patients with inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2013; 19: 17–25.
4. Emery VC. Cytomegalovirus: recent progress in understanding pathogenesis and control. QJM. 2012; 105: 401–5.
5. Britt W. Manifestations of human cytomegalovirus infection: proposed mechanisms of acute and chronic disease. Curr Top Microbiol Immunol. 2008; 325: 417–70.
6. Matsuoka K, Iwao Y, Mori T, et al. Cytomegalovirus is frequently reactivated and disappears without antiviral agents in ulcerative colitis patients. Am J Gastroenterol. 2007; 102: 331–7.
7. Hommes DW, Sterringa G, van Deventer SJ, et al. The pathogenicity of cytomegalovirus in inflammatory bowel disease: a systematic review and evidence-based recommendations for future research. Inflamm Bowel Dis. 2004; 10: 245–50.
8. Lemonovich TL, Watkins RR. Update on cytomegalovirus infections of the gastrointestinal system in solid organ transplant recipients. Curr Infect Dis Rep. 2012; 14: 33–40.
9. Baroco AL, Oldfield EC. Gastrointestinal cytomegalovirus disease in the immunocompromised patient. Curr Gastroenterol Rep. 2008; 10: 409–16.
10. You DM, Johnson MD. Cytomegalovirus infection and the gastrointestinal tract. Curr Gastroenterol Rep. 2012; 14: 334–42.
11. Reggiani Bonetti L, Losi L, Di Gregorio C, et al. Cytomegalovirus infection of the upper gastrointestinal tract: a clinical and pathological study of 30 cases. Scand J Gastroenterol. 2011; 46: 1228–35.
12. Kim CH, Bahng S, Kang KJ, et al. Cytomegalovirus colitis in patients without inflammatory bowel disease: a single center study. Scand J Gastroenterol. 2010; 45: 1295–301.
13. Jain M, Duggal S, Chugh TD. Cytomegalovirus infection in non-immunosuppressed critically ill patients. J Infect Dev Ctries. 2011; 5: 571–9.
14. Limaye AP, Boeckh M. CMV in critically ill patients: pathogen or bystander? Rev Med Virol. 2010; 20: 372–9.
15. Rafailidis PI, Mourtzoukou EG, Varbobitis IC, et al. Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. Virol J. 2008; 5: 47.

16. Nowak TV, Goddard M, Batteiger B, et al. Evolution of acute cytomegalovirus gastritis to chronic gastrointestinal dysmotility in a nonimmunocompromised adult. Gastroenterology. 1999; 116: 953-8.
17. Mégarbane B, Résière D, Ferrand J, et al. Difficulties in assessing cytomegalovirus-associated gastric perforation in an HIV-infected patient. BMC Infect Dis. 2005; 5: 28.
18. Kakugawa Y, Kami M, Matsuda T, et al. Endoscopic diagnosis of cytomegalovirus gastritis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. World J Gastroenterol. 2010; 16: 2907-12.
19. Suzuki H, Kato J, Kuriyama M, et al. Specific endoscopic features of ulcerative colitis complicated by cytomegalovirus infection. World J Gastroenterol. 2010; 16: 1245-51.
20. Kambham N, Vij R, Cartwright CA, et al. Cytomegalovirus infection in steroid-refractory ulcerative colitis: a case-control study. Am J Surg Pathol. 2004; 28: 365-73.
21. Roblin X, Pillet S, Oussalah A, et al. Cytomegalovirus load in inflamed intestinal tissue is predictive of resistance to immunosuppressive therapy in ulcerative colitis. Am J Gastroenterol. 2011; 106: 2001-8.
22. You DM, Johnson MD. Cytomegalovirus infection and the gastrointestinal tract. Curr Gastroenterol Rep. 2012; 14: 334-42.
23. Rahier JF, Ben-Horin S, Chowers Y, et al; European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). European evidence-based consensus on the prevention, diagnosis and management of opportunistic infections in inflammatory bowel disease. J Crohns Colitis. 2009; 3: 47-91.
24. Lawlor G, Moss AC. Cytomegalovirus in inflammatory bowel disease: pathogen or innocent bystander? Inflamm Bowel Dis. 2010; 16: 1620-7.
25. Maher MM, Nassar MI. Acute cytomegalovirus infection is a risk factor in refractory and complicated inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci. 2009; 54: 2456-62.
26. Kandiel A, Lashner B. Cytomegalovirus colitis complicating inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol. 2006; 101: 2857-65.
27. Robey SS, Gage WR, Kuhajda FP. Comparison of immunoperoxidase and DNA in situ hybridization techniques in the diagnosis of cytomegalovirus colitis. Am J Clin Pathol. 1988; 89: 666-71.
28. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. Clin Infect Dis. 2002; 34: 1094-7.
29. Zidar N, Ferkolj I, Tepeš K, et al. Diagnosing cytomegalovirus in patients with inflammatory bowel disease - by immunohistochemistry or polymerase chain reaction? Virchows Arch. 2015; 466: 533-9.

Samo Jeverica[1*], Samo Plut[2], Borut Štabuc[3]

Mikrobiološka diagnostika okužbe z bakterijo *Helicobacter pylori* – ali jo znamo pravilno uporabiti?

The Microbiological Diagnostics of Infection with Helicobacter pylori – *Do We Know How to Use it Correctly?*

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Helicobacter pylori*, diagnostika, zdravljenje

Pri okužbi z bakterijo *Helicobacter pylori* je v zadnjem času poudarek na aktivnem iskanju in eradikaciji okužbe, da bi na ta način zmanjšali obolevnost in umrljivost za rakom želodca. Zanesljiva diagnostika in uspešna eradikacija bakterije sta predpogoj za uspeh pri doseganju takšnega cilja. V prispevku ponujamo kritičen razmislek, ali znamo mikrobiološko diagnostiko pravilno uporabljati in ali nam lahko služi za izboljšanje učinkovitosti zdravljenja.

ABSTRACT

KEY WORDS: *Helicobacter pylori*, diagnostics, treatment

With regard to *Helicobacter pylori* infection the tide has turned towards active eradication of infection in order to mitigate the morbidity and mortality of gastric cancer. Reliable diagnostics and successful eradication are two basic requirements for achieving such goals. In the article, we offer a critical view on the current status of microbiological diagnostics and ask whether these diagnostic tools can offer more to improve treatment efficacy.

[1*] Asist. dr. Samo Jeverica, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; samo.jeverica@mf.uni-lj.si

[2] Asist. Samo Plut, dr. med., Klinični oddelek za gastroenterologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana

[3] Prof. dr. Borut Štabuc, dr. med., Klinični oddelek za gastroenterologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana

UVOD

Odkritje bakterije *Helicobacter pylori* pred več kot 30 leti je korenito spremenilo diagnostiko in zdravljenje bolezni zgornjega prebavnega trakta *(1, 2)*. Ulkusno bolezen želodca in dvanajstnika danes uvrščamo med infekcijske bolezni, ki jih uspešno zdravimo in preprečujemo njihove ponovitve z antibiotičnim zdravljenjem *(3)*. Prav tako je čedalje bolj prepoznana ključna vloga bakterije *H. pylori* pri nastanku raka želodca. Želodčni rak je peti najpogostejši rak v svetovnem merilu in tretji najpogostejši vzrok umrljivosti zaradi raka *(4)*. Okužba s *H. pylori* je povezana z okoli 90 % primerov raka želodca *(4, 5)*. Med vsemi infekcijskimi vzroki raka je okužba s *H. pylori* na prvem mestu in povzroči slabo tretjino vseh rakov zaradi okužb, kar je v letu 2008 pomenilo 780.000 novih primerov raka ali 6,2 % vseh novoodkritih rakov tistega leta *(6)*. Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je leta 1994 bakterijo uvrstila med karcinogene 1. razreda *(7)*.

Kljub velikemu pomenu, ki ga predstavlja okužba s *H. pylori* tako z javnozdravstvenega vidika kakor tudi na nivoju obolelega posameznika in njegovega zdravnika, se zdi, da je ob kopici drugih »pomembnejših« gastroenterooloških bolezni s številnimi novimi načini zdravljenja okužba s *H. pylori* v zadnjih letih izgubila del svoje enigmatičnosti in zanimanja zdravnikov zanjo. Diagnostični in terapevtski algoritmi so se stabilizirali, zakoreninili v zavest gastroenterologov in v zadnjih letih niso bili deležni bistvenih sprememb. S pričujočim prispevkom želimo na podlagi dveh primerov ugotoviti, ali lahko obstoječ diagnostično-terapevtski algoritem, predvsem v luči napredka mikrobioloških diagnostičnih metod, kakorkoli izboljšamo.

BAKTERIJA IN OKUŽBA

H. pylori je gramnegativna mikroaerofilna bakterija, ki je lahko upognjene, spiralno zavite, paličaste ali kokoidne oblike. Meri 2–4 µm v dolžino in 0,5–1 µm v širino. Ima 2–6 bičkov, ki so unipolarni in v dolžino merijo 3 µm. Izloča encime ureazo, katalazo in oksidazo, kar s pridom uporabljamo pri testih za dokazovanje prisotnosti bakterije in njeno identifikacijo. Je zelo dobro prilagojena na človeškega gostitelja in preživetje v kislem okolju želodčne sluznice, zato se le redko zgodi, da človek bakterijo spontano izloči. Okužba običajno poteka brez simptomov in traja celo življenje. Pri približno 10 % okuženih vodi v nastanek ulkusne bolezni, pri 1–3 % v nastanek želodčnega raka in pri 0,1 % v nastanek limfoma MALT (angl. *mucosa-associated lymphoid tissue*) *(8)*. Na nivoju želodčne sluznice vsaka okužba z bakterijo *H. pylori* vodi v nastanek kroničnega vnetja sluznice (kroničnega gastritisa). Pri ljudeh z visokim izločanjem želodčne kisline je vnetje omejeno predvsem na antrum želodca (antralno predominantni gastritis) in vodi v nastanek ulkusne bolezni. Pri ljudeh z nizkim izločanjem želodčne kisline pa je vnetje porazdeljeno po celotnem želodcu (korpusno predominantni gastritis in pangastritis) ter vodi v nastanek predrakavih sprememb (atrofija, metaplazija in displazija) in želodčnega raka.

Z bakterijo *H. pylori* je okužena približno polovica svetovne populacije. Okužba je povezana s socialno-ekonomskimi pogoji in se v nerazvitih državah približuje 80 %, v razvitih državah pa je zaradi vse boljših higienskih razmer in uporabe antibiotikov delež okuženih manjši (20–50 %). V zadnjih letih opažamo postopen upad globalne prevalence okužbe *(9)*. Kljub temu delež okuženih v razvitem svetu s starostjo narašča, vendar to pripisujemo predvsem učinku rojstne kohorte. Po zadnjih znanih podatkih je bila v Sloveniji leta 1990 prekuženost 51,7 %, leta 2005 pa 25 %. Pri tem je bilo največ okuženih oseb v starostni skupini 50–59 let. Zmanjševanje prekuženosti pripisujemo

boljšim higienskim in bivalnim razmeram ter zdravljenju simptomatskih nosilcev, ki se v Sloveniji izvaja že 20 let *(10)*. Z bakterijo se običajno okužimo v zgodnjem otroštvu s prenosom med ožjimi družinskimi člani. Pot prenosa okužbe ni popolnoma pojasnjena, vendar predvidevamo, da je bolj pomembna retrogradna pot prenosa (tj. oralno-oralna, gastro-oralna). Le redko se z bakterijo okužimo v odrasli dobi ali po uspešnem zdravljenju *(8)*.

MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA

Diagnostične metode za ugotavljanje okužbe s *H. pylori* so se začele razvijati z odkritjem bakterije in njenih lastnosti. V grobem jih lahko razdelimo na neinvazivne in invazivne metode. Med neinvazivne metode spadajo:

- serologija,
- urea dihalni test (UDT) in
- določanje antigena v blatu.

Neinvazivne metode uporabljamo za različne klinične namene, med katerimi sta najpomembnejša ugotavljanje okužbe in uspešnosti zdravljenja.

Invazivne metode izvedemo v okviru gastroskopije z odvzemom biopsije želodčne sluznice, kjer lahko prisotnost bakterije ugotavljamo s:

- hitrim ureaznim testom (HUT),
- histologijo,
- kulturo in
- molekularnimi metodami.

V nadaljevanju se bomo osredotočili samo na invazivne diagnostične metode.

ALI UPORABLJAMO PRIMERNE TESTE ZA DETEKCIJO OKUŽBE?

Hitri ureazni test

HUT je eden izmed osnovnih diagnostičnih testov, ki v vsakodnevni praksi gastroenterologu omogoči detekcijo *H. pylori* neposredno po zaključku gastroskopije. Temelji na delovanju bakterijskega encima ureaze, ki razgradi molekulo uree. Pri tem tvori amonijak in ogljikov dioksid ter s tem spremeni pH v testnem mediju. Pri prvi generaciji HUT poteka encimska reakcija v tekočem ali agarskem mediju, novejše generacije HUT pa vsebujejo trdi nosilec in polprepustno membrano, ki ujame nastajajoči amonijak za membrano in tako okrepi barvno reakcijo zaradi spremembe pH *(11)*. Občutljivost testov prve generacije, interpretiranih po eni uri, znaša po podatkih iz literature 70–80 %. Občutljivost lahko povečamo tako, da test interpretiramo po 24 urah, vendar ta ne bo presegla 90 %. Občutljivost testov druge generacije že po eni uri doseže 90 %, vendar je njihova cena višja *(12)*. Pri nas večinoma uporabljamo teste prve generacije. Na občutljivost HUT vplivajo zunanji dejavniki, ki spreminjajo gostoto in obliko (kokoidna ali spiralna) bakterij v vzorcu. Občutljivost je tako slabša pri:

- predhodni uporabi zaviralcev protonske črpalke (ZPČ), antagonistov receptorjev H2, antibiotikov ali bizmutovih spojin,
- pri bolnikih po delni gastrektomiji in
- pri bolnikih z atrofično spremenjeno sluznico, intestinalno metaplazijo ali krvavitvijo v želodcu.

Vse to so dejavniki, s katerimi se gastroenterolog kljub dobremu načrtovanju preiskave pogosto sreča ob gastroskopiji *(12)*. Občutljivost HUT je lahko nižja tudi zaradi kontaminacije biopsije s formalinom, povečamo pa jo lahko z odvzemom več bioptov in z združevanjem bioptov v testu *(13)*.

Molekularne metode za dokaz bakterije

V okvir molekularne diagnostike združujemo vse metode, ki temeljijo na dokazovanju genoma bakterije. Tovrstne metode so zaradi zahtevne narave *H. pylori* zelo primerne za njeno diagnostiko, saj za dokaz ne potrebujejo živih in metabolno

aktivnih bakterijskih celic. Z njimi lahko ugotavljamo prisotnost bakterije, različnih determinant odpornosti in nekaterih virulenčnih dejavnikov. Za detekcijo bakterije lahko uporabimo pomnoževanje različnih genov, med katerimi so najpogosteje uporabljeni geni *(14–18)*:

- *ureA*,
- *ureC* (tj. *glmM*),
- 16S rRNA,
- 23S rRNA in
- *hsp60*.

Občutljivost in specifičnost molekularnih testov je v splošnem višja od ostalih diagnostičnih metod, zato lahko s tovrstnimi testi dokažemo tudi okužbe, pri katerih sta bila kultura ali HUT negativna *(19)*.

Edini trenutno obstoječi komercialni testni komplet za molekularno detekcijo *H. pylori GenoType HelicoDR* (Hain Lifescience, Nehren, Nemčija) temelji na dokazu genov za 23S rRNA, s katerim lahko dokazujemo tudi najpogostejše determinante odpornosti proti klaritromicinu (23S rRNA) in fluorokinolonom (*gyrA*) *(20)*. Na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo (IMI) uporabljamo test *GenoType HelicoDR* od leta 2011 večinoma kot potrditveni test pri vseh s kulturo negativnih, v verižni reakciji s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) pozitivnih bioptih. Test je enostaven, vendar relativno dolgotrajen in z mnogimi postopkovnimi koraki, ki zahtevajo usposobljeno tehnično osebje. Za rutinsko laboratorijsko diagnostiko so bolj prikladni testi, ki temeljijo na metodi verižne reakcije s polimerazo v realnem času (angl. *real-time polymerase chain reaction*, RT-PCR) in analize temperature tališča hibridizacijskih lovk. V literaturi so opisane številne izpeljanke metode, ki večinoma pomnožujejo gen za 23S rRNA. Ta je prikladen predvsem zaradi sočasnega ugotavljanja odpornosti proti klaritromicinu *(17, 19, 21–24)*. Na IMI uporabljamo izpeljanko metode Oleastro s sod., ki je v uporabi v Nemškem referenčnem laboratoriju za helikobakter v Freiburgu *(23)*. Z refleksno uporabo kombinacije molekularnih testov (RT-PCR in *GenoType HelicoDR*) pri vseh s kulturo negativnih vzorcih lahko dokažemo bakterijo in določimo odpornosti proti klaritromicinu in fluorokinolonom pri dodatnih 30 % s kulturo negativnih bioptih *(25)*.

Pilotna raziskava

V letu 2013 smo naredili pilotno raziskavo uporabe molekularnih diagnostičnih metod iz bioptov, ki so bili uporabljeni za HUT. Tri endoskopske centre smo prosili za biopte 10 negativnih in 10 pozitivnih HUT, pri katerih smo naredili dva testa RT-PCR (dokaz 23S rRNA in *ureA*), pri neujemajočih vzorcih pa še *GenoType HelicoDR* test. Rezultati raziskave so bili presenetljivi, saj smo iz 48 pridobljenih vzorcev (16 pozitivnih in 32 negativnih), ki so bili 24–72 ur na sobni temperaturi (suboptimalni pogoji) in so imeli znan rezultat HUT, ugotovili zgolj 71–82 % občutljivost HUT v primerjavi z molekularnimi metodami ob sicer dobri 93–96 % specifičnosti HUT. Rezultati pilotne raziskave kažejo, da je na vsakih 4–5 negativnih HUT en lažno negativen. Tako slaba občutljivost je z diagnostičnega vidika nesprejemljiva za osnovni presejalni in potrditveni test, kakor v praksi uporabljamo HUT v času gastroskopije. Z molekularnimi testi smo v vseh pozitivnih primerih lahko ugotovili odpornost proti klaritromicinu, ki je bila v vzorcu pričakovano visoka in je znašala 20 %. Trenutno v sodelovanju s Kliničnim oddelkom za gastroenterologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana poteka prospektivna primerjava vseh obstoječih invazivnih metod (HUT, histologije, kulture in molekularnih metod), ki nam bo služila za določitev optimalnega algoritma diagnostike. Že na podlagi pilotne raziskave pa je jasno, da je osnovno vprašanje, ali lahko mikrobiološki set

preiskav, med katerimi je na prvem mestu hiter in cenovno sprejemljiv test RT-PCR za določitev prisotnosti *H. pylori* in odpornosti proti klaritromicinu, ki je podprt s kulturo in določanjem občutljivosti v manjšini primerov (tj. samo pri sevih, odpornih na klaritromicin), nadomesti v gastroenterološko prakso zakoreninjen HUT. Ta ponuja lažen občutek hitrosti in ne nudi nikakršne dodane vrednosti v smislu usmerjanja zdravljenja glede na odpornost proti klaritromicinu.

ALI UPORABLJAMO PRIMERNE TESTE ZA USMERJANJE ZDRAVLJENJA?

Osnovna paradigma zdravljenja okužbe s *H. pylori* je izkustveno zdravljenje. To najprej temelji na dobrih lokalnih podatkih o odpornosti naivnih izolatov bakterije, ki niso bili izpostavljeni eradikacijski terapiji (primarna odpornost), in nato na podlagi uspešnosti posameznih shem zdravljenja v kliničnih poskusih. V današnjem času je zdravljenje okužbe s *H. pylori* pogosto neuspešno zaradi nekaterih prirojenih dejavnikov bakterije in okolja, v katerem živi, kot so (*26*):

- počasna rast,
- zmožnost rekombinacije in plastičnost bakterijskega genoma,
- nedostopnost želodčne sluznice za učinkovanje antibiotikov zaradi nizkega pH,
- izplavljanje zaradi peristaltike,
- kolonizacija pri sicer zdravih posameznikih in
- povečana izpostavljenost antibiotikom na populacijski ravni.

Uspešnost zdravljenja tako danes le redko presega 90 %, kar je spodnja meja še sprejemljivo nizke uspešnosti tovrstnega zdravljenja. V mnogih primerih pa je uspešnost zdravljenja nedopustno nizka in ne doseže 70 % (*27*). V nedavni raziskavi uspešnosti zdravljenja na Koroškem v letih 2011 in 2012 smo ugotovili, da je bila uspešnost prve linije zdravljenja, ki je bilo v večini primerov (88 %) enako priporočeni terapiji Slovenskega združenja za gastroenterologijo in hepatologijo (7-dnevno tritirno zdravljenje z amoksicilinom, klaritromicinom in ZPČ), uspeli pozdraviti samo 70,7 % bolnikov. V primeru neuspešnega zdravljenja zaradi kateregakoli vzroka je bakterija izpostavljena neinhibirajočim koncentracijam antibiotikov in zato povečanemu tveganju za nastanek in selekcijo odpornosti. Tovrstna odpornost (sekundarna odpornost) je tako večinoma rezultat slabo načrtovanega in neuspešnega eradikacijskega zdravljenja. Razkorak med obema in število osamljenih izolatov je eden izmed kazalcev kakovosti tovrstnega zdravljenja. V tabeli 1 prikazujemo slovenske rezultate primarne in sekundarne odpornosti *H. pylori* v letih 2011–2014 (*28*).

Skupno smo pregledali 1.842 biopsijskih vzorcev pri 1.765 bolnikih, starih 3–86 let (povprečna starost 47 let). Med njimi je bilo 73,9 % vzorcev (n = 1.362) pozitivnih s kulturo in 5,5 % (n = 102) z molekularnimi testi. Informacijo o predhodnem eradikacijskem zdravljenju smo imeli za 92,8 % (n = 1.358) bolnikov. Med pozitivnimi bolniki je bilo 31,7 % (n = 430) naivnih in 68,3 % (n = 928) po enem ali več neuspešnih zdravljenjih. Primarna in sekundarna odpornost je znašala:

- za klaritromicin 15,6 % in 86,7 %,
- za metronidazol 27,4 % in 81,9 %,
- za levofloksacin 6,3 % in 19,7 %,
- za amoksicilin 0,5 % in 1,5 %,
- za tetraciklin 0,0 % in 0,1 % ter
- za rifampicin 9,1 % in 7,1 %.

Dvojna odpornost proti klaritromicinu in metronidazolu in trojna odpornost proti klaritromicinu, metronidazolu in levofloksacinu sta znašali 6,5 % in 1,0 % pri naivnih izolatih ter 73,5 % in 16,3 % pri predhodno zdravljenih izolatih.

Trenutne evropske in slovenske smernice priporočajo testiranje občutljivosti zelo ohlapno; po enem, dveh ali treh neuspešnih zdravljenjih *(29, 30)*. Podatki o odpornosti žal kažejo na neustreznost takšnih priporočil. Testiranje odpornosti pri predhodno zdravljenih bolnikih je po večkratno neuspešnih zdravljenjih pravzaprav odveč, saj s skoraj 90 % zanesljivostjo lahko predvidevamo odpornost proti klaritromicinu in metronidazolu posamezno ter s skoraj 75 % zanesljivostjo skupno odpornost proti obema. V tem obdobju zdravljenja je tako edino smiselno testirati prisotnost trojne odpornosti proti klaritromicinu, metronidazolu in levofloksacinu, ki je prisotna samo v dobrih 15 % in bi jo zato težko uganili na pamet.

ZDRAVLJENJE BOLNIKOV Z VEČKRATNO ODPORNO BAKTERIJO

Okužbe z dvojno ali trojno odporno bakterijo predstavljajo zdravniku velik terapevtski izziv, bolniku pa v luči nekaterih možnih zapletov (npr. dispepsija, ulkusna bolezen ali rak želodca) veliko psihološko breme. Zdravljenje teh težko ozdravljivih okužb s *H. pylori* se med posameznimi centri razlikuje. Podobno tudi v Sloveniji nimamo enotne strategije zdravljenja teh bolnikov. Dodatno težavo predstavlja slaba dostopnost nekaterih zdravil, ki se za to indikacijo uporabljajo drugod po svetu (npr. bizmut, rifabutin in druga). Žal mikrobiologi z določanjem odpornosti bakterije v pozni fazi zdravljenja okužbe (največkrat po večkratnih neuspelih terapijah) nimamo možnosti aktivneje usmerjati antibiotičnega zdravljenja. Pri pregledu izolatov IMI smo ugotovili, da smo med leti 2009 in 2014 osamili 249 trojno odpornih sevov (sočasno odporni proti klaritromicinu, metronidazolu in levofloksacinu). Da bi ugotovili način njihovega zdravljenja, smo zasnovali retrospektivno raziskavo (ki se v času priprave tega prispevka že izvaja), s katero želimo osvetliti problem zdravljenja teh večkratno odpornih bakterij.

KAKO NAPREJ? – POGLED MIKROBIOLOGA

Potrebno je uvesti enoten, obvezen način spremljanja primarne odpornosti, v katero bi bili enakomerno vključeni vsi gastroenterologi. Nemški model predvideva obvezen enkrat mesečni odvzem biopsije naivnega bolnika za določitev odpornosti (prve tri biopsije v mesecu). Na ta način bi uspeli sistemsko pridobiti najmanj 100 izolatov iz različnih endoskopskih centrov, geografsko enakomerno porazdeljenih po področju celotne države, in porazdeliti finančno breme tovrstnega nadzora.

HUT je zaradi svoje premajhne občutljivosti verjetno potrebno nadomestiti z molekularnim testom določanja bakterije. V ta namen predlagamo, da bi pri podanem sumu na okužbo s *H. pylori* odvzeli dve biopsiji (eno iz korpusa in eno iz antruma želodca) v univerzalno transportno gojišče za mikrobiološke preiskave *Portagerm Pylori* (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija), ki omogoča tako testiranje z molekularnimi testi kakor tudi s klasičnimi mikrobiološkimi metodami (npr. kultura, določanje ureazne aktivnosti in drugo). Na ta način bomo znotraj 24 ur od odvzema pridobili ustrezne podatke o okužbi in lahko jasno usmerili zdravljenje glede na odpornost klaritromicina. V primeru odpornosti, torej v 15–20 %, bomo izvedli antibiogram z omejenim naborom antibiotikov, ki bo dodatno usmeril zdravljenje teh bolnikov. Na ta način bomo zmanjšali število zdravljenj, endoskopij, stranskih učinkov zaradi uporabe antibiotikov, sekundarne odpornosti in število težko ozdravljivih bolnikov.

Potrebno je centralizirati eradikacijsko zdravljenje v enoti, ki bo lahko na-

tančno beležila uspešnost zdravljenja in na ta način prilagajala posamezne uporabljene strategije eradikacije. Prav tako je zaradi števila bolnikov s težko ozdravljivo okužbo potrebno organizirati enoto za zdravljenje le-teh. To bi omogočilo napotitev teh bolnikov v en center, ki bi poleg večjih izkušenj pri zdravljenju skrbel tudi za dostopnost nekaterih specialnih zdravil in beleženje njihovega učinka.

ZAHVALA

Za skrbno izvedbo mikrobiološke diagnostike in pridobitev podatkov, uporabljenih v prispevku, se iskreno zahvaljujemo odličnemu tehničnemu osebju Laboratorija za diagnostiko aerobnih in anaerobnih infekcij: Olgi Križaj, Tini Lampe, Danijeli Petrović, Petri Čamernik in Urši Kolenc. Iskrena hvala tudi mentorici ter dolgoletni vodji Laboratorija in pionirki diagnostike helikobaktra v Sloveniji prof. Mariji Gubina.

LITERATURA

1. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet. 1984; 1 (8390): 1311–5.
2. Suerbaum S, Michetti P. Helicobacter pylori infection. N Engl J Med. 2002; 347 (15): 1175–86.
3. Marshall BJ, Goodwin CS, Warren JR, et al. Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of Campylobacter pylori. Lancet. 1988; 2 (8626–7): 1437–42.
4. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2015; 65 (2): 87–108.
5. Plummer M, Franceschi S, Vignat J, et al. Global burden of gastric cancer attributable to Helicobacter pylori. Int J Cancer. 2015; 136 (2): 487–90.
6. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. Lancet Oncol. 2012; 13 (6): 607–15.
7. International Agency for Research on Cancer (IARC). Infection with Helicobacter pylori. IARC Monographs. 1994; 61: 177–240.
8. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. Clin Microbiol Rev. 2006; 19 (3): 449–90.
9. Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. Helicobacter. 2014; 19 (Suppl 1): 1–5.
10. Gubina M, Tepeš B, Vidmar G, et al. Prevalenca protiteles proti bakteriji Helicobacter pylori v Sloveniji v letu 2005. Zdrav Vestn. 2006; 75: 169–73.
11. Megraud F, Lehours P. Helicobacter pylori detection and antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Rev. 2007; 20 (2): 280–322.
12. Lopes AI, Vale FF, Oleastro M. Helicobacter pylori infection – recent developments in diagnosis. World J Gastroenterol. 2014; 20 (28): 9299–313.
13. Moon SW, Kim TH, Kim HS, et al. United rapid urease test is superior than separate test in detecting Helicobacter pylori at the gastric antrum and body specimens. Clin Endosc. 2012; 45 (4): 392–6.
14. Clayton C, Kleanthous K, Tabaqchali S. Detection and identification of Helicobacter pylori by the polymerase chain reaction. J Clin Pathol. 1991; 44 (6): 515–6.
15. De Reuse H, Labigne A, Mengin-Lecreulx D. The Helicobacter pylori ureC gene codes for a phosphoglucosamine mutase. J Bacteriol. 1997; 179 (11): 3488–93.
16. Ho SA, Hoyle JA, Lewis FA, et al. Direct polymerase chain reaction test for detection of Helicobacter pylori in humans and animals. J Clin Microbiol. 1991; 29 (11): 2543–9.
17. Maeda S, Yoshida H, Ogura K, et al. Helicobacter pylori specific nested PCR assay for the detection of 23S rRNA mutation associated with clarithromycin resistance. Gut. 1998; 43 (3): 317–21.
18. Singh V, Mishra S, Rao GR, et al. Evaluation of nested PCR in detection of Helicobacter pylori targeting a highly conserved gene: HSP60. Helicobacter. 2008; 13 (1): 30–4.

19. Chisholm SA, Owen RJ. Application of polymerase chain reaction-based assays for rapid identification and antibiotic resistance screening of Helicobacter pylori in gastric biopsies. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008; 61 (1): 67–71.
20. Cambau E, Allerheiligen V, Coulon C, et al. Evaluation of a New Test, GenoTtype HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in Helicobacter pylori. J Clin Microbiol. 2009; 47 (11): 3600–7.
21. Schabereiter-Gurtner C, Hirschl AM, Dragosics B, et al. Novel real-time PCR assay for detection of Helicobacter pylori infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. J Clin Microbiol. 2004; 42 (10): 4512–8.
22. Lascols C, Lamarque D, Costa JM, et al. Fast and accurate quantitative detection of Helicobacter pylori and identification of clarithromycin resistance mutations in H. pylori isolates from gastric biopsy specimens by real-time PCR. J Clin Microbiol. 2003; 41 (10): 4573–7.
23. Oleastro M, Ménard A, Santos A, et al. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in Helicobacter pylori. J Clin Microbiol. 2003; 41 (1): 397–402.
24. Ménard A, Santos A, Mégraud F, et al. PCR-restriction fragment length polymorphism can also detect point mutation A2142C in the 23S rRNA gene, associated with Helicobacter pylori resistance to clarithromycin. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46 (4): 1156–7.
25. Jeverica S, Dolinar U, Čamernik P, et al. Comparison of Etest, GenoType HelicoDR and in-house real-time PCR assay for the detection of clarithromycin resistance. Helicobacter. 2011; 16 (Suppl 1): 113.
26. Megraud F, Coenen S, Versporten A, et al. Helicobacter pylori resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. Gut. 2013; 62 (1): 34–42.
27. Graham DY, Fischbach L. Helicobacter pylori treatment in the era of increasing antibiotic resistance. Gut. 2010; 59 (8): 1143–53.
28. Dolinar U, Plut S, Štabuc B, et al. Primary and secondary resistance of Helicobacter pylori in Slovenia, 2011–2014 [internet]. 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2015 April 25–28; Copenhagen, Denmark [citirano 2015 Sep 29]. Izvleček. Dosegljivo na: https://www.escmid.org/escmid_library/online_lecture_library/?search=1&current_page=1&search_term=jeverica
29. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al. Management of Helicobacter pylori infection-the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. Gut. 2012; 61 (5): 646–64.
30. Tepeš B, Štabuc B. Slovenian society for gastroenterology and hepatology guidelines on the management of Helicobacter pylori infection. Zdrav Vestn. 2011; 80 (9): 647–56.

Eva Grilc[1*], Nataša Šimac[2], Majda Pohar[3], Zoran Simonovič[4], Tatjana Frelih[5], Simona Uršič[6]

Stafilokokna zastrupitev z živili – priporočila za obravnavo izbruha ali suma na izbruh in osnovne higienske postopke preprečevanja

Staphylocccocal Food Poisoning – Guidelines for Investigation in Case of an Outbreak or a Possible Outbreak and for Basic Hygienic Preventive Measures

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: zastrupitev z živili, stafilokoki, stafilokokni enterotoksin, obravnava izbruha, higienski postopki, nacionalne strokovne smernice za obravnavo klicenoscev v živilski dejavnosti

Zastrupitev s stafilokoknim enterotoksinom je pri nas in po vsem svetu pogost vzrok za zastrupitev z živili. Po podatkih Evropske agencije za varno hrano je v letu 2012 14 držav članic EU poročalo o 346 izbruhih zastrupitev z živili, ki jih je povzročil stafilokokni enterotoksin, kar predstavlja 6,4 % vseh izbruhov okužb s hrano. V Sloveniji poleg sporadičnih prijav zastrupitve beležimo do dva stafilokokna izbruha letno, med katerimi je največ prijav v starostni skupini od 5 do 14 let. V prispevku smo opisali obravnavo izbruha zastrupitve s stafilokoknim enterotoksinom. Poudarili smo pomen higienskih postopkov in stalnega izobraževanja zaposlenih v živilski stroki pri preprečevanju stafilokokne zastrupitve z živili. V zaključku podajamo predlog za pravilen in enoten pristop obravnave klicenoscev (stafilokokov in ostalih mikroorganizmov) v živilski dejavnosti v Sloveniji, saj se v praksi srečujemo z njihovo neustrezno obravnavo.

[1*] Mag. Eva Grilc, dr. med., Center za nalezljive bolezni, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Zaloška cesta 29, 1000 Ljubljana; eva.grilc@nijz.si

[2] Nataša Šimac, dr. med., Center za zdravstveno ekologijo, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Območna enota Nova Gorica, Vipavska cesta 13, Rožna Dolina, 5000 Nova Gorica; natasa.simac@nijz.si

[3] Majda Pohar, dr. med., Center za zdravstveno ekologijo, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Območna enota Murska Sobota, Ulica arhitekta Novaka 2b, 9000 Murska Sobota; majda.pohar@nijz.si

[4] Asist. Zoran Simonovič, dr. med., Center za nalezljive bolezni, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Območna enota Maribor, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; zoran.simonovic@nijz.si

[5] Tatjana Frelih, dr. med., Center za nalezljive bolezni, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Zaloška cesta 29, 1000 Ljubljana; tatjana.frelih@nijz.si

[6] Mag. Simona Uršič, dr. med., Center za zdravstveno ekologijo, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Območna enota Celje, 3000 Celje; simona.ursic@nijz.si

ABSTRACT

KEY WORDS: food poisoning, staphyloccoci, staphyloccocal enterotoxin, outbreak investigation, hygienic measures, national guidelines for investigation of carriers in food establishments.

Food poisoning with staphyloccocal enterotoxin is a common cause of food intoxication in our country and globally. According to the European Food Safety Authority in 2012, 14 EU Member States reported 346 outbreaks of food caused by staphylococcal enterotoxin, which is 6.4% of all outbreaks of food poisoning. In addition to sporadic notifications of staphyloccocal food poisoning, up to two staphylococcal outbreaks are recorded annually in Slovenia. Among the sporadic cases, the highest number of notifications are in the age group of 5 to 14 years. In this article, we describe the investigation of a staphylococcal food poisoning outbreak. We emphasize the importance of hygiene procedures and employee training in preventing staphylococcal infections with food. Due to indadequate infection-related management practices, we conclude the article with a proposal for a correct and uniform approach for controlling staphylococci carriers and other bacteria in Slovenian food establishments.

UVOD

Stafilokokna zastrupitev je najpogostejša zastrupitev z živili na svetu *(1)*. V letu 2012 je 14 držav članic EU poročalo o 346 izbruhih zastrupitev z živili, ki jih je povzročil stafilokokni enterotoksin (angl. *staphylococcal enterotoxin*, SE), kar predstavlja 6,4 % vseh izbruhov zastrupitev z živili, podobno kot v letu 2011 (345 izbruhov) *(2)*. V letu 2012 je bila incidenčna stopnja prijavljenih izbruhov zaradi SE 0,07/100.000 prebivalcev. O največjem številu, 300 izbruhih s SE, so poročali iz Francije (84,1 %). Pri večini teh (291) je šlo za izbruhe s šibkimi dokazi. Izbruhov z močnimi dokazi je bilo 35 (10,1 %). O njih

Tabela 1. Prijavljeni izbruhi, povzročeni s stafilokoknim enterotoksinom v Sloveniji, v letih 2002–14 *(5)*.

Leto	Število izbruhov	Sumljivo živilo	Mesto pojava izbruha
2002	1	krompirjeva in fižolova solata, čevapčiči	podjetje
2003	1	ni znano	dom starejših občanov
2004	2	ni znano sir	družina hotel
2005	1	ni znano	
2006	3	ni znano ni znano ni znano	gostilna koča koča
2007	0		
2008	1	ajdova kaša	gostilna
2009	1	ni znano	gostilna
2010	1	ni znano	osnovna šola
2011	1	ni znano	hotel
2012–2014	0		

so poročali iz devetih držav članic. O večini (57,1%) so poročali iz Španije in Francije. V teh izbruhih je zbolelo 497 oseb, od katerih jih je bilo hospitaliziranih 88 (27,9 %). Smrtnih primerov ni bilo *(2)*.

Izbruhi zastrupitev s SE se pojavljajo tudi pri nas *(3, 4)*. Podatki iz letnih poročil o epidemiološkem spremljanju nalezljivih bolezni kažejo, da smo v Sloveniji v letih 2002–2014 zabeležili 12 izbruhov zastrupitve s SE. V omenjenem obdobju je bilo največ prijav v starostni skupini od 5 do 14 let *(5)*.

Tabela 2. Prijave sporadičnih zastrupitev s stafilokoknim enterotoksinom v Sloveniji v letih 2002–2014 *(5)*.

Leto	Število prijav sporadičnih zastrupitev s stafilokoknim enterotoksinom
2002	63
2003	24
2004	10
2005	3
2006	7
2007	3
2008	3
2009	2
2010	86
2011	17
2012	5
2013	0
2014	0

STAFILOKOKI (*STAPHYLOCOCCUS AUREUS*) IN NJIHOVI ENTEROTOKSINI

Staphylococcus aureus je bakterija, ki pri človeku poleg različnih okužb povzroči tudi zastrupitve z živili. Je eden najodpornejših nesporogenih povzročiteljev bolezni pri človeku. Bakterija je zelo odporna na zamrzovanje in odtajevanje, preživi lahko v zamrznjenih živilih pri temperaturi do –20 °C. Odporna je tudi na sušenje in daljša obdobja v suhem okolju *(6–8)*. Stafilokokno zastrupitev z živili povzroči zaužitje SE, beljakovin, ki pri obolelem izzovejo bruhanje in drisko *(6–8)*.

Vir stafilokokne zastrupitve z živili

Glavni vir stafilokokne zastrupitve z živili je človek, saj je naravni gostitelj bakterije *S. aureus*. Polovica ali več zdravih posameznikov je klicenoscev *(9, 10)*. Pri klicenoscih je *S. aureus* najpogosteje prisoten na sluznici v nosno-žrelnem prostoru (pri 20–40 % odraslih) in na koži presredka, pri nekaterih pa na koži obraza, rok ali v lasišču, pazduhah, dimljah in nožnici *(7–9)*. Živila lahko zato onesnaži osebje v kuhinji, ki pri rokovanju z njimi ne upošteva osnovnih higienskih načel in so klicenosci oziroma imajo stafilokokno, največkrat kožno okužbo. Naravni gostitelji bakterije *S. aureus* so tudi vse toplokrvne živali *(7, 8)*. Pri njih je *S. aureus* prav tako prisoten na koži in sluznicah, zato je lahko *S. aureus* prisoten v nizkem številu v surovem mesu in mesnih izdelkih ter surovem mleku in mlečnih izdelkih *(4, 10)*.

Prenos stafilokokov s človeka na živila

S. aureus se lahko od klicenosca ali človeka s stafilokokno okužbo prenaša na živila na več načinov *(6–9)*:

- neposredno z dotikom (v primeru stafilokokne gnojne rane na koži, z rokami klicenoscev),
- kapljično (klicenosci, ki imajo *S. aureus* v nosno-žrelnem prostoru, izločajo stafilokok z drobnimi kapljicami, zlasti pri kihanju in kašljanju) in
- posredno (prek onesnaženih predmetov – kuhinjskih pripomočkov, delovnih površin, posode, opreme, strojev ...).

Če je živilo onesnaženo s *S. aureus* in izpostavljeno ugodnim pogojem za rast in razmnoževanje mikroorganizmov, se bo ta v živilu namnožil in lahko izločal to-

ksin. V živilu se *S. aureus* pri temperaturah med 10 in 45 °C razmnožuje zelo hitro. V nekaj urah je lahko v gramu živila že 10^5–10^9 kolonij bakterij *(6, 9)*. Pri zaužitju takega živila lahko kljub morebitni predhodni toplotni obdelavi živila pride do zastrupitve z enterotoksinom. Enterotoksini bakterije *S. aureus* so toplotno stabilni in jih z običajnimi postopki toplotne obdelave (kuhanjem, pečenjem) ne uničimo *(4, 6)*. Kontaminirana živila so lahko organoleptično brez sprememb: imajo običajen videz, vonj in okus *(9)*. Osebe, ki delajo v živilski stroki, imajo zato tem bolj pomembno vlogo. Odgovorne so, da z ustrezno osebno higieno in s pravilnimi postopki dela zagotavljajo take pogoje, da se v živilih prisotne bakterije ne morejo razmnožiti do koncentracij in tvoriti količin SE, ki bi ogrožale zdravje potrošnika.

Živila, ki so najpogosteje povezana s stafilokokno zastrupitvijo z živili, so *(6–9)*:

- kuhano meso (zlasti šunka, perutnina), salame, mleto meso,
- školjke,
- surovo mleko, mlečni izdelki (siri),
- sladice s kremami,
- razne sestavljene solate,
- majoneza in
- sladoled.

Klinična slika stafilokokne zastrupitve z živili

SE v osrednjem živčevju vzdraži center za bruhanje in ne deluje neposredno na črevesno sluznico *(12)*. Inkubacijska doba bolezni je kratka; znaša od pol ure do osem ur *(13)*. Bolezen se začne naglo, s slabostjo, krči v trebuhu, bruhanjem in drisko. Bolnik lahko bruha na 15–30 minut. Iztrebki so tekoči, brez primesi sluzi ali krvi *(12)*. Zastrupitev spremljajo bolečine v trebuhu, glavobol in slinjenje *(12)*. Pri zelo mladih in starih osebah se lahko razvije huda dehidracija. Bolezen traja največ 24–48 ur. Napoved izida bolezni je dobra (smrtnost je manjša od 0,02 %). Občutljivosti na SE je različna, vendar skupine ljudi s povečanim tveganjem niso dobro opredeljene, z izjemo zelo starih, zelo mladih in bolehnih oseb. Stafilokokna zastrupitev z živili se lahko pojavi sporadično ali kot izbruh.

Zdravljenje

Zdravljenje zastrupitve s stafilokoki je simptomatsko. Izgubljeno tekočino nadomeščamo s pitjem pijač oziroma z oralno rehidracijsko raztopino ali dajanjem tekočine v žilo *(12)*. Gnojne okužbe kože in sluznic zdravimo z antibiotiki v skladu z antibiogramom. Klicenoštva se ne zdravi.

Prijava stafilokokne zastrupitve z živili

V Sloveniji ima epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni podlago v Zakonu o nalezljivih boleznih (ZNB, Uradni list Republike Slovenije št. 33/2006) in Pravilniku o prijavi nalezljivih bolezni in posebnih ukrepih za njihovo preprečevanje in obvladovanje (Uradni list Republike Slovenije št. 16/99) *(14, 15)*. Pravilnik o prijavi nalezljivih bolezni in posebnih ukrepih za njihovo preprečevanje in obvladovanje deli nalezljive bolezni glede na epidemiološki pomen oziroma režim prijave v štiri skupine. Stafilokokna zastrupitev z živili je v drugi skupini, kamor uvrščamo večino nalezljivih bolezni; te se prijavi območni enoti Nacionalnega inštituta za javno zdravje (OE NIJZ) v roku treh dni od postavitve diagnoze. V primeru suma na izbruh stafilokokne zastrupitve pa je režim prijave strožji; zdravnik mora v roku od treh do šestih ur po ugotovitvi suma na izbruh obvestiti območno enoto NIJZ. Območna enota NIJZ obvesti Center za nalezljive bolezni NIJZ.

Po definiciji je izbruh pojav dveh ali več primerov iste bolezni in/ali okužbe ali stanje, v katerem opaženo število primerov pri ljudeh presega pričakovano število in pri katerem so primeri vezani ali verjetno vezani na isti vir živila *(16)*.

OBRAVNAVA IZBRUHA STAFILOKOKNE ZASTRUPITVE Z ŽIVILI

Epidemiološka preiskava

Potrditev izbruha

Na izbruh zaradi okužb ali zastrupitev z živili posumimo ob pojavu značilne klinične slike pri dveh ali več osebah, ki so med seboj epidemiološko povezane, najpogosteje zaradi izpostavljenosti isti hrani. Če se pri obolelih pojavita izrazita slabost in bruhanje ob driski, v kateri ni krvi ali sluzi, in če večina zbolelih nima vročine in se klinična slika pojavi od 30 minut do 8 ur po zaužitju hrane, gre verjetno za stafilokokno zastrupitev z živili *(17)*.

Iskanje primerov in zbiranje podatkov

S hitrim epidemiološkim poizvedovanjem (opravimo ga lahko po telefonu ali z obiskom bolnikov, ki so iskali zdravniško pomoč oz. bili hospitalizirani) poskusimo postaviti delovno hipotezo in ugotoviti dejavnik tveganja za zastrupitev ter čas in kraj, kjer je prišlo do zastrupitve *(17)*.

Opisna epidemiologija

Opredelimo populacijo, ki je bila izpostavljena, najpogostejše bolezenske znake in čas od zaužitja sumljivega živila do pojava prvih simptomov (inkubacijo). Pripravimo vprašalnik, ki zajema podatke o živilih, katerim so bili izpostavljeni, demografske podatke, bolezenske znake, začetek težav in trajanje. Vprašamo tudi, ali je kdo imel ali ve za koga, ki je imel podobne težave že pred pojavom izbruha. Izračunamo stopnjo tveganja (angl. *risk ratio*, RR) za posamezna živila in jih med seboj primerjamo *(17)*. Poskušamo poiskati osebje v kuhinji s spremembami na koži, klicenosce in preučimo vlogo posameznika pri pripravi živil. Vsem odvzamemo brise nosu, žrela, kože rok in bris morebitnih gnojnih sprememb na koži. Na koncu vzpostavimo še stik z laboratorijem, ki preiskuje humane vzorce in vzorce živil, in jih seznanimo z dogajanjem *(17)*.

Oblikovanje in vrednotenje hipoteze

Hipoteza mora opredeliti *(17)*:

- kaj je vir okužbe in kaj je vektor,
- kakšen je način prenosa,
- kdo je ogrožen, da zboli – vrsta izpostavljenosti, in
- za katero bolezen gre.

Hipoteza mora:

- biti verjetna (podprta z dejstvi, ki jih odkrijemo med epidemiološko in laboratorijsko preiskavo ter preiskavo dejavnikov iz okolja – hrana, voda) in
- pojasniti večino primerov.

Ko je hipoteza, ki bi lahko pojasnila izbruh, oblikovana oziroma postavljena, je naslednji korak, da ocenimo, ali je verodostojna. Kadar epidemiološki, laboratorijski in okoljski rezultati močno podpirajo postavljeno hipotezo, formalno testiranje hipoteze ni potrebno (npr. izolacija enakega povzročitelja pri bolnikih in iz živila glede na fagotip ali genotip). Kadar okoliščine niso tako jasne in enostavne ter informacije o primerih in dejavnikih tveganja niso dovolj prepričljive, uporabimo analitično raziskavo, s katero svoje hipoteze preiskusimo s pomočjo statističnih metod.

Mikrobiološka in okoljska preiskava

Vzorčenje

Za potrditev stafilokokne zastrupitve z živili dvem do petim bolnikom odvzamemo vzorce blata in/ali izbruhanine. Vzorce skušamo pridobiti čim prej. V primeru omejenih manjših izbruhov bolezni zadošča manjše število vzorcev. Ko je povzročitelj izbruha laboratorijsko potrjen, nadaljnje jemanje vzorcev kužnin bolnikov za potrjevanje izbruha ni več potrebno. Odvzamemo tudi vzorce sumljivih živil,

brise delovnih površin na snažnost in brise rok, nosu ter žrel zaposlenih v kuhinji *(17)*. Če živila niso več na voljo, skušamo pridobiti jedilnike oziroma seznam živil, ki so jih stregli v času, ko je prišlo do zastrupitve. Čim bolj natančno povprašamo o poreklu posameznih živil, načinu shranjevanja, priprave itd.

Laboratorijska diagnostika

Kužnine obolelih pregledamo na prisotnost salmonel, šigel, kampilobaktrov, jersinij, patogenih ešerihij, stafilokokov ter rotavirusov, adenovirusov in norovirusov. Izolacijo *S. aureus* iz kužnin, živil in površin ter tipizacijo enterotoksinov izvedemo po standardnih mikrobioloških postopkih. Cilj diagnostike je, da potrdimo prisotnost istega tipa stafilokoka oziroma SE v hrani in pri obolelih *(17)*.

Ukrepi ob izbruhu

Med izbruhom naj osebje kuhinje začasno pripravlja prilagojene jedilnike, hrana naj bo preprosta za pripravo. Pri delu v kuhinji ne sme biti kadrovskega primanjkljaja *(17)*. Osebju kuhinje svetujemo zdravstveni pregled, ki ga običajno izvede zdravnik, specialist medicine dela, prometa in športa, in izvajanje ukrepov za preprečevanje stafilokokne okužbe z živili, opisanih v nadaljevanju prispevka. Pregledamo zdravstveno-higienska navodila v kuhinji ustanove, zapisane postopke dela ter svetujemo morebitne popravke. Delo z živili začasno prepovemo osebam z gnojnimi okužbami rok, obraza in nosu ter zdravim osebam, pri katerih laboratorijsko potrdimo kolonizacijo z enterotoksigenim sevom *S. aureus*, če sumimo, da so vir izbruha *(18)*.

Spremljanje izbruha in komunikacija s prizadetimi, vključenimi deležniki in javnostjo

S pomočjo odgovorne osebe v ustanovi spremljamo potek izbruha in beležimo nove primere ter spremljamo učinkovitost izvajanja ukrepov. Odgovorna oseba v dogovoru z območno epidemiološko službo dnevno posreduje podatke o novo zbolelih na predpisanem seznamu. Uslužbenci ustanove, kjer se je pojavil izbruh, so dolžni izvajati priporočene ukrepe za omejitev izbruha. V primeru, da se kljub izvajanju ukrepov v živilskem obratu še vedno pojavljajo pozitivni vzorci na *S. aureus* (brisi na snažnost, vzorci živil), kar je predvsem verjetno pri nosilcih *S. aureusa* na rokah, priporočamo nadaljnje ukrepe ali omejitve.

Konec izbruha

Preden razglasimo konec izbruha, moramo biti prepričani, da nimamo več novih primerov. Konec izbruha razglasimo, ko od zadnjega zaužitja kontaminiranega živila mine dvojna inkubacijska doba, po začetku simptomov pri zadnjem primeru (16 ur). Pisno odjavo epidemiološka služba OE NIJZ v sedmih dneh po koncu izbruha pošlje Zdravstvenemu Inšpektoratu Republike Slovenije *(17)*.

UKREPI ZA PREPREČEVANJE STAFILOKOKNE ZASTRUPITVE Z ŽIVILI

Ukrepi za preprečevanje stafilokokne zastrupitve z živili so enostavni in učinkoviti, če jih izvajamo dosledno, ter obsegajo:

- upoštevanje osnovnih higienskih postopkov za varnost živil v skladu z načeli sistema,
- analizo tveganja in ugotavljanja kritičnih kontrolnih točk (angl. *hazard analysis and critical control points*, HACCP) zlasti protokolov temperatura-čas,
- izobraževanje zaposlenih v živilski dejavnosti o preprečevanju okužb in zastrupitev z živili s *S. aureus* in
- usposabljanje na osnovi strokovnih priporočil NIJZ.

S. aureus v živilih – Priporočila za zaposlene v živilski dejavnosti:

- Osnovna higienska stališča za higieno živil, namenjena delavcem v živilski dejavnosti *(19)*.
- Higienska stališča za higieno živil, namenjena delavcem v živilski dejavnosti, 2. stopnja *(20)*.
- Izvajalec usposabljanja se mora prepričati, da zaposleni razume vsebine usposabljanja, pojasniti, da je klicenoštvo lahko le trenutno, prehodno stanje, in obrazložiti klicenoštvo pri ljudeh (do 50 % ljudi).

Za izvajalce strokovnega usposabljanja priporočamo Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) ali druge strokovno primerno usposobljene izvajalce.

Osnovni higienski postopki preprečevanja stafilokokne okužbe z živili

Preprečiti moramo prenos bakterije *S. aureus* na živila in razmnoževanje stafilokokov v živilih *(9)*.

Osebje, ki dela z živili

Pri delu z živili vedno postopamo tako, kot da smo klicenosci. Dosledno izvajamo osebno higieno, zlasti pravilno umivanje rok. Razkuževanje rok pri delu ni potrebno. Pri pripravi hrane se izogibamo nepotrebnemu dotikanju telesa (kože in sluznic, npr. nosu, ust, obraza, lasišča, las). V primeru dotikov, praskanja, popravljanja las, si roke pred nadaljevanjem dela pravilno umijemo. V primeru poškodbe na rokah (ureznine, opekline) rano oskrbimo in jo neprepustno zaščitimo (z obliži ali rokavicami za enkratno uporabo). Če se rana zagnoji ali se pojavijo druge gnojne spremembe na koži, oseba ne sme delati z živili. Prav tako z živili ne sme delati oseba, ki ima gnojne rane na obrazu, vratu, gnojni izcedek iz nosu, oči, ušes, gnojne spremembe na očeh, v nosu, ustih in žrelu oziroma ima drisko, bruha. V primeru kihanja in kašljanja se obrnemo stran od živil in kihnemo oziroma kašljamo v papirnat robec. Robec takoj odvržemo v koš za odpadke, nato si pravilno umijemo roke. Če robca nimamo pri roki, kihnemo ali kašljamo v nadlaket ali komolec, nikoli ne v dlani *(21)*. Med govorjenjem se obrnemo stran od živila, da ga ne onesnažimo s kapljicami sline. Med pripravo živil ne uporabimo istega pribora (žlice, vilic) za pokušanje hrane več kot enkrat *(6, 10)*.

Pravilni postopki dela z živili

Preprečujemo navzkrižno onesnaženje, zlasti onesnaženje že očiščenih in gotovih živil. Pazimo, da teh živil ne onesnažimo bodisi z umazanimi rokami, kuhinjskimi pripomočki, priborom, delovnimi površinami bodisi z onesnaženimi surovimi živili (meso, jajca). Toplotna obdelava živil naj bo pravilna in zadostna. Večino zdravju škodljivih mikroorganizmov, potencialno prisotnih v živilih, uničimo s temperaturo nad 70 °C. Postopki ohlajanja toplotno obdelane hrane in ponovnega pogrevanja morajo biti izvedeni pravilno in v čim krajšem času. Posebej moramo biti pozorni na higiensko rokovanje s surovim mesom in jajci. Dosledno upoštevamo priporočila za rokovanje z gotovimi živili in pravilno uporabo rokavic. Sveže sadje in zelenjavo temeljito očistimo in operemo. Zagotavljamo nepretrgano hladno oziroma toplo verigo (prevzem, skladiščenje, priprava, shranjevanje). Živila shranjujemo na primernih temperaturah:

- surova živila, ki zahtevajo hladno shranjevanje, v hladilniku pri temperaturi pod 5 °C in
- toplotno obdelana živila: tople jedi pri temperaturi nad 63 °C, hladne jedi v hladilniku pri temperaturi pod 5 °C.

Čas priprave živil izven varnega temperaturnega območja (ki je pod 5 °C in nad 63 °C) naj bo čim krajši, prav tako čas do zaužitja že izdelanih, pripravljenih jedi *(6, 10)*.

Primerna sanitarno-tehnična oprema in ureditev ter vzdrževanje higienskih razmer

Delovne površine, orodje in pribor uporabljajmo namensko in ločeno (npr. ločeno za surovo meso, za zelenjavo, za gotova živila). Temeljito in sproti čistimo delovne površine, pripomočke, pribor, posodo itd. Pri tem pazimo, da po čiščenju ne ostajajo vlažni oziroma da se temeljito posušijo *(6, 10)*.

Zagotavljanje tople in hladne verige med pripravo, shranjevanjem in postrežbo živil

Temperatura je eden od dejavnikov, ki vpliva na rast oziroma preživetje mikroorganizmov v živilu in na tvorbo toksinov. Živila, ki potrebujejo nadzorovano temperaturno okolje, imenujemo potencialno nevarna živila *(22)*. Z neustrezno temperaturo, npr. če potencialno nevarno živilo pustimo več ur na sobni temperaturi, omogočimo rast in tvorbo SE. V sistemu javne prehrane (gostinstvo, interni obrati prehrane, vzgojno-izobraževalne institucije, slaščičarne, trgovine, bolnišnice) moramo biti še posebej pozorni na zagotavljanje in preverjanje temperature gotovih toplih in hladnih jedi *(21)*. Nevarno temperaturno območje, ugodno za rast in razmnoževanje mikroorganizmov, je med 5–63 °C *(22)*. Zato potencialno nevarna živila vzdržujemo pri temperaturi pod 5 °C oz. nad 63 °C (vzdržujemo hladno oziroma toplo verigo) *(10)*.

Navzkrižno onesnaženje živil

Izraz navzkrižno onesnaženje živil običajno uporabljamo v smislu navzkrižnega onesnaženja živil z mikroorganizmi. Živila se lahko navzkrižno onesnažijo z mikroorganizmi (bakterijami, virusi) zaradi nehigienskega rokovanja z živili med pripravo, shranjevanjem ali distribucijo.

Pri navzkrižnem onesnaženju se mikroorganizmi na živilo lahko prenašajo na več načinov:

- z živila na živilo,
- prek oseb, ki delajo z živili,
- prek kuhinjske opreme, posode in pribora in
- z drugimi načini prenašanja (glodavci, insekti).

Najpogosteje gre za prenos zdravju škodljivih mikroorganizmov s surovih živil prek rok osebja na gotova živila *(11)*. Poleg umivanja rok je pomemben higienski postopek preprečevanja navzkrižnega onesnaženja in ločevanje čistih ter nečistih poti, opreme, pribora in postopkov *(6, 8)*.

Higiensko ravnanje z gotovimi živili

Gotova živila so živila, ki se običajno zaužijejo v enakem stanju, kot so prodana, in ki pred zaužitjem ne potrebujejo dodatne toplotne obdelave (sendviči, solate, ocvrta hrana, salame) *(23, 24)*. Ne vključujejo oreščkov v lupinah, surovega sadja in zelenjave, ki jih mora potrošnik pred zaužitjem oluščiti, olupiti ali umiti. Z gotovimi živili nikoli ne rokujemo neposredno z golimi rokami: umivanje rok ni vedno zadosten preventiven ukrep za odstranitev zdravju škodljivih mikroorganizmov, predvsem z močno onesnaženih rok. Prav tako lahko okužbo spregledamo, zlasti kadar poteka v blažji obliki ali brez kliničnih znakov in okuženi izloča povzročitelje bolezni v okolico. Poleg pravilnega umivanja rok je zato pomemben preventiven ukrep tudi preprečevanje neposrednega stika gotovih živil z golimi rokami. Uporabljamo primerne pripomočke, kot so prijemalke, žlice, vilice, zajemalke, lopatke, klešče, opremo za delitev hrane, rokavice za enkratno uporabo. Tudi pri ostalih živilih, ki niso gotova živila, naj zaposleni pri delu čim bolj zmanjša neposreden stik z živili z golimi rokami, uporablja naj zgoraj navedeni pribor *(9, 19)*.

Uporaba rokavic med delom z živili

Na koži rok so kmalu po umivanju ponovno prisotne bakterije, ker neprestano pre-

hajajo iz kožnih por in gub na površino kože. Med njimi so tudi na zdravih rokah lahko nevarni stafilokoki in drugi zdravju škodljivi mikroorganizmi. Če delamo neposredno z gotovimi živili, vedno uporabljamo delovnemu procesu primeren pribor (prijemalke, vilice, zajemalke, lopatke, klešče itd.). Rokavice praviloma uporabljamo takrat, ko si ne moremo pomagati s priborom, na primer pri rezanju in končni dodelavi živil. Prav tako priporočamo uporabo rokavic pri grobi obdelavi surovega mesa, še posebej perutnine, in pri čiščenju surove zelenjave *(19)*.

Pravilna uporaba rokavic *(19)*:

- Preden si nadenemo rokavice, si roke vedno temeljito umijemo in posušimo.
- Pred uporabo rokavic si morebitne rane na rokah (čiste, neokužene) zaščitimo z vodoodpornim obližem.
- Kadar pri delu z gotovimi živili ne moremo uporabiti pribora, vedno uporabimo rokavice.
- Rokavice je treba med delom pogosto menjati.
- Vedno jih menjamo tudi po ravnanju s surovimi živili in pred začetkom dela z gotovimi živili, pa tudi takrat, ko se rokavice poškodujejo.
- Med vsako menjavo rokavic roke pravilno umijemo in dobro posušimo.
- Če med delom z živili prekinemo delo, rokavice zavržemo. Pred ponovnim začetkom dela roke najprej umijemo in uporabimo nove rokavice.
- Rabljenih rokavic nikoli ne umivamo ali ponovno uporabimo.

Rokavice se ravno tako onesnažijo kot roke. Ker niso popolnoma nepropustne, jih uporabljamo le za točno določeno opravilo in za kratek čas. Pred uporabo rokavic je treba roke temeljito umiti in posušiti. Po uporabi rokavice zavržemo in roke ponovno umijemo ter posušimo. Nikoli ponovno ne uporabljamo že uporabljenih rokavic. Uporaba rokavic ne nadomesti umivanja rok. Le s pravilno rabo bodo rokavice lahko učinkovita zaščita pri prenosu mikroorganizmov z rok na živila *(19)*.

Najpogostejše napake pri pripravi hrane kot dejavniki tveganja za pojav stafilokokne zastrupitve z živili *(9, 19)*:

- neustrezna higiena, predvsem neustrezna higiena rok,
- navzkrižno onesnaženje živil,
- nezadostna toplotna obdelava živil,
- nepravilno, prekinjeno vzdrževanje hladne oziroma tople verige,
- nepravilno shranjevanje toplotno obdelanih živil, ki jih uživamo topla (nepravilno vzdrževanje na toplem),
- nepravilno shranjevanje živil, ki zahtevajo hladno shranjevanje (nepravilno vzdrževanje na hladnem),
- prepočasno ohlajevanje pri pripravi hrane vnaprej in
- neustrezno rokovanje z gotovimi živili.

Klicenosci s *S. aureus* na rokah in v nosu ali nosno-žrelnem prostoru – omejitve

Pri zaposlenih v živilski dejavnosti, pri katerih ugotovimo klicenoštvo s *S. aureus*, ne priporočamo nobenih posebnih omejitev pri delu, temveč le dosledno izvajanje zgoraj navedenih splošnih ukrepov. Klicenoštvo s *S. aureus* na rokah potrdimo šele po dveh zaporednih pozitivnih brisih rok, saj so lahko roke le prehodno onesnažene.

RAZPRAVA

Pravilnik o zdravstvenih zahtevah za osebe, ki pri delu v proizvodnji in prometu z živili prihajajo v stik z živili (Uradni list Republike Slovenije št. 82/2003, 25/2009) v drugem členu govori o osebah, ki so prenašalci povzročiteljev nalezljivih bolezni. Ti bi lahko neposredno ali posredno prek živil ogrožali zdravje potrošnikov, zato Pravilnik navaja, da ne smejo delati z živili, razen, če se z uvedenimi higienski-

mi ukrepi ogrožanje zdravja potrošnikov lahko prepreči *(25)*.

Klicenoštvo s *S. aureus* se lahko ugotovi ob obravnavi izbruha (te obravnava epidemiolog), običajno pa se naključni klicenosci odkrijejo ob sprejemu na delovno mesto ali ob obdobnih zdravniških pregledih, ki jih izvajajo specialisti medicine dela. Klicenoscu, ki je odkrit pri obravnavi izbruha stafilokokne zastrupitve z živili, prepovemo delo z živili *(18)*. Običajno je ta ukrep začasen. Ugotovimo, ali so v obratu zagotovljeni vsi sanitarno tehnični pogoji za izvajanje higienskih ukrepov, ki preprečujejo zastrupitve z živili in odredimo izobraževanje klicenosca o načinih širjenja *S. aureus* in ukrepih za preprečevanje zastrupitev z živili.

Bolj neenoten je postopek obravnave naključno ugotovljenih klicenoscev s *S. aureus*, ki delajo v živilski dejavnosti, saj smernic za njihovo obravnavo ni. V praksi ugotavljamo, da nekaterim klicenoscem izbrani zdravnik ali zdravnik medicine dela odredi bolniško odsotnost z dela, nekateri prejmejo terapijo, nekaterih pa delodajalci zaradi ugotovljenega klicenoštva ne želijo zaposliti. Klicenosci s *S. aureus* bi morali biti v takih primerih seznanjeni s svojim statusom nosilstva ter izkazati potreben nivo znanja za varno delo z živili.

V običajnih razmerah, ko ni izbruha, zaposlenim klicenoscem ne priporočamo nobenih posebnih omejitev pri delu, temveč le dosledno izvajanje ukrepov za preprečevanje stafilokoknih zastrupitev z živili, navedenih v prispevku. V primerih, ko se v živilskem obratu izvajajo in so dani pogoji za izvajanje vseh ukrepov, lahko zaposleni klicenosci pri delu z živili delajo brez omejitev. Vendar v praksi v živilskih obratih prihaja do odstopanj oziroma ti pogoji niso ali ne morejo biti vedno zagotovljeni, bodisi zaradi neurejenih sanitarno-tehničnih razmer in opreme v obratu, neustrezne usposobljenosti zaposlenih pri delu z živili (neizvajanje izobraževanj zaposlenih, neustrezna strokovna usposobljenost izvajalca izobraževanj, težavno dojemanje vsebine izobraževanj ...) maloštevilnega tima zaposlenih, kar se običajno tudi odraža s pozitivnimi vzorci in brisi na snažnost na prisotnost *S. aureus* ali SE. V takih primerih moramo razmisliti o delni omejitvi dela kot nadaljnjem ukrepu preprečevanja stafilokokne zastrupitve z živili. Pri odločanju o tem, ali naj klicenosec dela brez omejitev ali ne, upoštevamo tudi naravo delovnega mesta. Vsekakor je veliko več tveganja v npr. slaščičarski delavnici. Srečujemo se tudi s primeri, ko je zaposleni pri delu z živili klicenosec s *S. aureus* na koži rok. Roke prihajajo v neposreden stik z živili, delovnimi površinami, priborom, opremo. V takih primerih pogosto zasledimo prisotnost *S. aureus* ali SE v vzorcih živil ali brisih na snažnost. Če kljub vsem ukrepom stafilokok v živilih in v brisih na snažnost vztraja in še zlasti če je oseba kolonizirana z enterotoksigenim sevom *S. aureus*, je treba razmisliti o delni omejitvi dela (npr. raba rokavic pri delu z živili ali premestitev na delovno mesto v predpripravi le tistih živil, ki gredo takoj v toplotno obdelavo; v skrajnem primeru, ko se kljub vsem izvedenim ukrepom pojavljajo pozitivni vzorci živil in brisi na snažnost, premestitev na delovno mesto, na katerem zaposleni nima neposrednega stika z živili, npr. na blagajni).

V primeru omejitev dela pri klicenoscih s *S. aureus* se odpira tudi vprašanje spremljanja klicenoštva pri zaposlenih z živili, saj so lahko le prehodni klicenosci. Zaradi ciljanega sledenja *S. aureus* je smiselno tudi spremljati, katere osebe so sodelovale pri pripravi živila, ki ga vzorčimo.

Pri vseh pozitivnih vzorcih živil in brisih določimo tudi prisotnost SE. V vsakem primeru naj velja: pri pripravi hrane vedno postopamo tako, kot da smo klicenosci.

ZAKLJUČEK

Stafilokokne zastrupitve z živili se pojavljajo v obratih javne prehrane, kot tudi v domačih kuhinjah in ostajajo javnozdravstveni problem tudi v Sloveniji. Preprečevanje temelji na dobri higieni in pravilnih postopkih dela z živili. S pravilnimi postopki dela preprečimo navzkrižno in naknadno onesnaženje živil, zagotovimo, da so živila pravilno toplotno obdelana in da je upoštevana hladna oz. topla veriga. Rezultati epidemioloških raziskav kažejo, da so najpogostejši vzroki za zastrupitve s stafilokoknim toksinom napake v postopkih dela z živili *(8, 9, 19)*. Izobraževanje in kontinuirano usmerjeno ter delovnemu mestu prilagojeno usposabljanje zaposlenih v živilski dejavnosti je zato nujno.

Pri zaposlenih, pri katerih ugotovimo klicenoštvo s *S. aureus*, praviloma ne priporočamo nobenih posebnih omejitev pri delu, temveč le dosledno izvajanje ukrepov za preprečevanje zastrupitev s SE (upoštevanje osnovnih higienskih postopkov za varnost živil v skladu z načeli sistema HACCP, izobraževanje zaposlenih v živilski dejavnosti o preprečevanju okužb in zastrupitev z živili s *S. aureus*). Klicenoscem pa delo z živili delno omejimo takrat, ko se kljub izvajanju ukrepov ponavljajo pozitivni brisi in vzorci živil na *S. aureus*. Izredno pomembno je tudi informiranje in priprava poljudnih gradiv o higieni in pravilnih postopkih dela z živili za splošno javnost oz. potrošnike. Z namenom pravilne in enotne obravnave klicenoscev SA bi bilo potrebno pripraviti nacionalne strokovne smernice za obravnavo klicenoscev, zaposlenih v živilski dejavnosti.

LITERATURA

1. Johler S, Giannini P, Jermini M, et al. Further evidence for staphyloccocal food poisoning outbreaks caused by egc-encoded enterotoxins. Toxins (Basel). 2015; 7: 997–1004.
2. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, and food-borne outbreaks in 2012. EFSA Journal [internet]. 2014 [citirano 2015 Jul 15]; 12 (2): 3547. Dosegljivo na: http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3547.html
3. Grmek - Košnik I, Mueller - Premru M, Seljak M, et al. Analiza epidemije stafilokokne zastrupitve z živili. Zdrav Vestn. 2000; 69: 439–43.
4. Grmek - Košnik I, Krt Lah A, Dermota U, et al. Obravnava izbruha stafilokokne zastrupitve s hrano v osnovni šoli. Zdrav Varst. 2014; 53 (2): 168–78.
5. NIJZ. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji, letna poročila [internet]. 2002–14. [citirano 2015 Jun 29]. Dosegljivo na: http://www.nijz.si/epidemiolosko-spremljanje-nalezljivih-bolezni-letna-porocila
6. Stafilokoki v živilih. Priporočila za zaposlene v živilski dejavnosti [internet]. [citirano 2015 Jun 29]. Dosegljivo na: http://www.ivz.si/Mp.aspx/?ni=23&pi=5&_5_Filename=attName.png&_5_MediaId=6419&_5_AutoResize=false&pl=23-5.3
7. Roberts TA, Cordier JL, Gram L, et al. Microorganisms in Foods 6. Springer US; 2005.
8. U. S. Food and Drug Administration. Big Bad Bug Book. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook [internet]. 2nd ed. Silver Spring (MD); c2012 [citirano 2015 Jun 29]. Dosegljivo na: http://www.fda.gov/food/foodsafety/foodborneillness/foodborneillnessfoodbornepathogensnaturaltoxins/badbugbook/default.html
9. Marolt - Gomišček M, Radšel - Medvešček A. Infekcijske bolezni. Ljubljana: Tangram; 2002.
10. Šimac N, Pohar M, Veninšek - Perpar I. Higiena živil v nosečnosti. In: Novak Antolič Ž, Kogovšek K, Rotovnik Kozjek N, et al, eds. Klinična prehrana v nosečnosti. Ljubljana: Center za razvoj poučevanja, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani; 2015. p. 317–26.
11. Pohar M. Dobra higienska praksa. In: Raspor P. Priročnik za postavljanje in vodenje sistema HACCP. Ljubljana: Slovenski inštitut za kakovost in meroslovje, Biotehniška fakulteta; 2002. p. 3–15.

12. Logar M. Bakterijske zastrupitve s hrano. In: Tomažič J, Strle F. Infekcijske bolezni. 1st ed. Ljubljana: Združenje za infektologijo; 2014. p. 347–8.
13. Heyman DL. Control of Communicable Diseases Manual. 19th. ed. Washington (DC): American Public Health Association; 2008.
14. Zakon o nalezljivih boleznih 2006. Uradni list RS št. 33/2006.
15. Pravilnik o prijavi nalezljivih bolezni in posebnih ukrepih za njihovo preprečevanje 1999. Uradni list RS št. 16/99.
16. Direktiva 2003/99/ES Evropskega parlamenta in Sveta o spremljanju zoonoz in povzročiteljev zoonoz.
17. Nacionalni inštitut za javno zdravje. Priporočila za obravnavo izbruha ali suma na izbruh zaradi zastrupitve s stafilokoknim enterotoksinom – algoritem ukrepanja [internet]. [citirano 2015 Jun 29]. Dosegljivo na: http://www.nijz.si
18. World Health Organisation. Foodborne Disease Outbreaks: Guidelines for investigation and control. [internet] 2008 [citirano 2015 Jun 29]. Dosegljivo na: http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/outbreak_guidelines.pdf
19. Osnovna higienska stališča za higieno živil, namenjena delavcem v živilski dejavnosti [internet]. 2015 [citirano 2007 Jun 29]. Dosegljivo na: http://www.nijz.si/osnovna-higienska-stalisca-za-higieno-zivil-namenjena-delavcem-v-zivilski-dejavnosti
20. Nacionalni inštitut za javno zdravje. Higienska stališča za higieno živil, namenjena delavcem v živilski dejavnosti – 2. stopnja [internet]. 2015 [citirano 2007 Jun 29]. Dosegljivo na: http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/datoteke/higienska_stalisca_za_higieno_zivil_namenjena_delavcem_v_zivilski_dejavnosti_2._stopnja_2014_verzija_2.pdf
21. Centers For Disease Control and Prevention. Cover Your Cough. Dosegljivo na: http://www.cdc.gov/flu/protect/covercough.htm
22. Pollak P, Mehikić D, Klun N, et al. Smernice dobre higienske prakse in uporabe načel HACCP v gostinstvu, Ljubljana: Turistična gostinska zbornica pri Gospodarski zbornici Slovenije, Sekcija za gostinstvo in turizem pri Obrtno-podjetniški zbornici Slovenije, 2010.
23. Food and Drug Administration. Food Code 2013 [internet]. 2013 [citirano 2007 Jul 1]. Dosegljivo na: http:/www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/FoodCode/UCM374510.pdf
24. Food and Drug Administration. Employee Health and Personal Hygiene [internet]. 2011 [citirano 2015 Jul 1]. Dosegljivo na: http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/IndustryandRegulatoryAssistanceandTrainingResources/UCM194575.pdf
25. Pravilnik o zdravstvenih zahtevah za osebe, ki pri delu v proizvodnji in prometu z živili prihajajo v stik z živili 2003. Uradni list RS št. 82/2003.

Peter Kordiš[1*], Veronika Grilj[2], Rok Grilj[3], Tadeja Kotar[4]

Okužbe prebavil po vrnitvi iz tropov

Gastrointestinal Infections in Returned Travelers from the Tropics

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: prebavni trakt, popotnik, tropske bolezni, potovalna driska

Potovalna driska je najpogostejša zdravstvena težava ljudi na poti in po vrnitvi domov ter glede na območje potovanja prizadene 30–70 % ljudi. Etiološko obolenje opredelimo le v tretjini primerov, največkrat je vzrok bakterijska okužba. V večini primerov gre za blago, samoomejujočo bolezen, pri kateri je glavnega pomena skrb za dobro hidracijo in počitek. Za zdravljenje z antibiotikom in zdravili za zaviranje peristaltike se odločimo glede na stopnjo klinične slike. Kadar težave vztrajajo več tednov, gre za perzistentno ali kronično drisko, ki potrebuje nadaljnjo diagnostično obravnavo in usmerjeno zdravljenje po opredelitvi težav. Diferencialno diagnostično je potrebno pomisliti na številne bolezni, najpogosteje pa so vzrok težavam okužbe s paraziti, ki zahtevajo protimikrobno zdravljenje. V preglednem članku predstavljamo najpogostejše vzroke okužb na potovanju in po vrnitvi iz tropov, algoritem za obravnavo bolnika s potovalno drisko ter priporočene preiskave pri perzistentni in kronični driski. Edukacija popotnikov ter preventivni ukrepi na potovanju so izjemnega pomena.

ABSTRACT

KEY WORDS: gastrointestinal tract, traveler, tropical diseases, travelers' diarrhea

Travelers' diarrhea is the most common illness in persons travelling abroad in tropics and after returning home. It is estimated that 30–70% of travelers develop gastrointestinal diseases, most commonly due to bacterial infections. However, etiology is identified only in about a third of cases. A great majority of infections are mild and self-limiting, requiring solely rest and hydration. A therapy with antibiotics and antimotility agents is sometimes needed depending on the clinical manifestations. When problems do not resolve in a few weeks, additional diagnostic tools are necessary in assessing persistent or chronic diarrhea, which requires targeted treatment. Although differential diagnosis is broad in scope, a parasitic infection is the most common cause of problems and the use of antimicrobial agents is warranted after the identification of the pathogen. In this review article, we focus on a frequent eti-

[1*] Peter Kordiš, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana; pkordis@gmail.com

[2] Veronika Grilj, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1104 Ljubljana

[3] Rok Grilj, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1104 Ljubljana

[4] Asist. mag. Tadeja Kotar, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana; tadejakotar@hotmail.com

ology of travel-related gastrointestinal infections, present an assessment algorithm for travelers' diarrhea and discuss the suggested diagnostic tools used in persistent or chronic diarrhea. Education of travelers and preventive measures are of upmost importance.

UVOD

Tvegani načini potovanja na oddaljene in eksotične destinacije so vse pogostejši in popotniki se večkrat srečujejo z različnimi, v zahodnem razvitem svetu manj običajnimi, mikroorganizmi. Poleg turistov in poslovnežev, ki se podajajo na potovanje, narašča število beguncev in ekonomskih migrantov z enosmerno vozovnico v Evropo in njihovemu zdravstvenemu stanju se bomo morali posvetiti tudi v Sloveniji. Tveganje za obolevnost na potovanju je višje, kadar potujemo v predele z veliko nalezljivimi boleznimi, slabo precepljenostjo prebivalstva, slabimi higienskimi razmerami in pomanjkanjem kakovostne medicinske oskrbe. Po izsledkih raziskav ima med enomesečnim potovanjem po tropskih in subtropskih krajih 20–75 % popotnikov težave povezane z zdravjem. Večina je blagih, okoli 5 % jih poišče zdravniško pomoč, pri 1 % pa je potrebno zdravljenje v bolnišnici *(1–6)*. Vodilni vzrok obolevnosti med popotniki je driska (36 %), sledijo okužbe dihal (21 %) in druge okužbe (5 %), neinfekcijski vzroki (2 %), nesreče (7 %) ter piki žuželk (12 %) *(6–8)*.

Najpogostejši zdravstveni problem pri ljudeh na potovanju ali po vrnitvi domov je potovalna driska, ki prizadene 30–70 % popotnikov, odvisno od potovalnega cilja *(9)*. Obolevajo predvsem ljudje, ki iz razvitejših držav potujejo v države v razvoju. Analiza podatkov obolenj pri popotnikih, ki jo je opravil Freedman s sodelavci, prikazuje povezavo med kontinenti oz. regijami potovanja s pogostostjo bolezni in pričakovanimi povzročitelji *(3)*.

Na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja letno obravnavamo 300–400 bolnikov, pri katerih je bil postavljen sum na bolezen, povezano s potovanjem. Narašča število obravnavanih ljudi, ki so dalj časa bivali v tropih, in otrok, posvojenih iz tropskih držav. Podobno kot nakazujejo ugotovitve tujih raziskav, je tudi v Sloveniji najpogostejša zdravstvena težava popotnikov med potovanjem in po vrnitvi potovalna driska (bakterijske okužbe, paraziti – najpogosteje *Giardia*) *(5, 6)*. Na drugem mestu je malarija, sledijo pa prizadetost kože in podkožja, okužbe dihal, okužbe sečil, denga, trebušni tifus in paratifus, virusni hepatitisi in spolno prenosljive bolezni. Natančna anamneza potovanj je zelo pomembna, saj se nekatere bolezni klinično izrazijo več mesecev do več let po vrnitvi iz tropov (npr. amebni jetrni absces), bolniki pa nanje pogosto pozabijo oziroma jih ne povezujejo z aktualnimi težavami.

POTOVALNA DRISKA

Prebavne težave so najpogostejši vzrok za obisk pri zdravniku po povratku iz tropov, saj predstavljajo kar 40 % zdravstvenih težav bolnikov *(9)*. Definicija potovalne driske ob prisotni epidemiološki anamnezi je odvajanje tekočega blata vsaj trikrat dnevno in pridruženost vsaj enega izmed naslednjih simptomov: slabost, bruhanje, vročina, abdominalna bolečina, krči, urgenca pri odvajanju, tenezmi ali prisotnost sveže krvi na blatu *(10)*. Glavni neodvisni napovedni dejavnik za potovalno drisko je področje, kamor potujemo, razlike so tako v etiologiji kot v tveganju *(9, 11)*. V grobem lahko svet razdelimo na tri območja *(9, 11)*:

- območja z nizkim tveganjem, kamor spadajo ZDA, Kanada, Avstralija, Nova

Zelandija, Japonska, severna in zahodna Evropa,
- območja s srednjim tveganjem, kamor spadajo južna Afrika, vzhodna Evropa in nekateri od Karibskih otokov ter
- območja z visokim tveganjem, kamor spada večji del Azije, deli Srednjega vzhoda, Afrika, centralna in južna Amerika.

Med povzročitelji potovalne driske prevladujejo bakterije, ki so vzrok v 80–90 % primerov okužb, virusi v 5–8 %, paraziti pa v okoli 10 % *(9)*. Med bakterijami je najpogostejši povzročitelj potovalne driske enterotoksigena *Escherichia coli* (ETEC), sledijo *Campylobacter jejuni, Shigella* spp. in *Salmonella* spp. *(9, 11–13)*. Med številnimi vrstami virusov prevladujejo okužbe, povzročene z norovirusi, rotavirusi in astrovirusi. Norovirusi so zaradi nizkega inokulacijskega števila, potrebnega za povzročitev bolezni, najpogostejši povzročitelji gastrointestinalnih okužb na križarjenjih in dolgih poletih; poleg driske je v ospredju klinične slike tudi bruhanje *(11)*. *Giardia lamblia* je glavni povzročitelj potovalne driske med paraziti *(9)*. V večini naštetih primerov gre za vodeno drisko, redkeje pride do krvave driske ali dizenterije; takrat največkrat izoliramo *Shigella* spp., *C. jejuni* ali invazivne seve *E. coli (11, 12)*.

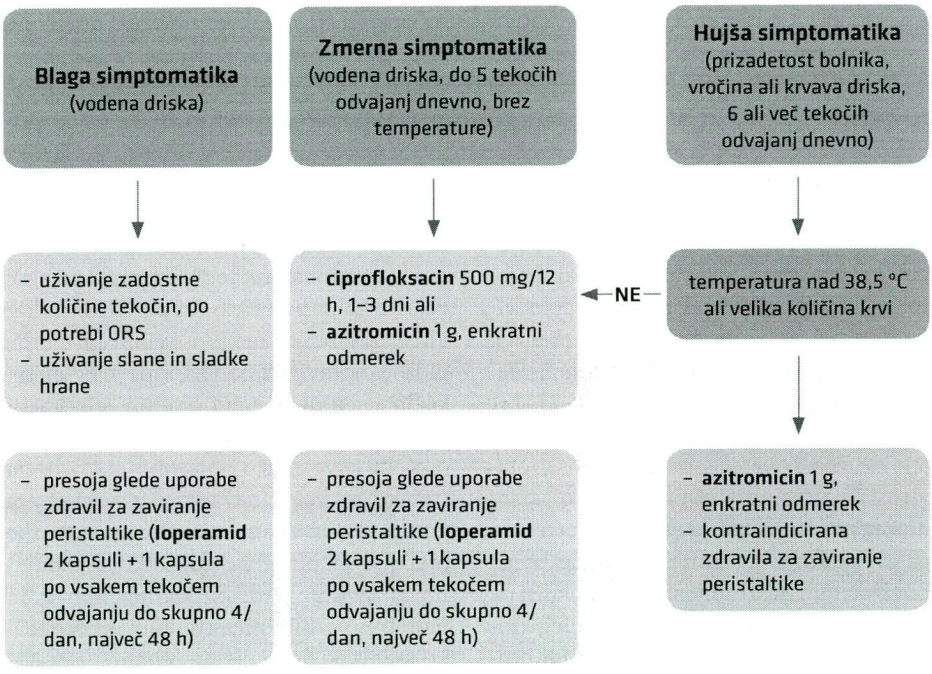
V klinični praksi uspemo povzročitelja prebavnih težav po vrnitvi s potovanja mikrobiološko dokazati le v okoli 30 %, največkrat etiološka opredelitev niti ni potrebna, saj gre v večini primerov za samoomejujočo bolezen *(12)*. Najpogosteje kot povzročitelja dokažemo parazite (v 65 % etiološko opredeljenih primerov), redkeje bakterije (31 %) in viruse (3 %). V 70 % etiološko opredeljenih okužb prebavil pri popotnikih prevladuje šest organizmov: *Giardia* spp., *Campylobacter* spp., *Entamoeba histolytica, Shigella* spp., *Strongyloides* in *Salmonella* spp. *(14)*.

PRISTOP K BOLNIKU S POTOVALNO DRISKO

Le na osnovi klinične slike ne moremo sklepati o povzročitelju okužbe prebavil. Za diagnostične postopke se zaradi samoomejujoče narave bolezni odločimo le pri hujših oblikah bolezni, okužbah pri imunokompromitiranih bolnikih ali ob vztrajanju simptomov *(15)*. V poštev pridejo osnovne laboratorijske preiskave (hemogram, elektroliti v serumu, ledvični retenti) ter mikrobiološki pregled blata (koprokultura, pregled blata na parazite in izjemoma pregled blata na viruse). V prvi vrsti je potrebno preprečiti in zdraviti dehidracijo, kar je v večini primerov možno opraviti z zadostnim vnosom tekočin ter z uživanjem oralnih rehidracijskih raztopin; parenteralno nadomeščanje tekočin je le redko potrebno *(13, 15)*. Po tretjem tekočem odvajanju in vsaj enem izmed pridruženih simptomov okužbe prebavil je potrebno presoditi o zdravilih, ki zavirajo peristaltiko (loperamid), in morebitni antibiotični terapiji, ki dokazano skrajšajo trajanje simptomov (slika 1) *(11, 12)*. V večini primerov je prva izbira antibiotičnega zdravljenja ciprofloksacin, ob zmerni simptomatiki navadno zadošča že enodnevna terapija *(12, 16)*. Pri potovanju v jugovzhodno Azijo, kjer beležimo visok odstotek odpornosti bakterije *C. jejuni* proti fluorokinolonom (45 %), se priporoča antibiotično zdravljenje z azitromicinom *(12, 17, 18)*. Slednji je prva izbira tudi pri nosečnicah in doječih mamah *(12, 16)*. Izrednega pomena je smotrna uporaba antibiotikov pri blažjem poteku potovalne driske. Kadar sumimo na invazivno okužbo, tj. ob visoko povišani telesni temperaturi in krvavi driski, so zdravila za zaviranje peristaltike kontraindicirana *(11, 12, 15, 16)*. Študije govorijo proti uporabi probiotikov pri driski, zato jih odsvetujemo *(19)*.

Zapleti po potovalni driski so redki, vendar kot pri driskah v domačem okolju

prisotni. Razvije se lahko reaktivni artritis, sindrom Guillain-Barré, hemolitično-uremični sindrom, včasih pride do prizadetosti črevesja v obliki malabsorpcije ali sindroma iritabilnega črevesa *(20–23)*.



Slika 1. Algoritem obravnave bolnika s potovalno drisko *(11, 12, 15, 16)*. ORS – oralna rehidracijska raztopina (angl. *oral rehydration solution*).

Vztrajanje simptomov – perzistentna ali kronična driska

V primeru okužbe prebavil virusne ali bakterijske etiologije simptomi v 2–7 dneh v večini primerov izzvenijo; kadar težave trajajo dalj časa gre za perzistentno (14 dni) ali kronično drisko (1 mesec) *(9, 24)*. Prevladujejo simptomi, kot so trebušni krči, napihnjenost, vetrovi, slabost in urgenca pri odvajanju blata, lahko so prisotni tudi glavobol, bolečine v sklepih in huda utrujenost *(24)*. Kronična driska predstavlja 10–17 % vseh obiskov zdravnika ob povratku *(2)*.

Najpogostejši vzrok kronične driske so paraziti, prevladuje *Giardia lamblia* *(24)*. Kronične težave so lahko tudi posledica zaporednih okužb z različnimi povzročitelji potovalne driske, včasih pa driska vztraja zaradi sočasne okužbe z dvema povzročiteljema *(21)*. Najverjetneje podcenjen vzrok kronične driske je okužba s *Clostridium difficile* pri popotnikih, ki so že bili zdravljeni z antibiotikom, in pri tistih, ki so prejemali antimalarično zaščito z doksiciklinom *(21, 24)*. Okužbi s *C. difficile* v državah v razvoju so podvrženi tudi tisti, ki so bili v stiku s slabšim zdravstvenim sistemom (prenos z bolnika na bolnika je pogost zaradi pomanjkanja zaščitnih sredstev) ali v tesnem stiku z živalmi. Majhni otroci in zdravi odrasli so v tretjem svetu pogosto asimptomatski prenašalci te bakterije, kar naj bi bilo ključno za

pogostejši prenos zunajbolnišnične okužbe in okužbe pri popotnikih *(25)*.

Vztrajanje prebavnih težav ima tudi neinfekcijske vzroke. Potovalna driska je v redkih primerih sprožilni dejavnik prve manifestacije kronične vnetne črevesne bolezni ali celiakije, kar vodi v podaljšanje klinične slike kljub ustreznemu ukrepanju *(21)*. Včasih je vzrok perzistentne driske enteropatija, ki sledi okužbi prebavil in je posledica patoloških sprememb sluznice in bakterijske flore (atrofija sluznice, malabsorpcija), kar vodi v osmotsko drisko *(21, 22)*. Za postavitev diagnoze postinfekcijske enteropatije je potrebna izključitev vseh prej naštetih vzrokov bolnikov težav *(23)*.

Pristop k bolniku s kronično drisko

Zaradi dolge inkubacijske dobe in pogosto sprva blage klinične slike pri okužbah s paraziti moramo pridobiti izčrpno osebno anamnezo. Pri amebnem jetrnem abscesu lahko do pojava simptomov mine več mesecev, redkeje tudi več let *(26)*. Bolnik s kronično drisko naj odda tri vzorce blata za mikroskopski pregled na jajčeca in parazite, glede na anamnestične podatke tudi blato na toksin *C. difficile* in kulturo *(21)*. Kadar sumimo na okužbo s parazitom, se ne odločamo za takojšnje zdravljenje ob prvem pregledu, temveč zdravimo usmerjeno po dokazu povzročitelja *(21)*. Če etiologije ne uspemo opredeliti, poskusimo z empiričnim zdravljenjem z metronidazolom 400 mg/8 h, 5–10 dni *(16, 21)*. Pri enteropatiji, ki sledi po zdravljenju akutne okužbe, je včasih potrebna le ureditev prehrane z zadostnim zaužitjem kalorij, povečanjem vnosa vlaknin in kalija ter uživanjem probiotikov *(23)*.

Giardiaza

Do okužbe z *Giardio lamblio* pride po zaužitju že manjšega števila cist (10–25), ki se nahajajo v kontaminirani vodi ali hrani, redkeje je vzrok fekalno-oralni prenos *(27)*. V državah tretjega sveta je kronično okuženih 20–30 % prebivalcev, ki ciste izločajo z blatom *(28)*. Klinična slika je raznolika; v polovici primerov pride do samoomejujoče asimptomatske okužbe, 5–15 % bolnikov pa do šest mesecev in več izloča ciste brez pridruženih simptomov *(29)*. V preostalih primerih se okužba izrazi z akutno ali kronično drisko s steatorejo, malabsorpcijo in izgubo telesne teže. Pogosto prevladujejo simptomi zgornjih prebavil. Če je ne zdravimo, lahko simptomi vztrajajo več mesecev, tudi pri imunsko kompetentnem gostitelju. Terapija izbora je metronidazol, vendar je v nekaterih predelih sveta (predvsem Indija) možna neuspešnost zdravljenja ali relaps *(16, 30, 31)*. V takem primeru je smiselna napotitev k infektologu, ki se bo odločil za uporabo katerega izmed drugih zdravil (albendazol, paramomicin) ali dvotirno protimikrobno terapijo *(31)*.

Amebni jetrni absces

Podobno kot pri giardiazi se s parazitom *Entamoeba histolytica* okužimo z zaužitjem cist. Značilno več okužb je pri tistih, ki so na potovanju dalj časa (šest mesecev in več). Trofozoiti v debelem črevesju povzročijo simptomatsko okužbo v 10–20 % primerov z vodeno ali krvavo drisko, abdominalnimi bolečinami in redkeje vročino *(32, 33)*. V okoli 5 % primerov pride do hematogenega širjenja bolezni z nastankom amebnega abscesa, najpogosteje jetrnega; takrat se poleg vročine pojavi tudi bolečina pod desnim rebrnim lokom. Ob sumu na jetrni absces je poleg seroloških preiskav za opredelitev pomembna morfološka diagnostika z ultrazvokom ali računalniško tomografijo *(33)*. Amebozo zdravimo z metronidazolom in zatem s paramomicinom, izpraznitev abscesne votline pa je potrebna le v primeru kolekcij, večjih od 10 cm, ali v diagnostične namene *(34)*. Asimptomatski nosilci morajo biti prav tako zdravljeni s paramomicinom za

preprečevanje klicenoštva in napredovanja v simptomatsko okužbo *(16)*.

ZAKLJUČEK - »PREKUHAJ, PREVRI, OLUPI ALI PUSTI«

Pojav gastrointestinalnih težav na potovanju je v veliki meri povezan z načinom potovanja in skrbi za preventivo. Slednja se začne že pred odhodom v tujino s poučenjem o destinaciji, ustreznim cepljenjem in antimalarično profilakso. Protimikrobna zdravila za potovalno lekarno popotnikom predpišemo le v primeru potovanja v odročne kraje in v kolikor smo prepričani v smotrno uporabo s strani popotnika *(35)*. Med potovanjem je najboljše preventivno ukrepanje upoštevanje navodila »prekuhaj, prevri, olupi ali pusti«.

LITERATURA

1. Leder K, Torresi J, Brownstein JS, et al. Travel-associated illness trends and clusters, 2000-2010. Emerg Infect Dis. 2013; 19 (7): 1049–73.
2. Rendi-Wagner P, Schwartz E. Epidemiology of Post-Travel Illnesses. In: Schwartz E. Tropical diseases in travellers. 1st ed. Hoboken: Blackwell publishing; 2009. p. 13–26.
3. Freedman DO, Weld LH, Kozarsky PE, et al. Spectrum of disease and relation to place of exposure among ill returned travelers. N Engl J Med. 2006; 354 (2): 119–30.
4. Harvey K, Esposito DH, Han P, et al. Surveillance for Travel-Related Disease – GeoSentinel Surveillance System, United States, 1997-2011. MMWR Surveill Summ. 2013; 62 (SS-03): 1–23.
5. Ansart S, Perez L, Vergely O, et al. Illnesses in travelers returning from the tropics: a prospective study of 622 patients. J Travel Med. 2005; 12 (6): 312–8.
6. Ryan ET, Wilson ME, Kain KC. Illness after international travel. N Engl J Med. 2002; 347 (7): 505–16.
7. Ericsson CD. Travellers' diarrhoea. Int J Antimicrob Agents. 2003; 21 (2): 116–24.
8. Steffen R, Tornieporth N, Clemens SA, et al. Epidemiology of travelers' diarrhea: details of a global survey. J Travel Med. 2004; 11 (4): 231–7.
9. Connor BA. Travelers' Diarrhea [internet]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2011 [citirano 2015 Sep 18]. Dosegljivo na: http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2012/chapter-2-the-pre-travel-consultation/travelers-diarrhea
10. Von Sonnenburg F, Tornieporth N, Waiyaki P, et al. Risk and aetiology of diarrhoea at various tourist destinations. Lancet. 2000; 356 (9224): 133–4.
11. De la Cabada Bauche J, Dupont HL. New Developments in Traveler's Diarrhea. Gastroenterol Hepatol (NY). 2011; 7 (2): 88–95.
12. De Saussure PP. Management of the returning traveler with diarrhea. Therap Adv Gastroenterol. 2009; 2 (6): 367–75.
13. Lima AA. Tropical diarrhoea: new developments in traveller's diarrhoea. Curr Opin Infect Dis. 2001; 14 (5): 547–52.
14. Ross AG, Olds RG, Cripps AW, et al. Enteropathogens and chronic illness in returning travelers. N Engl J Med. 2013; 368 (19): 1817–25.
15. Thielman NM, Guerrant RL. Clinical practice. Acute infectious diarrhea. N Engl J Med. 2004; 350 (1): 38–47.
16. Čižman M, Beović B. Kako predpisujemo protimikrobna zdravila v bolnišnicah. Ljubljana: Sekcija za protimikrobno zdravljenje Slovenskega zdravniškega društva; 2013.
17. Vlieghe ER, Jacobs JA, Van Esbroeck M, et al. Trends of norfloxacin and erythromycin resistance of Campylobacter jejuni/Campylobacter coli isolates recovered from international travelers, 1994 to 2006. J Travel Med. 2008; 15 (6): 419–25.
18. Tjaniadi P, Lesmana M, Subekti D, et al. Antimicrobial resistance of bacterial pathogens associated with diarrheal patients in Indonesia. Am J Trop Med Hyg. 2003; 68 (6): 666–70.
19. Salari P, Nikfar S, Abdollahi M. A meta-analysis and systematic review on the effect of probiotics in acute diarrhea. Inflamm Allergy Drug Targets. 2012; 11 (1): 3–14.

20. Connor BA, Riddle MS. Post-infectious sequelae of travelers' diarrhea. J Travel Med. 2013; 20 (5): 303–12.
21. Connor BA. Persistent Travelers' Diarrhea [internet]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2013 [citirano 2015 Sep 18]. Dosegljivo na: http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2012/chapter-5-post-travel-evaluation/persistent-travelers-diarrhea
22. Ochoa TJ, Salazar-Lindo E, Cleary TG. Management of children with infection-associated persistent diarrhea. Semin Pediatr Infect Dis. 2004; 15 (4): 229–36.
23. Connor BA. Sequelae of traveler's diarrhea: focus on postinfectious irritable bowel syndrome. Clin Infect Dis. 2005; 41 Suppl 8: S577–86.
24. Schwartz E, Connor BA. Approach to Patients with Post-Travel Diarrhea. In: Schwartz E, ed. Tropical Diseases in Travelers. Houston: Blackwell Publishing; 2009. p. 361–9.
25. Neuberger A, Saadi T, Shetern A, et al. Clostridium difficile infection in travelers – a neglected pathogen? J Travel Med. 2013; 20 (1): 37–43.
26. Knobloch J, Mannweiler E. Development and persistence of antibodies to Entamoeba histolytica in patients with amebic liver abscess. Analysis of 216 cases. Am J Trop Med Hyg. 1983; 32 (4): 727–32.
27. Rendtorff RC. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. Giardia lamblia cysts given in capsules. Am J Hyg. 1954; 59 (2): 209–20.
28. Halliez MC, Buret AG. Extra-intestinal and long term consequences of Giardia duodenalis infections. World J Gastroenterol. 2013; 19 (47): 8974–85.
29. Ali SA, Hill DR. Giardia intestinalis. Curr Opin Infect Dis. 2003; 16 (5): 453–60.
30. Minenoa T, Avery MA. Giardiasis: recent progress in chemotherapy and drug development. Curr Pharm Des. 2003; 9 (11): 841–55.
31. Gardner TB, Hill DR. Treatment of Giardiasis. Clin Microbiol Rev. 2001; 14 (1): 114–28.
32. Roy SL. Amebiasis [internet]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2011 [citirano 2015 Sep 18]. Dosegljivo na: http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/amebiasis
33. Wright SG. Protozoan infections of the gastrointestinal tract. Infect Dis Clin North Am. 2012; 26 (2): 323–39.
34. Chavez-Tapia NC, Hernandez-Calleros J, Tellez-Avila FI, et al. Image-guided percutaneous procedure plus metronidazole versus metronidazole alone for uncomplicated amoebic liver abscess. Cochrane Database Syst Rev. 2009; (1): CD004886.
35. Kotar T. Potovalna medicina in izbrana poglavja iz tropske medicine. In: Tomažič J, Strle F, eds. Infekcijske bolezni. Ljubljana: Združenje za infektologijo, Slovensko zdravniško društvo; 2014. p. 475–503.

Janez Tomažič[1*], Mateja Pirš[2], Miha Skvarč[3]

Driska pri bolnikih z imunsko motnjo

Diarrhea in Immunocompromised Patients

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: driska, bolniki z imunsko motnjo

Bolniki z imunsko motnjo imajo zelo pogosto težave zaradi driske, ki ima večkrat hud potek in je povezana s povečano obolevnostjo in pogostejšimi hospitalizacijami. Vzroki driske so podobni kot pri osebah, ki so imunsko zdrave, vendar pa so določene posebnosti; večja pojavnost oportunističnih okužb in redkih povzročiteljev drisk; večja verjetnost kronične driske; driske, povezane z zdravili; razvoja bolezni presadka proti gostitelju; nevtropeničnega enterokolitisa; popresaditvene limfoproliferativne bolezni in nekaterih rakavih bolezni. Pri tovrstnih bolnikih je pomembno poznati vzroke želodčno-črevesnih bolezni, ker je ključna pravočasna in pravilna diagnostika ter zdravljenje. V članku je prikazana specifična epidemiologija, etiologija, stopenjska diagnostika (algoritem) in zdravljenje tovrstnih bolnikov.

ABSTRACT

KEY WORDS: diarrhea, immunocompromised patients

Diarrhea is a very common complaint among immunocompromised patients and tends to run a more severe course and results in higher rates of morbidity and hospitalisation. The causes of diarrhea in immunocompromised and immunocompetent populations are similar but there are some specific differences; there is a higher incidence of opportunistic infections, or rare causes of diarrhea, higher likelihood for the development of chronic infection, medication-induced diarrhea, development of graft-versus-host disease, neutropenic enterocolitis, posttransplantat lymphproliferative disease and some malignancies. It is important to become familiar with the causes of gastrointestinal diseases in this population because prompt and proper diagnostics and treatment is of essence in this patient group. This review focuses on specific epidemiology, cause, diagnostic evaluation (stepwise algorithm) and treatment for these individuals.

[1*] Prof. dr. Janez Tomažič, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana; janez.tomazic@kclj.si

[2] Asist. dr. Mateja Pirš, dr. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

[3] Asist. dr. Miha Skvarč, dr. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

UVOD

V primerjavi z driskami pri imunsko zdravih osebah je driska pri bolnikih z imunsko motnjo (IM) pogostejša, poteka huje in je povezana s pogostejšimi hospitalizacijami ter večjo smrtnostjo. Pri tovrstnih bolnikih se etiologija driske značilno razlikuje od driske pri imunsko zdravih, huje pa potekajo tudi driske, povzročene z običajnimi črevesnimi patogeni (salmonele, kampilobaktri, šigele, norovirusi itd.) (tabela 1, 2) *(1)*. Pogosto so povzročiteljice oportunistične okužbe, vendar moramo poleg infekcijskih vzrokov misliti tudi na neinfekcijske bolezni, kot so npr. bolezen presadka proti gostitelju (angl. *graft-versus-host disease*, GVHD), nevtropenični enterokolitis in popresaditvena limfoproliferativna bolezen (angl. *posttransplant lymphoproliferative disease*, PTLD), ki se pojavljajo samo pri tovrstnih bolnikih, ter na drisko, povezano z določenimi (imunosupresivnimi) zdravili *(2, 3)*. Pri bolnikih z IM in drisko je zelo pomembno sodelovanje s kliničnimi mikrobiologi, diagnostika je pogosto stopenjska, včasih pa so potrebne tudi invazivne diagnostične metode. Zelo pomembna je tudi bolnišnična higiena *(4, 5)*. V prispevku so opisani najpomembnejši povzročitelji/vzroki drisk pri osebah z IM s poudarkom na posebnostih pri tovrstnih bolnikih.

DRISKA PRI BOLNIKIH, KI SO OKUŽENI Z VIRUSOM HUMANE IMUNSKE POMANJKLJIVOSTI

Najpogostejši vzrok drisk v obdobju pred učinkovitim protiretrovirusnim zdravljenjem (PRZ) so bile oportunistične okužbe. V obdobju PRZ so najpogostejši vzroki driske protiretrovirusna zdravila, med okužbami pa so dandanes najpogostejše salmonele, *Clostridium difficile* (CD) in virusi; oportunisti, kot so netuberkulozne mikobakterije, *Mycobacterium tuberculosis* (MT), paraziti, glive ipd. pa so dandanes redki povzročitelji drisk *(6, 7)*.

Pri diagnostiki je pomembna klinična ocena HIV/aidsa (koncentracije celic CD4, virusno breme), pregled zdravil, ki jih bolnik prejema, mikrobiološki pregled blata ter posebno pri kronični driski s hujšanjem tudi endoskopske preiskave z biopsijami *(8)*.

NEINFEKCIJSKI VZROKI DRISKE PRI OSEBAH, OKUŽENIH Z VIRUSOM HUMANE IMUNSKE POMANJKLJIVOSTI

Pri bolnikih s hujšo IM (manj kot 100–200 CD4/mm^3) gre lahko za idiopatsko aids enteropatijo, drisko lahko povzročajo rakave bolezni (npr. limfom, Kaposijev sarkom) ali bolezni trebušne slinavke; diagnozo »idiopatska aids enteropatija« ali »HIV-enteropatija« postavimo, ko izključimo infekcijske in druge možne vzroke driske. Najbolj je prizadet jejunum z atrofijo resic in hiperplazijo kript. Gre za neposredne učinke samega virusa: takoj po primarni okužbi virus uniči najpomembnejše imunske celice v mezgovničnem tkivu črevesja (črevesne celice CD4), posledično pa pride do kronične translokacije črevesnih bakterij in do imunske aktivacije in posledičnega kroničnega vnetja. Nevrotropne lastnosti virusa HIV lahko povzročijo generalizirano avtonomno nevropatijo s posledično drisko. Pri osebah, okuženih s HIV, so dandanes najpogostejši vzrok driske PRZ (najpogosteje zaviralci proteaze), kar ima lahko za posledico tudi opustitev zdravljenja *(1, 9)*.

Tabela 1. Infekcijski vzroki driske pri bolnikih z imunsko motnjo *(1)*. LGV – limfogranuloma venereum.

Bakterije	*Salmonella* spp. *Shigella* spp. *Campylobacter* spp. *Clostridium difficile* patogene *Escherichia coli* *Chlamydia trachomatis* – LGV
Mikobakterije	*Mycobacterium avium complex* *Mycobacterium tuberculosis*
Paraziti	*Cryptosporidium* spp. *Giardia duodenalis* *Cystoisospora belli* *Entamoeba histolytica* *Blastocystis hominis* *Cyclospora cayetanensis* *Strongyloides stercoralis*
Virusi	virus citomegalije norovirusi adenovirusi rotavirusi virus herpesa simpleksa humani virus imunske pomanjkljivosti
Glive	*Microsporidia* *Candida* spp. *Histoplasma*
Drugo	nevtropenični enterokolitis

Tabela 2. Neinfekcijski vzroki driske pri bolnikih z imunsko motnjo *(2)*. HIV – humani virus imunske pomanjkljivosti, aids – sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti, PKMC – presaditev krvotvornih matičnih celic.

Driska, povezana s HIV	idiopatska aids enteropatija rakave bolezni (limfom, Kaposijev sarkom) protiretrovirusna zdravila
Driska, povezana z zdravili	antibiotiki azatioprin kemoterapija mikofenolat mofetil ciklosporin A sirolimus takrolimus metotreksat
Bolezen presadka proti gostitelju	po alogenični PKMC po avtologni PKMC po presaditvi čvrstih organov po transfuziji krvi
Drugo	kronična črevesna vnetna bolezen glutenska enteropatija idiopatski enteritis/kolitis po-presaditvena limfoproliferativna bolezen

INFEKCIJSKA DRISKA PRI BOLNIKIH Z DRUGIMI IMUNSKIMI MOTNJAMI

Večje tveganje za hude želodčno-črevesne (gastrointestinalne – GIT) okužbe obstaja tudi pri bolnikih z drugimi IM, kot so primarne IM; bolnikih z rakavimi boleznimi, ki prejemajo kemoterapijo, glukokortikoide in biološka zdravila; bolnikih, ki se zdravijo z različnimi drugimi imunosupresivnimi zdravili; bolnikih s HIV/aidsom; prejemnikih presadkov in pri osebah po odstranitvi vranice. Tudi pri bolnikih s kroničnimi boleznimi, kot so sladkorna bolezen, alkoholizem, podhranjenost itd., potekajo tovrstne okužbe pogosto huje *(1–5)*. Potek običajnih bakterijskih povzročiteljev drisk je pri tovrstnih bolnikih pogosto hujši, zato je tudi režim zdravljenja drugačen (tabela 3) *(10)*.

BAKTERIJSKE OKUŽBE

Pri bolnikih z IM, ki prebolevajo infekcijsko drisko, povzročeno z običajnimi povzročitelji, kot so npr. netifoidne salmonele, kampilobaktri, moramo vedno misliti na možnost sistemske okužbe, zato je treba poleg mikrobiološkega pregleda blata bolniku vzeti tudi kri za hemokulture. V zadnjih letih se je diagnosticiranje bakterijskih povzročiteljev drisk z uporabo novih molekularno-mikrobioloških metod (MBM), še posebno s hkratnim verižnim pomnoževanjem s polimerazo (angl. *multiplex polymerase chain reaction*, PCR), s katerim lahko sočasno dokazujemo različne patogene, izboljšalo. To velja predvsem za *Escherichia coli*, ki povzročajo drisko (npr. enteropatogene *E. coli* in *E. coli*, ki izločajo Šiga toksin), pa tudi kampilobaktre, salmonele in CD, in

sicer z 18,5 % na 50 % *(1, 3, 11)*. Kljub napredku, ki ga omogočajo MBM, pa je kultivacija bakterijskih povzročiteljev driske nujna, saj so lahko nekateri povzročitelji bakterijske driske odporni proti običajnim izkustveno izbranim antibiotikom. Izstopajo predvsem kampilobaktri *(Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli*), ki so lahko v skoraj dveh tretjinah primerov odporni proti fluorokinolonom, prav tako pa zmanjšana občutljivost za fluorokinokone ni zanemarljiva pri salmonelah (20 %) *(12)*.

Campylobacter spp.

Pri bolnikih z IM lahko včasih (redko) pride do bakteriemije/sepse. Najpogostejši izvor je v trebuhu. Bolezen poteka z vročino, bolečino v trebuhu in drisko, redko pa z respiratornimi simptomi in poškodbo mehkih tkiv *(13)*.

Salmonella spp.

Bakteriemije/sepse z netifoidnimi salmonelami in žariščnimi zasevki so opisane pri prejemnikih presadkov in tudi pri drugih bolnikih z IM. Bolezen se kaže kot febrilna driska s septičnim potekom; driska je lahko tudi odsotna *(14)*.

Chlamydia trachomatis

C. trachomatis je redka povzročiteljica driske, vse bolj pa postaja pomembna pri osebah, okuženih s HIV, pri katerih lahko povzroči ulcerativni rektokolitis (analni spolni odnosi), ki posnema Crohnovo bolezen (*C. trachomatis serovari* L1 do L3; najpogostejši je L2b – amsterdamska različica). Gre za spolno prenosljivo okužbo limfogranuloma venereum (LGV), kjer lahko pride tudi do sistemskega razsoja. Poleg seroloških testov je za diagnostiko pomembno pridobiti kužnino predvsem iz prizadetih bezgavk, v primeru prizadetosti črevesne sluznice, pa se lahko odvzame tudi biopt sluznice za MBM (PCR) v kombinaciji s kultivacijo *(15)*.

Mycobacterium spp.

MT in netuberkulozne mikobakterije, predvsem *Mycobacterium avium complex* (MAC), lahko povzročajo GIT-okužbe. Drisko povzročajo predvsem MAC v sklopu razsejane okužbe pri osebah z aidsom; najbolj prizadene tanko črevo. Bolezen se kaže z vročino, izgubo telesne teže, nočnim potenjem, utrujenostjo, vodenimi driskami (v blatu ni levkocitov), malabsorbcijo, limfodenopatijo, hepatosplenomegalijo, anemijo in povečanimi krvnimi testi za oceno delovanja jeter. Najbolj prizadet je dvanajsternik. Za diagnozo je pogosto potrebna biopsija dvanajsternika ali tankega črevesja (lahko obstaja podobnost z Whipplovo boleznijo), mikobakterije pa lahko najdemo tudi v blatu in krvi *(1)*.

Clostridium difficile

CD je med najpogostejšimi povzročitelji driske pri osebah z IM. Pogosto gre za nosokomialno okužbo, ko se bolniki okužijo s sporami, ki kontaminirajo roke zdravstvenih delavcev, pa tudi bolnišnične površine in inštrumente. Med dejavniki tveganja za simptomatsko okužbo s CD je najpomembnejša izpostavitev antibiotikom, pomembna pa so tudi zdravila, ki zmanjšujejo želodčno kislost, bolnikova starost, kronične osnovne bolezni, kirurški posegi itd. Predhodna kemoterapija in drugi vzroki IM povečajo dovzetnost za okužbo s CD in povzročajo hujši potek bolezni. Dodatno povečanje smrtnosti povzročijo nekateri t. i. hipervirulentni oziroma epidemični sevi CD (BI-NAP1-027). Pri bolnikih z IM, še posebej, če prejemajo glukokortikoide, je večja nevarnost ponovitve bolezni.

Laboratorijska diagnostika temelji na dokazovanju toksina v vzorcu blata z encimsko-imunskimi testi ali MBM in na dokazu povzročitelja v kulturi. Zlati standard ostaja dokaz citotoksičnosti na celičnih kulturah, vendar je metoda zahtevna in zamudna in se izvaja le v posameznih referenčnih laboratorijih.

Pri zdravljenju ukinemo/zamenjamo (nepotrebna) protimikrobna zdravila, preverimo morebitno hipogamaglobulinemijo, za neposredno zdravljenje pa imamo na voljo metronidazol, vankomicin in fidaksomicin ter transplantacijo fekalne mikrobiote *(1–5, 16)*.

Tabela 2. Zdravljenje običajnih bakterijskih povzročiteljev drisk pri osebah z imunsko motnjo *(10)*. I – izbrani antibiotik, A – alternativni antibiotik, IM – imunska motnja, PO – *per os*, IV – intravensko.

Bolezen, bolnik/povzročitelj		Antibiotik, odmerek	Trajanje zdravljenja (dni)
Salmonella spp. (netifusne salmonele)	I	ciprofloksacin 750 mg/24 h ali levofloksacin 500 mg/24 h PO	14 dni[a]
bolniki z IM, ki so v nevarnosti zaradi zapletov	A	TMP/SMX 160/800/12 h PO azitromicin 500 mg/24 h PO	
bakteriemični potek	I	ceftriakson 2 g/24 h IV	vsaj 14 dni
	A	ciprofloksacin 400 mg/12 h IV	
Shigella spp. *Yersinia enterocolitica* *Vibrio parahemolyticus* *Aeromonas* spp. *Plesimonas* spp.	I	azitromicin 500 mg/24 h PO ciprofloksacin 750 mg/24 h ali levofloksacin 500 mg/24 h PO	7–10 dni[b]
	A	ceftriakson 2 g/24 h IV	
Campylobacter jejuni	I	azitromicin 500 mg/24 h PO	14 dni[c]
	A	eritromicin 500 mg/6 h PO	

[a] Antibiotiki ne vplivajo na potek driske, preprečujejo pa bakteriemičen potek.
[b] Antibiotiki skrajšajo potek bolezni in izločanje bakterije.
[c] Če gre pri okužbi s *Campylobacter* spp. za bakteriemijo, je potrebno prolongirano vsaj 14-dnevno zdravljenje. Opisano je uspešno zdravljenje z makrolidnimi antibiotiki, s ceftriaksonom, aminoglikozidi ali karbapenemi.

VIRUSNE OKUŽBE

Virus citomegalije (CMV)

Pri bolnikih z IM, še posebej pri bolnikih z aidsom in prejemnikih presadkov (največja nevarnost je, ko je darovalec CMV seropozitiven, prejemnik pa CMV seronegativen: D+/P–), je CMV med možnimi in pogostimi povzročitelji driske. CMV lahko prizadene vse dele GIT, najpogosteje pa povzroči kolitis (mejno povečana vročina, izguba telesne teže, bolečine v trebuhu, krvava driska, anoreksija). Lahko povzroči tudi fulminantni kolitis, apendicitis ali pa poslabša kronično vnetno črevesno bolezen, posebno ob sočasnem zdravljenju z glukokortikoidi. Sum na CMV kolitis postavimo na temelju klinične slike in morebitne viremije (lahko je odsotna), dokončno diagnozo pa postavimo s kolonoskopijo in biopsijo. Za zdravljenje imamo na voljo ganciklovir, valganciklovir in foskarnet, v primeru odpornih CMV pa pride v poštev zdravljenje s cidofovirom, leflunomidom, artesunatom in eksperimentalnimi zdravili (brincidofovir, maribavir, letermovir) *(17–19)*.

Norovirus

Norovirusi so najpogostejši povzročitelji nebakterijskega gastroenterokolitisa. Prenašajo se fekalno-oralno, preko okužene hrane/vode ter nosokomialno (fekalno-oralno, stik z okuženimi površinami, inhalacija aerosola ob bruhanju). Pri bolnikih z IM, še posebno pri kemoterapiji in po PKMC, lahko povzročijo hudo življe-

nje ogrožajočo akutno drisko, pri številnih bolnikih z IM, predvsem pri prejemnikih čvrstih organov (PČO), pa lahko povzročijo dolgotrajno kronično drisko; razmnoževanje in izločanje virusov z blatom lahko traja več kot eno leto. Pri osebah z IM in akutno ali kronično drisko je treba vedno pomisliti tudi na noroviruse, ker se tako izognemo nepotrebnemu zdravljenju z antibiotiki in pogosto tudi nepotrebni invazivni diagnostiki. Diagnozo postavimo na temelju pregleda blata (PCR, elektronska mikroskopija), treba pa je izključiti tudi druge povzročitelje driske. Učinkovitega zdravljenja ni, opisani so primeri zdravljenja s favipiravirom, ribavirinom, interferonom alfa, oralnimi/intravenskimi imunoglobulini, še največ uspeha pa je z nitazoksanidom in materinim mlekom; včasih je potrebno zmanjšati imunosupresijo *(20–22)*.

OKUŽBE, KI JIH POVZROČAJO PRAŽIVALI IN HELMINTI

Driske, povzročene s paraziti pri bolnikih z IM, se razlikujejo od drisk pri osebah, ki so imunsko zdrave: trajajo dlje časa, pogosto se izmenjujejo obdobja driske in zaprtosti, niso samoomejejoče in pogosto pride do hude izgube telesne teže, v primeru okužbe s *Strongyloides stercoralis* pa tudi do velike izgube krvi in slabokrvnosti. Povzročitelji so paraziti, ki povzročijo drisko tudi pri imunsko zdravih osebah (*Giardia duodenalis, Entamoemba histolytica, Blastocystis hominis, Cryptosporidium* spp.), ali oportunisti, ki navadno pri zdravih osebah ne povzročijo bolezni (*S. stercoralis, Cystoisospora belli, Cyclospora cayetanensis* itd.). Večina s paraziti povzročenih drisk (okužbe z *G. duodenalis, B. hominis, Cryptosporidium* spp.) nastane v domačem okolju, ko bolniki z IM jejo doma pridelano hrano ali pijejo vodo iz vaških ali zasebnih zajetij, ki niso v sistemu stalnega mikrobiološkega nadzora. Kontaminirana voda se lahko pojavi tudi v oddaljenih krajih, če leži izvir v npr. kraškem svetu. *E. histolytica* pa tudi *C. cayetanensis* sta endemični v tropskih in subtropskih področjih, zato je pri bolnikih z IM zelo pomembna tudi epidemiološka anamneza; okužba v Sloveniji je zelo malo verjetna. Okužbe s *C. cayetanensis* se navadno pojavljajo v izbruhih in so povezane z zaužitjem sveže hrane, pridelane na velikih plantažah, ki pa ni toplotno obdelana. Pri diagnosticiranju drisk, ko mislimo na parazite, velja, da diagnostika temelji na jemanju količinsko večjih in številčnejših vzorcev blata, saj se paraziti izločajo intermitentno, ne vsak dan in ne ob vsakem iztrebljanju. Parazite v blatu je potrebno transportirati v posebnih posodicah, ki vsebujejo konzervans, da se ohranijo vegetativne oblike. Ciste lahko preživijo tudi krajši transport brez konzervansa. V primeru *Cryptosporidium* spp. velja pravilo, da mora biti blato vsaj 18 ur v 10 % formalinu ali konzervansu na osnovi alkoholov, da postanejo ciste, ki so visoko infektivne, manj kužne *(23)*.

Kriptosporidioza

Večina simptomatskih okužb pri človeku povzročita *Cryptosporidium parvum* in *Cryptosporidium hominis*, večinoma pri osebah z IM in pri otrocih, ki so mlajši od 5 let. V našem območju je velika večina okužb povzročenih s *C. parvum*, ki je zoonoza. Vir okužbe so teleta z drisko. Povprečno je na leto prijavljenih okoli 10 primerov tovrstnih drisk. Kriptosporidiji večinoma prizadenejo tanko črevo in lahko povzročijo hud prolongiran enteritis. Prizadenejo lahko tudi dihala in žolčne poti. Povzročijo lahko kronično drisko, poslabšajo kvaliteto življenja in skrajšajo preživetje pri osebah, okuženih s HIV.

Diagnozo postavimo s specifičnimi barvanji blata. Redno se za detekcijo oocist uporablja direktna imunofluorescenca (DIF) in zelo redko barvanje s safraninom. Metoda DIF je zelo občutljiva in specifična, saj temelji na monoklonskih protitelesih.

PCR v realnem času se uporablja redko; ko je vzorec biopsija tankega črevesja ali rektuma in če je potrebno razjasniti dvomljive izsledke. Ostala barvanja in tudi serološke metode za odkrivanje antigena so manj občutljive metode in jih v Sloveniji ne uporabljamo pri diagnostiki kriptosporidioze. Pri zdravljenju je najpomembnejše, da izboljšamo celično posredovano imunost (npr. PRZ pri aidsu), na voljo imamo še paramomicin in nekoliko bolj učinkovito zdravilo nitazoksanid *(24, 25)*.

Giardia duodenalis

Giardia duodenalis je najpogostejša praživál, ki povzroči okužbo pri človeku, kar velja tudi za Slovenijo. Osebe z IM so zelo dovzetne za tovrstne okužbe, še posebno osebe s primarno (prirojeno) IM, imenovano »splošna variabilna IM« (angl. »*common variable immunodeficiency*«, CVID). Pride lahko do kroničnih okužb proksimalnega dela tankega črevesja s posledično malabsorpcijo. Giardije dokažemo v blatu, kjer iščemo ciste in trofozoite. Potrebno je več vzorcev blata, da lahko dokažemo okužbo, saj se ciste izločajo intermitentno. Endoskopsko je malo sprememb, histološko so po barvanju vidni trofozoiti na luminalni površini, ki posnemajo padajoče listje. Za zdravljenje imamo na voljo metronidazol, albendazol, nitazoksanid in paramomicin. Pri bolnikih z IM je potrebno vsaj 10-dnevno zdravljenje z metronidazolom, če prvo zdravljenje ni uspešno, pa je potrebno razmišljati o dodatku albendazola *(1–3)*.

Cystoisosporiaza (nekdaj isosporiaza)

Pri osebah z IM lahko *Cystoisospora belli* povzroči obilno vodeno drisko, bruhanje, bolečine v trebuhu, izgubo telesne teže in dehidracijo; pogosto je potrebna hospitalizacija. V razvitem svetu je bilo največ primerov pri bolnikih z aidsom in prejemnikih ledvic in jeter. Bolezen je redka, v Sloveniji je opisan le en primer, vendar je zaradi težavne diagnostike morda bolezen pri nas nekoliko podcenjena. Za diagnozo je potreben pregled blata na jajčeca; potrebno je posebno barvanje, zato je treba mikrobiologa opozoriti na možnost tovrstne okužbe. Zdravimo z zdravilom trimetoprim/sulfametoksazol, pri alergiji na sulfonamide pa s ciprofloksacinom *(1–3)*.

Strongiloidoza

Bolezen je endemična v tropskih in subtropskih predelih, pa tudi v Evropi. Pri nas se pojavlja sporadično, večinoma pri zelo imunsko oslabelih bolnikih, ki prejemajo velike odmerke glukokortikoidov. Večina sprva brezsimptomnih okužb nastane pri bosonogi hoji po okuženi zemlji (lahko tudi pri nas) in, če pri tovrstnih osebah pride do hude IM (npr. do aidsa), se lahko pojavi strongiloidozni hiperinfekcijski sindrom in tudi avtoinfekcija; zanj je značilno povečanje število ličink v blatu, ki lahko predrejo steno debelega črevesja, ob tem lahko pride tudi do povečanega prestopanja (translokacije) bakterij v krvni obtok in posledične sepse, kar je povezano z večjo smrtnostjo. Ličinke se prebijejo do pljuč in nato preko dihalnih poti do požiralnika in tankega črevesja, kjer se razvijejo v odraslo žival. Najpogostejše klinične težave so povezane z GIT in se kažejo z nespecifičnimi simptomi in znaki: bolečine v trebuhu, driska, bruhanje, napenjanje in zaprtje. Bolezen lahko napreduje do paralitičnega ileusa, obstrukcije tankega črevesja, krvavitev iz črevesja in do enteropatije z izgubljanjem beljakovin. V obdobju migracije ličink lahko pride tudi do hudih respiratornih težav z dispnejo, hemoptizami, plevritično bolečino itd. Za diagnozo je potreben pregled blata na ličinke, ugotavljanje serumske eozinofilije in serološki testi (ELISA). V blatu ne moremo najti jajčec ali odraslih živali, saj se jajčeca že v debelem črevesju preobrazijo v ličinke, odrasli paraziti pa hitro raz-

padejo, ko se jih odstrani s stene črevesja. Najbolj občutljiva in specifična diagnostična metoda je pregled blata, ki ga še toplega nacepimo na agarsko ploščo ob bolniku. Po nekaj dneh iščemo na robu plošč ličinke, ki se hranijo z bakterijami, ki rastejo na agarju. Pri rokovanju z blatom domnevno okuženega bolnika moramo biti pazljivi, saj so ličinke kužne. Za zdravljenje imamo na voljo ivermektin, tiabendazol in albendazol *(26, 27)*.

OKUŽBE Z GLIVAMI

Mikrosporidioza

Glive iz rodu *Microsporidia* so znotrajcelični mikrobi, ki so bili nedavno prekvalificirani iz praživali v glive. Vse bolj pogosto se pojavljajo pri bolnikih z aidsom. Pri vseh ostalih, kot so prejemniki presadkov, in tudi pri starejših s kroničnimi boleznimi, je driska zaradi glive iz rodu *Microsporidia* izjemno redka. Najpomembnejša sta *Enterocytozoon bieneusi* in *Enteroytozoon intestinalis* (ta je najpogostejši). Pri bolnikih z aidsom, ki imajo kronično drisko, so v približno polovici primerov povzročitelji mikrosporidije. Gre za oportunistične patogene, ki povzročijo kronično vodeno drisko, izgubo telesne teže, bolečine v trebuhu, navzeo, bruhanje, vročino, sklerozirajoči holangitis in kolitis. Lahko povzročijo tudi diseminirane okužbe.

Zlati standard za diagnozo je pregled blata na mikrosporidije. Diagnostika je zelo zahtevna, potrebna so posebna barvanja. Ker je mikroskopiranje slabo občutljiva metoda, se vedno pogosteje uporablja PCR v realnem času. Mikrobiologa je treba opozoriti na tovrstno okužbo. Ker v Sloveniji ne izvajamo PCR-diagnostike, preusmerimo vzorec v najbližji referenčni center. Za zdravljenje se uporablja albendazol in fumagillin *(1–3)*.

Candida spp.

Posebno pri otrocih po presaditvi jeter, tankega črevesja in/ali pankreasa lahko pride do peritonitisa ali znotrajtrebušnega abscesa, kar pogosto spremlja tudi driska *(3)*. Pri bolnikih z IM, posebno pri zdravljenju z glukokortikoidi, lahko kandide povzročijo t. i. »glivno preraščanje tankega črevesja« (angl. *small intestine fungal overgrowth*), ki ga spremljajo različni GIT simptomi. Dva do tritedensko protiglivno zdravljenje je lahko uspešno, za potrditev tovrstnega zdravljenja pa so potrebne še kontrolirane klinične raziskave *(28)*.

NEINFEKCIJSKI VZROKI DRISK PRI OSEBAH Z IMUNSKO MOTNJO

Driska po presaditvi krvotvornih matičnih celic in po prejemu čvrstih organov

Poleg številnih infekcijskih vzrokov je driska pri tovrstnih bolnikih lahko posledica poškodb sluznic, ki so posledica mieloablacije, neželenih učinkov zdravil in črevesnega GVHD. Pri dolgotrajnem imunosupresivnem zdravljenju po PČO se lahko razvije PTLD, ki povzroči kronično drisko in izgubo telesne teže. Najpogostejši infekcijski zapleti po PKMC so okužbe s CD, norovirusi, adenovirusi, rotavirusi in coxsackie virusi, po PČO pa CMV in CD *(1–5)*.

Črevesna bolezen presadka proti gostitelju po alogenični presaditvi krvotvornih matičnih celic

Je najpogostejši vzrok driske pri tovrstnih bolnikih. Navadno se pojavi po več kot 15 dneh po presaditvi. GVHD povzročajo presajene imunske celice genetsko različnega darovalca, ki prepozna prejemnikovo tkivo kot tujek. Če se pri takem bolniku razvijejo tudi kožni izpuščaji (angl. *rash*) in motnje v delovanju jeter, je diagnoza GVHD zelo verjetna. Bolnik ima obilne vodene driske, enteropatijo z izgubljanjem beljakovin in krvavo drisko. Diagnoza temelji na biopsiji, običajno je prizadeto celotno črevesje, v 20 % pa le terminalni ileum. Zdravimo prvenstveno

z glukokortikoidi, lahko pa tudi s ciklosporinom, z antitimocitnim globulinom, budesonidom in biološkimi zdravili (anti-TNF) ali s kombinacijo omenjenih zdravil *(1–5)*.

Nevtropenični enterokolitis

Zanj sta značilni bolečina v trebuhu (najpogosteje desni spodnji kvadrant) in vročina. Najpogosteje se pojavi po kemoterapiji. Patogeneza ni povsem znana; pride do poškodb sluznic s posledično bakterijsko infiltracijo črevesne stene in nekroze. Vnetje je skoraj vedno v cekumu. Bolniki lahko umrejo zaradi sepse ali perforacije črevesja. CT trebuha pokaže zadebeljen in dilatiran cekum. Potrebno je zdravljenje z antibiotiki, totalno parenteralno prehrano in dejavniki za stimulacijo levkocitnih kolonij. V primeru perforacije ali vztrajne krvavitve je potrebna operacija *(29)*.

Sindrom kolitisa, povezanega s presaditvijo matičnih celic iz popkovnične krvi

Gre za kolitis z vztrajajočo nekrvavo vodeno drisko, izgubo telesne teže in vročino. Histološko gre za granulomatozno vnetje. Navadno je uspešno zdravljenje s fluorokinolonom in metronidazolom *(1–3)*.

Driska, povzročena z zdravili

Številna zdravila, ki jih prejemajo osebe z IM, lahko povzročijo drisko; med imunosupresivnimi zdravili je najpogostejši povzročitelj mikofenolat mofitil, driska pa je lahko tudi posledica zdravljenja s ciklosporinom A, takrolimusom in sirolimusom (tabela 2) *(1–3)*.

DIAGNOSTIKA DRISK PRI OSEBAH Z IMUNSKO MOTNJO

Driska, ki izvira iz tankega črevesja se navadno kaže z obilno vodeno postprandialno drisko in izgubo telesne teže, za kolitično drisko pa je značilno frekventno odvajanje majhnih količin blata s pogosto primesjo krvi ali sluzi. Driska je lahko posledica infekcijskih ali neinfekcijskih bolezni, zato moramo diagnostiko pri tovrstnih bolnikih pogosto zastaviti široko. Diagnostika je stopenjska (slika 1). Najprej moramo izključiti medikamentozne vzroke in ukiniti vsa ne-imunosupresivna zdravila, ki lahko povzročajo drisko, ali jih zamenjati z ustreznimi učinkovinami, ki nimajo teh neželenih učinkov. Sočasno izvajamo mikrobiološko diagnostiko drisk. Včasih je treba ukiniti/zamenjati tudi imunosupresivno zdravilo (npr. mikofenolat mofetil), vendar to navadno storimo, ko izključimo infekcijske vzroke. Zelo pomembno je, da kliničnega mikrobiologa opozorimo, da imamo bolnika s hudo IM, ki ima drisko. Sodelovanje je obojestransko. Klinik postavi sum na možne povzročitelje, mikrobiolog pa svetuje glede gojišča, načina odvzema kužnin, transporta kužnin, mikrobioloških metod itd.

Mikrobiološki pregled blata naj bo stopenjski, vključuje pa naj: kultivacijo bakterijskih patogenov, pregled na CD (hitra detekcija toksina in kultura), kultivacijo *E. coli*, ki povzročajo drisko (predvsem molekularno detekcijo verotoksinov), pregled blata na viruse (encimsko-imunski testi ali MBM) in parazite (ciste, jajčeca,) z mikroskopiranjem in MBM. Včasih je koristen pregled blata s hkratnim PCR-jem za najpomembnejše bakterijske, virusne in parazitarne patogene. Za diagnosticiranje določenih črevesnih zajedavcev so pomembne tudi serološke metode (npr. strongiloidoza). Za diagnosticiranje določenih patogenov (npr. parazitov) je potrebno večkrat vzeti večje količine blata v daljšem časovnem obdobju vsaj nekaj dni. Za določene infekcijske povzročitelje (npr. CMV, paraziti, mikobakterije) in za določene neinfekcijske vzroke (npr. GVHD, PTLD, rakave bolezni) pa so potrebne invazivne diagnostične preiskave (endoskopije, biopsije) (1–5).

Primarni nivo mikrobiološkega testiranja[1]	
Salmonella spp. *Shigella* spp. *Campylobacter* spp. *Yersina* spp.	kultivacija
E. coli – VTEC/STEC[2]	kultivacija + MBM
Clostridium difficile	EIA/MBM + kultivacija
Rotavirusi Adenovirusi 40/41 Norovirusi Astrovirusi	EIA MBM
Ciste in jajčeca parazitov *Giardia*/*Cryptosporidium*	mikroskopiranje DIF

Sekundarni nivo mikrobiološkega testiranja[1]	
Virus citomegalije	Plazma – MBM
Ciste in jajčeca parazitov[3]	mikroskopiranje
Cryptosporidium	MBM

Rezultati mikrobiološkega testiranja negativni + vztrajanje driske

1. prilagajanje imunosupresivnih zdravil – zmanjšanje odmerka/menjava zdravila
2. kolonoskopija +/– gastro(duodeno)skopija (+/– biopsija)
3. empirično zdravljenje s probiotiki ali antimotilitetnimi zdravila
4. ocena malabsorbcije

[1] lahko se izvede tudi MBM (hkratni PCR) za širok nabor bakterijskih, virusnih in parazitarnih črevesnih patogenov (v kombinaciji s kultivacijo bakterijskih patogenov)

[2] lahko se izvaja tudi detekcijo drugih *E. coli*, ki povzročajo drisko (pr. EHEC, EIEC, EPEC) s kultivacijo in MBM

[3] širši nabor potencialnih parazitarnih patogenov, vključno *Cystroisospore belli*, *Cyclospora cayetanensis*, *Microsporidia*

Slika 1. Stopenjski diagnostični algoritem drisk pri osebah z imunsko motnjo, prirejeno po *(5)*.

MBM – molekularno mikrobiološke metode, EHEC – enterohemoragična *E. coli*, EIEC – enteroinvazivna *E. coli*, EPEC – enteropatogena *E. coli*.

ZAKLJUČEK

Driska pri osebah z IM je posledica številnih infekcijskih in neinfekcijskih vzrokov. Ker gre lahko za oportunistične ali redke povzročitelje driske in ker je potrebna specifična mikrobiološka metodologija, je v diagnostičnem postopku pomembno sodelovanje klinika z mikrobiologom. Pomembna je tudi stopenjska mikrobiološka diagnostika, včasih pa je potrebna tudi invazivna diagnostika (endoskopije, biopsije). Vsi zdravniki, ki se ukvarjajo z bolniki z IM, morajo biti seznanjeni z: možnimi vzroki driske pri tovrstnih bolnikih, diagnostičnim algoritmom stopenjske diagnostike, ki je predstavljen v našem članku, in ustreznim zdravljenjem.

LITERATURA

1. Krones E, Hogenauer C. Diarrhea in the immunocompromised patient. Gastroenterol Clin North Am. 2012; 41: 677–701.
2. Lai KK, Lamps LW. Enterocolitis in immunocompromised patients. Semin Diagn Pathol. 2014; 31: 176–91.
3. Thom K, Forrest G. Gastrointestinal infections in immunocompromised hosts. Curr Opin Gastroenterol. 2006; 22: 18–23.
4. Danziger-Isakov L. Gastrointestinal infections after transplantation. Curr Opin Gastroenterol. 2014; 30: 40–6.
5. Angarone M, Ison MG. Diarrhea in solid organ transplant recipients. Curr Opin Infect Dis. 2015; 28: 308–16.
6. Feasey Na, Healey P, Gordon MA. Review article: the aetiology, investigation and management of diarrhea in the HIV-positive patient. Aliment Pharmacol Ther. 2011; 34: 587–603.
7. Knox TA, Spiegelman D, Skinner SC, et al. Diarrhea and abnormalities of gastrointestinal function in a cohort of men and women with HIV infection. Am J Gastroenterol. 2000; 95: 3482–9.
8. Kartalija M, Sande MA. Diarrhea and AIDS in the era of highly active antiretroviral therapy. Clin Infect Dis. 1999; 28: 701–5.
9. Cello JP, Day LW. Idiopathic AIDS enteropathy and treatment of gastrointestinal opportunistic pathogens. Gastroenterology. 2009; 136: 1952–65.
10. Čižman M, Beović B. Kako predpisujemo protimikrobna zdravila v bolnišnicah. Ljubljana: Sekcija za protimikrobno zdravljenje Slovenskega zdravniškega društva; 2013.
11. Coste JF, Vuiblet V, Moustapha B, et al. Microbiological diagnosis of severe diarrhea in kidney transplant recipients by use of multiplex PCR assays. J Clin Microbiol. 2013; 51: 1841–9.
12. Štrumbelj I, Berce I, Harlander T, et al. Pregled občutljivosti bakterij za antibiotike - Slovenija 2013 [internet]. 1st ed. Ljubljana: Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ); 2014 [citirano 2015 Oct 23]. Dosegljivo na: http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz
13. Fernandez-Cruz A, Munoz P, Mohedano R, et al. Campylobacter bacteremia: clinical characteristics. Incidence, and outcome over 23 years. Medicine (Baltimore). 2010; 89: 319–30.
14. Hohmann EL. Nontyphoidal salmonellosis. Clin Infect Dis. 2001; 32: 263–9.
15. van Nieuwkoop C, Gooskens J, Smit VT, et al. Lymphogranuloma venereum proctocolitis: mucosal T cell immunity of the rectum associated with chlamydial clearance and clinical recovery. Gut. 2007; 56: 1476–7.
16. Hosokawa K, Takami A, Tsuji M, et al. Relative incidences and outcomes of *Clostridium difficile* infection following transplantation of unrelated cord blood, unrelated bone marrow and relate peripheral blood in adult patients: a single institute study. Transpl Infec Dis. 2014; 16: 412–20.
17. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al. Transplantation Society International CMVCG. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. Transplantation. 2013; 96: 333–60.
18. Lumbreras C, Manuel O, Len O, et al. Cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. Clin Microbiol Infect. 2014; 20: 19–26.
19. Baroco AL, Oldfield EC. Gastrointestinal cytomegalovirus disease in the immunocompromised patient. Curr Gastroenterol Rep. 2008; 10: 409–16.
20. Ye X, Van JN, Munoz FM. Noroviruses as a Cause of diarrhea in immunocompromised pediatric hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients. Am J Transpl. 2015; 15: 1874–81.
21. Kaufman SS, Green KY, Korba BE. Treatment of norovirus infections: Moving antivirals from the bench to the bedside. Antiviral Research. 2014; 105: 80–91.
22. Bok K, Green KY. Norovirus gastroenteritis in immunocompromised patients. N Engl J Med. 2012; 367: 2126–32.
23. Lewthwaite P, Gill GV, Hart CA, et al. Gastrointestinal parasites in the immunocompromised. Curr Opin Infect Dis. 2015; 18: 427–35.
24. Checkley W, White AC, Jaganath D. A review of the global burden novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for cryptosporidium. Lancet Infect Dis. 2015; 15: 85–94.
25. Cabada MM, White AC. Treatment of cryptosporidiosis: do we know what we think we know? Curr Opin Infect Dis. 2010; 23: 494–9.

26. Roseman DA, Kabbani D, Kwah J. Strongyloides stercoralis transmission by kidney transplantation in two recipients from a common donor. Am J Transplant. 2013; 13 (9): 2483–6.
27. Roxby AC, Gottlieb GS, Limaye AP. Strongyloidiasis in transplant patients. Clin Infect Dis. 2009; 49; 1411–23.
28. Erdogan A, Rao SSC. Small intestinal fungal overgrowth. Curr Gastroenterol Rep. 2015; 17: 9–16.
29. Nesher L, Kenneth V, Rolston I. Neutropenic enterocolitis, a growing concern in the era of widespread use of aggressive chemotherapy. Clin Infect Dis. 2013; 56: 711–7.

Tatjana Lejko Zupanc[1*], Mateja Logar[2]

Črevesne bolnišnične okužbe

Nosocomial Gastrointestinal Infections

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: črevesne okužbe, driska, viri okužbe, higiena rok, preprečevanje okužb

Črevesne okužbe spadajo med pogostejše okužbe ne samo v bolnišnicah, ampak tudi v domovih za starejše občane. Večinoma jih povzročajo patogene črevesne bakterije in virusi. Najpomembnejši bakterijski povzročitelj driske v bolnišničnem okolju je *Clostridium difficile*. Med bakterijskimi povzročitelji driske v bolnišničnem okolju so tudi salmonele in kampilobaktri, med virusnimi povzročitelji pa rotavirusi in norovirusi. Viri okužbe so drugi pacienti, oboleli zdravstveni delavci in obiskovalci, lahko pa tudi pitna voda in hrana. Najpomembnejši ukrep preprečevanja prenosa črevesnih patogenov je ustrezna higiena rok. Zdravstveni zavodi morajo imeti na voljo mehanizme, s katerimi zagotavljajo neoporečno pitno vodo in hrano, ter pravila, ki predpisujejo načine preprečevanja prenosa črevesnih okužb. Zdravstveni delavec ne sme delati z bolniki, dokler ima simptome črevesne okužbe.

ABSTRACT

KEY WORDS: enteric infections, diarrhea, source of infections, hand hygiene, infection prevention

Gastrointestinal infections are among the most frequent healthcare-associated infections in hospitals and nursing homes. They are mostly caused by enteric pathogenic bacteria and viruses. *Clostridium difficile* is the most frequent bacterial cause of healthcare-acquired diarrhea. Other bacterial causes of diarrhea in hospitals include *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. Viral infections, especially norovirus and rotavirus, are also frequent. The sources of infection can be other patients, healthcare workers, visitors or drinking water and food. The most important preventive measure is stringent hand hygiene. Healthcare institutions are obliged to implement measures to ensure impeccable drinking water and safe food. There should be guidelines for preventing transmission of enteric infections. Healthcare workers with gastrointestinal infection should be excluded from work with patients whilst symptomatic.

[1*] Doc. dr. Tatjana Lejko Zupanc, dr.med., Služba za preprečevanje in bolnišničnih okužb Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana; tatjana.lejko@kclj.si

[2] Doc. dr. Mateja Logar, dr. med., Služba za preprečevanje in obvladovanje bolnišničnih okužb Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana

UVOD

Črevesne okužbe sodijo med pogostejše okužbe ne samo v bolnišnicah, ampak tudi v domovih za starejše občane (DSO). Driska je posledica sprememb v delovanju črevesa, definicije driske pa se med seboj razlikujejo. V klinični praksi govorimo o njej, kadar je spremenjena konsistenca blata (mehko, tekoče), povečana pogostost iztrebljanj (več kot trikrat v enem dnevu) ter povečan volumen blata. Izbruh infekcijske driske v zdravstveni ustanovi lahko prizadene paciente, zdravstvene delavce in obiskovalce. Ustrezen nadzor in takojšnja vzpostavitev ustreznih ukrepov lahko zmanjša obolevnost in smrtnost.

DEFINICIJA

Črevesna bolnišnična okužba je opredeljena kot driska (tri ali več odvajanj tekočega blata v 24 urah), ki se pojavi po 48 urah od sprejema v bolnišnico (obdobje je daljše, kadar sumimo na okužbo z bakterijami ali *Clostridium difficile*). Pomembno je poznati minimalno inkubacijsko dobo za posamezne povzročitelje drisk, saj le tako lahko potrdimo, da gre res za bolnišnično pridobljeno okužbo. Časovni interval med nastankom simptomov in sprejemom v bolnišnico mora biti daljši kot minimalna inkubacijska doba za posameznega povzročitelja. O bolnišnični okužbi lahko govorimo tudi takrat, ko so mikrobiološke preiskave ob sprejemu ali takoj po njem negativne, kasneje pa povzročitelja lahko dokažemo iz iztrebkov.

EPIDEMIOLOGIJA IN POVZROČITELJI

V nerazvitem svetu je incidenca bolnišnično pridobljene driske do 5 primerov na 1.000 bolniško oskrbnih dni. Najpogosteje so prizadeti otroci *(1)*. V razvitem svetu je incidenca nižja in znaša okrog 0,57 primerov na 1.000 bolniško oskrbnih dni *(2)*. Evropska presečna raziskava je pokazala, da je delež bolnišničnih črevesnih okužb 7,7 %; polovico so predstavljale okužbe s *C. difficile (3)*. Epidemiološke značilnosti mikroorganizmov, ki povzročajo črevesne okužbe v bolnišnici, so prikazane v tabeli 1. Večinoma so to virusi in patogene črevesne bakterije, možni povzročitelji pa so tudi enocelični paraziti (npr. kriptosporidiji). Najpomembnejši bakterijski povzročitelj driske v bolnišničnem okolju je *C. difficile*, ki povzroča od 15 do 30 % vseh epizod driske, povezane z antibiotiki. Vzrok za nastanek bolezenskih težav je z antibiotiki povzročena sprememba v sestavi telesu lastne črevesne mikrobiote. Zaradi tega lahko pride do razraščanja bakterije *C. difficile*, ki povzroči okvaro črevesne sluznice in drisko. *C. difficile* se z lahkoto prenaša v bolnišnicah in DSO. Več o driski, povzročeni s tem patogenom, je opisano na drugem mestu v tem zborniku *(4)*. Običajni bakterijski povzročitelji driske v domačem okolju lahko povzročajo izbruhe tudi v bolnišnicah in DSO, vendar so zaradi uvedbe ustreznih kontrolnih mehanizmov manj pogosti in se pojavljajo predvsem v manj razvitem svetu. Opisani so izbruhi okužb s salmonelami, kampilobaktri, jersinijami in patogenimi sevi bakterije *Escherichia coli (5)*. Enterotoksigena *E. coli* (ETEC) lahko prav tako povzroči bolnišnično drisko. V izbruhu v bolnišnici na Japonskem so v neonatalni enoti pri novorojenčkih z drisko dokazali 12 izolatov ETEC serotipa O128:H45 v štirimesečnem obdobju. Ti otroci so imeli bolnišnično pridobljeno drisko ali pa so imeli epidemiološko povezavo. Bolezen je povzročil specifični klon ETEC O128:H45-CS21-ST2332. Ta sev je bil odporen proti številnim antibiotikom, zlasti cefalosporinom tretje generacije *(6)*.

Virusne črevesne okužbe so med najpogostejšimi črevesnimi okužbami v bolnišnicah in DSO. Poglavitni virusni povzročitelji drisk v bolnišničnem okolju so rotavirusi in norovirusi. Epidemiologija, klinična slika in preprečevanje bolnišničnih virusnih okužbe je podrobno opisana v drugem prispevku *(7)*.

Tabela 1. Epidemiološke in klinične značilnosti okužb s pomembnimi bolnišničnimi povzročitelji driske.

Povzročitelj	Epidemiološke značilnosti/način prenosa	Klinične značilnosti
Clostridium difficile	najpogostejši povzročitelj bolnišničnih črevesnih okužb, navadno posamično, lahko epidemično, uporaba antibiotikov; natančen način prenosa ni znan	pogosta vročina, količne bolečine v trebuhu (hipogastrij) in slabost, redko bruhanje, tekočem blatu redko primešana kri in sluz
rotavirusi	epidemično, v glavnem pozimi, na otroških oddelkih, vrtcih, domovih za starejše občane, na oddelkih za starostnike; fekalno-oralni prenos, posredno in neposredno, z živili in vodo;	vročina, bruhanje, vodeno blato brez primesi sluzi in krvi; okužba je lahko tudi brezsimptomna, pri bolnikih s primarnimi in sekundarnimi motnjami v imunskem odzivu lahko povzroči kronični enteritis
norovirusi	epidemično (v glavnem pozimi) v družinah, ustanovah za nego, bolnicah, šolah ali na ladjah, prenos s kontaminirano hrano (školjke)	pogosto bolečine v trebuhu, bruhanje in slabost, možna vročina
salmonela	posamično ali epidemično skozi vse leto, največ pa v vročih poletnih in jesenskih mesecih, navadno prenos s kontaminiranimi živili (jajca, perutninsko meso) in vodo	pogosta vročina, bolečine v trebuhu in slabost, redko bruhanje, tekoče blato, ki mu je lahko primešana sluz in kri
kampilobakter	posamično ali epidemično, največ obolenj v poletnih mesecih, najpomembnejši način prenosa so kontaminirana živila (perutnina) in voda	pogosta vročina, količne bolečine v trebuhu (ileocekalno), lahko slabost in bruhanje, obilni tekoči iztrebki, običajno s primesjo sluzi in krvi

VIRI ČREVESNIH OKUŽB V BOLNIŠNIČNEM OKOLJU

V bolnišničnem okolju predstavljajo možne vire okužbe voda, hrana, drugi pacienti, zaposleni in obiskovalci. Bolnišnica mora imeti vzpostavljene ustrezne kontrolne mehanizme, ki možnosti okužbe zmanjšajo na minimum. Voda v bolnišnici mora ustrezati standardom, ki jih predpisuje Pravilnik o pitni vodi, in ne sme vsebovati koliformnih bakterij *(8)*. Tudi hrana mora ustrezati standardom in biti pripravljena na ustrezen način. Analiza tveganja in ugotavljanja kritičnih kontrolnih točk (angl. *Hazard Analysis Critical Control Point*, HACCP) je mednarodna metoda zagotavljanja varne prehrane. Določila HACCP so obvezna za vse pridelovalce krme za živino, poljedelce, živinorejce, transport, skladiščenje živil, gostince, trgovce z živili in predelovalno živilsko industrijo. Uporablja se na vseh stopnjah proizvodnje živil in postopkov priprave, vključno s pakiranjem in distribucijo. Vse pogosteje pa se uporablja tudi za neživilske panoge, kot npr. farmacevtska in kozmetična industrija, ter pri pripravi hrane v bolnišnicah *(9)*. Osebje, ki pripravlja hrano, mora upoštevati stroga higienska pravila. Delo pri pripravi hrane ni dovoljeno osebam, ki bruhajo, imajo drisko, zlatenico, bolečine v grlu in vročino ali kožne spremembe z izločkom.

VLOGA ZDRAVSTVENIH DELAVCEV PRI POJAVLJANJU ČREVESNIH OKUŽB V BOLNIŠNICI IN V DSO

Zaposleni lahko zbolijo za katerokoli prenosljivo boleznijo, so pa lahko tudi vir okužbe za bolnike. Preprečevanje pojava nalezljivih bolezni pri zdravstvenih delavcih (ZD) ima tri namene: zdravje ZD, preprečevanje omejitev pri delu in zmanjševanje pojavljanja z zdravstvom povezanih okužb. Vsi ZD morajo biti seznanjeni s tveganjem za nastanek okužbe in z načini prenosa kakor tudi z načinom preprečevanja. Tu predstavlja higiena rok in izvajanje standardnih previdnostnih ukrepov temelj za preprečevanje prenosa mikroorganizmov. V sistematskem pregledu veli-

kih izbruhov bolnišničnih okužb, ki so jih povzročili ZD, so identificirali 152 (v literaturi objavljenih) izbruhov v 26 državah. V teh izbruhih je zbolelo 1.449 bolnikov, od tega jih je umrlo 51. Več kot četrtina (42) izbruhov so predstavljale črevesne okužbe *(10)*. Prenos večine mikroorganizmov, ki povzročajo drisko, z ZD na pacienta poteka z neposrednim ali posrednim stikom. Najpomembnejši ukrep, ki ta prenos preprečuje, je natančna higiena rok, zlasti po uporabi stranišča. ZD z infekcijsko drisko ne sme skrbeti za bolnike, dokler simptomi črevesne okužbe ne izzvenijo. ZD so lahko brezsimptomni izločevalci salmonel ali kampilobaktrov med obdobjem rekonvalescence in tudi še kasneje. Testiranje na klicenoštvo ni povsem zanesljivo in je omejeno na tiste, ki neposredno delajo s hrano. Le redko je indicirana antibiotična eradikacija. V primeru norovirusnih izbruhov so ZD pomemben člen v širjenju okužb. Pogosto so tudi sami žrtev okužbe. Simptomi se lahko pojavijo šele po prihodu ZD na delo, ZD pa običajno ostanejo na delovnem mestu in tako širijo okužbo. Pri sumu na norovirusno okužbo je umivanje rok bolj priporočljivo kot razkuževanje z alkoholom.

PREPREČEVANJE ČREVESNIH OKUŽB V BOLNIŠNICI IN V DSO

Med učinkovite in obvezne ukrepe za preprečevanje črevesnih okužb spadajo:

- zagotavljanje varne pitne vode,
- priprava in ustrezno shranjevanje ter razdeljevanje varne hrane,
- nadzor in epidemiološko spremljanje pojavljanja črevesnih okužb,
- takojšnje ukrepanje ob sumu na izbruh,
- higiena rok (umivanje rok pri virusnih driskah in driski, ki jo povzroča *C. difficile*),
- ustrezno čiščenje in razkuževanje bolnikov okolice in pripomočkov (razkužila morajo biti sporocidna, kadar imamo opravka s *C. difficile*, in virucidna, kadar imamo opravka z virusnimi enteritisi),
- kontaktna osamitev obolelih s sumom na črevesno okužbo in
- odstranitev obolelih ZD od dela z bolniki.

Pri sumu na izbruh črevesne okužbe ne čakamo na mikrobiološke rezultate, ampak takoj izvedemo ukrepe kontaktne osamitve. Omejimo tudi gibanje zaposlenih, drugih pacientov in obiskovalcev. ZD posebej poučimo o pomenu higiene rok in poskrbimo za ustrezno čiščenje in razkuževanje pripomočkov in okolice.

Zaradi velikega števila možnih povzročiteljev je včasih težko ugotoviti, katere paciente je primerno osamiti. Z uporabo molekularnih mikrobioloških tehnik so v 22 % primerov ugotovili prisotnost vsaj enega črevesnega patogena pri bolnikih, ki so bili negativni na *C. difficile* ali rotaviruse. Šestdeset odstotkov bolnikov s črevesno okužbo niso ustrezno izolirali, 20 % bolnikom z negativnimi testi pa so lahko izolacijo ukinili *(11)*.

ZAKLJUČEK

Črevesne okužbe, povezane z zdravstveno oskrbo, so pogost problem, ki ga je možno preprečiti z upoštevanjem pravil, ki določajo pripravo varne hrane in oskrbo s pitno vodo. Higiena rok in kontaktna osamitev skupaj z doslednim razkuževanjem bolnikove okolice in pripomočkov pa so ukrepi, ki preprečujejo prenos okužbe s pacienta na ZD ali druge paciente. ZD in obiskovalci so lahko pomemben člen v verigi okužb, saj lahko zbolijo tudi sami.

LITERATURA

1. Bhuiyan MU, Luby SP, Zaman RU, et al. Incidence of and risk factors for hospital-acquired diarrhea in three tertiary case public hospitals in Bangladesh. Am J Trop Med Hyg. 2014; 91: 165–72.
2. Wolak Z, Walaszek MZ, Dobroś W, et al. Prevalence of gastrointestinal system infections acquired in provincial hospital in 2004-2013. Przegl Epidemiol. 2014; 68: 661–8.
3. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals [internet]. 2011–2012 [citirano 2015 Oct 16]. Dosegljivo na: http://ecdc.europa.eu/en/publications/_layouts/forms/Publication_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=865#sthash.YgAGUYuN.dpuf
4. Ribič H. Obvladovanje okužb z bakterijo Clostridium difficile v bolnišnicah. In: Petrovec M, ed. Okužbe prebavil. 7. Baničevi dnevi. 20. in 21. november 2015. Med Razgl. V tisku 2015.
5. Smith AM, Mthanti MA, Haumann C, et al. Nosocomial outbreak of Salmonella enterica serovar Typhimurium primarily affecting a pediatric ward in South Africa in 2012. Clin Microbiol. 2014; 52: 627–31.
6. Zeng M, Shi W, Chang H, et al. Clonal spread of enterotoxigenic Escherichia coli O128:H45 strain in the neonate units. Jpn J Infect Dis. V tisku 2015.
7. Mrvič T, Lejko - Zupanc T. Obvladovanje črevesnih virusnih okužb v bolnišnicah in ustanovah za kronično nego. In: Petrovec M, ed. Okužbe prebavil. 7. Baničevi dnevi. 20. in 21. november 2015. Med Razgl. V tisku 2015.
8. Pravilnik o pitni vodi [internet]. 2004 [citirano 2015 Oct 16]. Dosegljivo na: http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=200419&stevilka=865
9. Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) [internet]. 2015 [citirano 2015 Oct 16]. Dosegljivo na: http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/HACCP
10. Danzmann L, Gastmeier P, Schwab F, et al. Health care workers causing large nosocomial outbreaks: A systematic review. BMC Infect. Dis. 2013; 13: 98.
11. Rand KH, Tremblay EE, Hoidal M, et al. Multiplex gastrointestinal pathogen panels: implications for infection control. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015; 82: 154–7.

Tatjana Mrvič[1*], Tatjana Lejko Zupanc[2]

Obvladovanje črevesnih virusnih okužb v bolnišnicah in ustanovah za kronično nego

Control of Viral Enteric Infections in Hospitals and Long-Term Care Facilities

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: virusni gastroenteritis, bolnišnice, ustanove za kronično nego, izbruh, preprečevanje

Črevesne virusne okužbe so med najbolj pogostimi okužbami, ki v bolnišnicah in ustanovah za kronično nego povzročajo izbruhe. Večinoma povzročajo izbruhe okužbe z norovirusi in rotavirusi, v manjši meri pa tudi z adenovirusi 40/41, astrovirusi in sapovirusi. Zaradi različnih načinov širjenja in majhne infektivne doze lahko v kratkem času zboli veliko bolnikov in zdravstvenega osebja. Poleg poslabšanja osnovnega zdravstvenega stanja bolnikov in povečane smrtnosti so visoki tudi ekonomski in družbeni stroški. Za uspešno in hitro zajezitev izbruha je ključno dosledno upoštevanje osnovnih načel preprečevanja okužb v zdravstvu, ki vključujejo upoštevanje izolacijskih ukrepov, higieno rok, uporabo osebne varovalne opreme ter čiščenje/razkuževanje površin. Zaradi odpornosti virusov (zlasti norovirusov) na običajna razkužila, je potrebno pri teh okužbah, še posebej pa ob izbruhih, poskrbeti, da zaposleni poznajo in uporabljajo ustrezne postopke higiene rok (s poudarkom na umivanju rok z milom in vodo) ter razkužila za površine, ki dokazano delujejo proti črevesnim virusom, z upoštevanjem ustreznih koncentracij delovne raztopine in kontaktnega časa delovanja.

ABSTRACT

KEY WORDS: viral gastroenteritis, hospitals, long-term care facilities, outbreak, infection control

Viral gastrointestinal infections are among most common infections in hospitals and long-term care facilities causing outbreaks. Most outbreaks are caused by noroviruses and rotaviruses, less frequently adenoviruses 40/41, astroviruses and sapoviruses. Because of different ways of transmissions and small infectious doses, these viruses can infect many patients and health care workers in short time. Apart from deterioration in basic health state of patients and an increase in mortality, the outbreaks cause high economic and social costs. For a successful and rapid restraining of outbreaks it is imperative to follow the basic concepts in infection control, which include isolation precautions, hand hygiene, using personal protective equipment and cleaning/disinfection of surfaces. Because viruses (especially noroviruses) are resistant to most common

[1*] Asist. Tatjana Mrvič, dr. med., Služba za preprečevanje in obvladovanje bolnišničnih okužb, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana; tatjana.mrvic@kclj.si

[2] Doc. dr. Tatjana Lejko Zupanc, dr. med., Služba za preprečevanje in obvladovanje bolnišničnih okužb, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana

disinfectants, it is essential that the employees are introduced to and know how to use proper hand hygiene with an emphasis on washing hands with soap. It is also very important that they know which disinfectants are effective against these viruses and what are the appropriate concentrations of working solutions and the required contact time.

UVOD

Največ izbruhov v bolnišnicah in domovih za kronično nego povzročajo virusne okužbe dihal in prebavil. Ekonomsko breme teh izbruhov je veliko, poleg tega pa je zaradi specifične populacije (kronični bolniki, starostniki, dojenčki) potek teh okužb lahko težji in bolnike celo življenjsko ogrozi.

Med virusnimi črevesnimi okužbami največ izbruhov povzročajo norovirusi, ki so odgovorni za 50 % vseh primerov izbruhov in več kot 90 % ne-bakterijskih epidemičnih gastroenteritisov *(1)*. Izbruhi okužb se v razvitih državah v največji meri pojavljajo ravno v bolnišnicah in domovih za kronično nego, v manjšem obsegu pa tudi v vrtcih, šolah, restavracijah in na ladjah za križarjenje. V začetku so za izbruhe v glavnem krivili kontaminirano hrano, sedaj pa je že znano, da je glavni vir za širjenje okužb prenos z osebe na osebo *(2)*.

Kužnost norovirusov je zelo velika – za nastanek okužbe je potrebna majhna infektivna doza, poleg tega pa so tudi zelo stabilni v okolju. Vse to omogoča lahek prenos. Tudi načinov prenosa je več (kontaminirane roke, predmeti, površine, hrana). Poleg fekalno-oralnega prenosa pa k širjenju izbruhov še posebej prispevajo kontaminirani izločki v zraku, ki nastajajo ob bruhanju. Preživetje virusa je zelo dolgo. Opisani so primeri okužbe z virusom, ki je dva meseca preživel v vodi, nepoškodovano virusno kapsido pa so našli še po treh letih *(3)*.

Medtem ko norovirusi povzročajo okužbe in izbruhe v vseh starostnih skupinah, še posebej pri odraslih, pa so rotavirusne okužbe glavne bolnišnično pridobljene okužbe pri otrocih. Po raziskavi iz leta 2006, opravljeni v šestih državah v Evropi, so bil rotavirusi glavni etiološki dejavnik bolnišnično pridobljenih drisk pri otrocih, odgovorni kar za 31–87 % vseh primerov *(4)*. Pomembno vlogo pri preprečevanju rotavirusnih okužb v zadnjih letih (doma in pridobljenih v bolnišnici) vsekakor predstavlja uvedba cepljenja dojenčkov proti tem okužbam.

Poleg zgoraj omenjenih virusov črevesne okužbe pri otrocih povzročajo zlasti še adenovirusi 40/41 in astrovirusi. Po podatkih iz literature pri otrocih 15–28 % bolnišničnih virusnih črevesnih okužb sočasno povzroča več virusov *(5, 6)*. Sapovirusi so se izkazali za pomemben vzrok izbruhov virusnih črevesnih okužb zlasti v ustanovah za kronično nego *(7)*.

OBVLADOVANJE ČREVESNIH VIRUSNIH OKUŽB V BOLNIŠNICAH IN USTANOVAH ZA KRONIČNO NEGO

Zaradi lastnosti virusnih črevesnih okužb, da se pojavijo nenadoma in da je poleg driske pogost simptom tudi bruhanje, je preprečevanje širjenja teh okužb v bolnišničnem okolju oz. v ustanovah za kronično nego poseben izziv. V kratkem času lahko zboli veliko bolnikov in tudi negovalnega osebja. Priporočljivo je, da imajo zdravstvene ustanove in ustanove za kronično nego izdelan algoritem ukrepanja v primeru izbruha, saj je hitro in pravilno ukrepanje ključno za zajezitev izbruha.

Za izbruhe so značilni *(8)*:

- kratka inkubacija (15–48 ur),
- omejeno trajanje bolezni (12–60 ur),

- glavni simptom je bruhanje in
- prizadeti so bolniki in zaposleni.

Večina izbruhov je posledica neupoštevanja izolacijskih ukrepov pri prvem indeksnem simptomatskem bolniku. V kolikor posumimo na izbruh virusne črevesne okužbe, je potrebno odvzeti mikrobiološke preiskave za potrditev okužbe. Blato odvzamemo praviloma indeksnemu bolniku in nato še 1–2 bolnikoma, ki kažeta enake simptome okužbe. Za vse ostale zadostuje klinična diagnoza.

V bolnišnicah je potrebno poskrbeti, da vse bolnike, ki imajo ob sprejemu simptome bruhanja in driske, osamimo in po potrebi združujemo (kohortiramo). V kolikor uporabljajo sanitarije, morajo biti le-te namenjene samo njim. V ustanovah za kronično nego je ob pojavu simptomov pri oskrbovancih prav tako potrebno upoštevati ukrepe kontaktne izolacije in bolnike zadržati v njihovih sobah.

Zdravstveni delavci (ZD) morajo pri stikih z bolniki uporabljati osebno zaščitno opremo – rokavice za enkratno uporabo in plašče oz. predpasnike. Posebna skrb velja higieni rok, saj se večina okužb prenese na ta način. Ker virusi, ki povzročajo črevesne okužbe, nimajo ovojnice, so bolj odporni na alkoholna razkužila *(9)*. Zato se pri delu svetuje predvsem umivanje rok s tekočim milom in vodo po vsakem stiku z bolnikom, vključno po odstranitvi rokavic. Uporabljati moramo papirnate brisačke za enkratno uporabo. Če uporabljamo alkoholna razkužila za roke, morajo ta imeti ustrezna dokazila, da so v primeru norovirusnih okužb res učinkovita. Poleg koncentracije aktivne komponente (običajno etanola), je pomembna tudi vsebnost drugih sestavin *(10)*. V primeru, da bolniki bruhajo, naj ZD uporabljajo kirurške maske, ki jih varujejo pred izločki (tip IIR). Poskrbeti je potrebno tudi za redno in čim pogostejše zračenje prostorov, vrata bolniških sob pa morajo biti zaprta.

Posteljnino in perilo je treba bolnikom menjavati dnevno oz. takoj, ko se to umaže. Odstranjevanje in pospravljanje naj poteka na način, da je verjetnost razsoja virusov s kontaminiranega tekstila čim manjša.

Posebno pozornost moramo nameniti čiščenju/razkuževanju okolja. Običajna razkužila, ki jih uporabljamo, na noroviruse praviloma slabše ali pa sploh ne učinkujejo. Najbolj učinkovito razkužilo za primer okužb z norovirusi je natrijev hipoklorit (varikina) *(11, 12)*. V zdravstvu in ustanovah za kronično nego pa pri nas praviloma uporabljamo druga čistilna/razkužilna sredstva. Pri izbiri le-teh moramo biti posebej pozorni, da zadostijo evropskim normam glede virucidnega delovanja (EN 14476). Zelo pomembno je tudi poznavanje prave koncentracije delovne raztopine in kontaktni čas delovanja razkužila. Pri okužbah z rotavirusi ali norovirusi potrebujemo višje koncentracije razkužil, podaljšan je tudi kontaktni čas. Bolniške sobe naj se čistijo in razkužujejo vsaj enkrat dnevno. Posebno pozorni moramo biti pri čiščenju in razkuževanju sanitarij, nočnih posod in vseh ostalih površin v neposredni bolnikovi okolici. Površine, ki se jih pogosto dotikamo z rokami (npr. stikala, kljuke, pipe, straniščni izplakovalniki, straniščne metlice, telefoni, gumbi klicnih naprav ipd.), je potrebno čistiti večkrat dnevno.

Če pride do kontaminacije površin z izbruhanino ali blatom, je potrebno to takoj dekontaminirati. Če gre za tekoče izločke, svetujemo posipanje s čistilnim/razkužilnim sredstvom v prahu, ki absorbira tekočino, ali pa površino prekrijemo s papirnatimi brisačami. Pri odstranjevanju vedno uporabljamo rokavice za enkratno uporabo, predpasnik in kirurško masko z vizirjem ali očala. Površino nato skrbno speremo z vročo vodo, v kateri je čistilno/razkužilno sredstvo, ki ima ustrezno delovanje proti virusom. Osebno varovalno

opremo po zaključku dela pravilno odstranimo, odvržemo v koš za smeti in si skrbno umijemo roke z milom in tekočo vodo.

Posebej pozorni moramo biti tudi pri odstranjevanju izločkov in blata pri nepokretnih bolnikih. Plenice takoj odložimo v za to namenjene vreče, ki jih moramo nato zapreti. Nočne posode praznimo v za to namenjenih prostorih in jih takoj damo v termodezinfektor.

Za preprečevanje širjenja izbruha virusnih črevesnih okužb je ključno, kako organiziramo delo na oddelku. Združevanje bolnikov, za katere skrbijo za to posebej določeni ZD, lahko zmanjša oz. prepreči širjenje okužb znotraj oddelka. Bolnikov tudi ne premeščamo na druge oddelke oz. jih zadržujemo v sobah do 48 ur po prenehanju simptomov. Pokretnim bolnikom je potrebno razložiti, naj bolniških sob ne zapuščajo in da naj si skrbno umivajo roke po uporabi stranišča in pred hranjenjem.

Če je prišlo do izbruha črevesnih okužb na otroškem oddelku, je potrebno dodatno pozornost nameniti čiščenju/razkuževanju skupnih igralnic in igrač, ki jih otroci uporabljajo. Ker zaradi tesnega stika z otroki velikokrat zbolijo tudi starši, je še posebej pomembno, da jih poučimo o ustrezni higieni rok. Poostriti je potrebno čiščenje skupnih sanitarij, ki jih uporabljajo starši. Prepovedano je izmenjavanje predmetov (npr. časopisov, knjig, telefonskih polnilcev ipd.) med starši otrok.

V kolikor zbolijo ZD, morajo ti obvezno ostati doma. Na oddelke se lahko vrnejo šele 48 ur po prenehanju simptomov. Ker so lahko ZD tudi asimptomatski prenašalci virusov, je nujno, da vsi ZD dosledno skrbijo za higieno rok.

V primeru izbruha naj se bolniške sobe, kjer so bili zdravljeni oboleli, temeljito očistijo in razkužijo, preden v njih namestimo nove bolnike. Če je zbolelih veliko, se včasih odločimo za zaprtje oddelka za nove sprejeme ravno z namenom, da se omogoči ustrezno temeljito čiščenje in razkuževanje površin in prostorov. To je namreč predpogoj, da se okužba ne bo več širila. Oddelek lahko odpremo, ko mineta dve inkubacijski dobi za bolezen. V praksi to pomeni, da lahko ponovno sprejemamo bolnike 72 ur po zadnjem primeru virusnega gastroenteritisa s kratko inkubacijsko dobo.

Zaradi večjega nadzora se po potrebi odločimo za omejitev ali prepoved obiskov. To je skrajni ukrep, saj je redna prisotnost svojcev za bolnika ali oskrbovanca ustanove za kronično nego zelo koristna. Vsekakor moramo vse obiskovalce pred vstopom na oddelek poučiti o ustrezni higieni rok in po potrebi o uporabi osebne varovalne opreme. Odsvetujemo prinašanje hrane od doma. Vsekakor pa v času izbruha velja prepoved obiskov za majhne otroke, ki nimajo osvojenih osnovnih higienskih navad, in za vse, ki imajo prebavne težave.

Pozornost je potrebno nameniti tudi površinam pred oddelki, kjer se zadržujejo bolniki. Zlasti moramo biti pozorni na avtomate za hrano in pijačo. Tipke je potrebno redno razkuževati, saj so lahko kontaminirane površine vir okužbe za druge bolnike, zaposlene ali obiskovalce.

V praksi je zelo pomembno, da zaposleni dobijo natančna ustna in pisna navodila glede dela na oddelku, ter da jih po potrebi pri delu tudi nadzorujemo in takoj odpravljamo možne napake.

Uspešna strategija za preprečevanje rotavirusnih črevesnih okužb pri otrocih pa je vsekakor tudi cepljenje. Univerzalna precepljenost populacije dojenčkov lahko znatno zmanjša bolnišnično pridobljene rotavirusne okužbe, zlasti pri otrocih, mlajših od 12 mesecev, posredno pa vpliva tudi na zmanjšanje okužb pri starejših otrocih *(5, 13)*.

ZAKLJUČEK

Za razliko od virusnih črevesnih okužb, ki v splošni populaciji običajno potekajo blago in ne potrebujejo dodatne zdravstvene obravnave, pa bolnišnično prido-

bljene okužbe praviloma prizadenejo bolj ranljivo populacijo, pri kateri je potek hujši in lahko znatno vpliva na samo zdravstveno oskrbo. Dokazano je, da se v primeru izbruhov teh okužb poveča smrtnost bolnikov, visoki pa so tudi ekonomski in družbeni stroški. Ukrepi preprečevanja prenosa in obvladovanja izbruhov vključujejo osnovne principe preprečevanja okužb v zdravstvu s poudarkom na pravilni higieni rok in ustreznem čiščenju/razkuževanju površin.

LITERATURA

1. Patel MM, Hall AJ, Vinje J, et al. Noroviruses: a comprehesive review. J Clin Virol. 2009; 44 (1): 1-8.
2. Gaspard P, Ambert-Balay K, Mosnier A, et al. Burden of gastroenteritis outbreaks: specific epidemiology in a cohort of institutions caring for dependant people. J Hosp Infect. 2015; 91 (1): 19-27.
3. Seitz SR, Leon JS, Schwab KJ, et al. Norovirus human infectivity and persistence in water. Appl Environ Microbiol. 2011; 77 (19): 6884-8.
4. Gleizes O, Desselberger U, Tatochenko V, et al. Nosocomial rotavirus infection in European countries: a review of the epidemiology, severity and economic burden of hospital-acquired rotavirus disease. Pediatr Infect Dis J. 2006; 25 (Suppl 1): 512-21.
5. Zlamy M, Kofler S, Orth D, et al. The impact of rotavirus mass vaccination on hospitalization rates, nosocomial rotavirus gastroenteritis and secondary blood stream infections. BMC Infect Dis. 2013; 13: 112.
6. Cunliffe NA, Booth JA, Elliot C, et al. Healthcare-associated viral gastroenteritis among children in large pediatric hospital, United Kingdom. Emerg Infect Dis. 2010; 16 (1): 55-62.
7. Lee LE, Cebelinski EA, Fuller C, et al. Sapovirus outbreaks in long-term care facilities, Oregon and Minnesota, USA, 2002-2009. Emerg Infect Dis. 2012; 18 (5): 873-6.
8. Borg M. Prevention of healthcare-associated gastrointestinal infections. In: Friedman C, Newsom W, eds. Basic Concepts of infection control. 2nd ed. International Federation of Infection Control, N Ireland, UK; 2011. p. 325-36.
9. Gehrke C, Steinmann J, Goroncy-Bermes P. Inactivation of feline calicivirus, a surrogate of norovirus (formerly Norwalk-like viruses), by different types of alcohol in vitro and in vivo. J Hosp Infec. 2004; 56 (1): 49-55.
10. Liu P, Macinga DR, Fernandez ML, et al. Comparison of the activity of alcohol-based handrubs against human noroviruses using the fingerpad method and quantitative real-time PCR. Food Environ Virol. 2011; 3: 35-42.
11. Hall AJ, Lopman B. Norovirus [internet]. CDC Health Information for International Travel; 2015 [citirano 2015 Oct 16] Dosegljivo na: http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/norovirus
12. Ministry of Health New Zeland. Guidelines for the Management of Norovirus Outbreaks in Hospitals and Elderly Care Institutions [internet]. 2009 [citirano 2015 Oct 16]. Dosegljivo na: https://www.health.govt.nz/system/files/documents/publications/guidelines-management-norovirus_0.pdf
13. Paulke-Korinek M, Kundi M, Rendi-Wagner P, et al. Herd immunity after two years of the universal mass vaccination program against rotavirus gastroenteritis in Austria. Vaccine. 2011; 29 (15): 2791-6.

Helena Ribič[1]

Obvladovanje okužb s *Clostridium difficile* v bolnišnicah

Management of Clostridium difficile *Infections in Hospitals*

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Clostridium difficile*, preprečevanje okužb, okužbe, povezane z zdravstvom, klostridijska driska

Okužbe, povzročene z bakterijo *Clostridium difficile*, so med najpogostejšimi okužbami, povezanimi z zdravstveno oskrbo. V Evropi predstavljajo 4 % teh okužb in s tem veliko breme za bolnike in zdravstvo. V številnih državah se incidenca in resnost okužb večata. Najpogostejša bolezen, ki jo povzroča *Clostridium difficile*, je klostridijska driska, ki se običajno pojavi po zdravljenju z antibiotiki. Okužbe s *Clostridium difficile* predstavljajo poseben izziv strokovnjakom za obvladovanje bolnišničnih okužb, saj se prenašajo predvsem s sporami, ki so odporne proti običajnim sredstvom za razkuževanje rok in okolja. Bakterijske spore se izločajo s fecesom bolnika. Z bolnika na bolnika se prenašajo fekalno-oralno, najpogosteje preko rok zdravstvenih delavcev, lahko pa tudi preko kontaminiranih predmetov, instrumentov ali površin. Nemalokrat se pojavijo izbruhi okužb. Zato so pomembni: pravilna raba antibiotikov, pravočasna mikrobiološka diagnostika in ugotovitev povzročitelja ter ukrepi za preprečevanje širjenja okužb (kontaktna osamitev v enoposteljno sobo s sanitarijami, ustrezna higiena rok, dosledna uporaba zaščitnih rokavic, higiena okolja, nadzor izvajanja predpisanih ukrepov, uporaba sporocidnih sredstev in izobraževanje).

ABSTRACT

KEY WORDS: *Clostridium difficile*, infection prevention, health-care associated infections, Clostridial diarrhea

Infections caused by bacteria *Clostridium difficile* are among the most frequent health-care associated infections. In Europe, they account for 4 % of these infections and represent an important burden for patients and the health-care system. Clostridial diarrhea, which is the most frequent manifestation of the infection, is usually connected with antibiotic exposure. Containment of clostridial infections is an important challenge for infection control personnel due to transmission via bacterial spores, which are resistant to most agents, routinely used for hand and environment disinfection. Bacterial spores are secreted from the feces of patients; they are most frequently transmitted from one patient to another via the hands of the health-care personnel, but also via contaminated objects, instruments and environment. Outbreaks of clostridial infecti-

[1] Helena Ribič, dr. med., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj; helena.ribic@nlzoh.si

ons are not unusual. The most important preventive measures are prudent use of antimicrobials, early diagnosis and detection of the causing agent, isolation of patient in single-bed room with toilettes, proper hand hygiene, consistent use of gloves, environment hygiene, control of execution of regimen measures, use of sporocidal disinfectants, and education.

UVOD

Bakterija *Clostridium difficile* (CD) je bila leta 1978 prepoznana kot povzročiteljica psevdomembranoznega enterokolitisa pri bolnikih, zdravljenih z antibiotiki *(1)*. Okužba s CD se najpogosteje kaže kot driska, redkeje pa kot ileus, psevdomembranozni kolitis ali toksični megakolon.

CD je grampozitiven anaeroben sporogen bacil, ki je lahko del človekove normalne črevesne mikrobiote. Najdemo ga pri 3–5 % zdravih odraslih ljudi, brez znakov in brez simptomov bolezni *(2)*. Pri otrocih je še pogostejši *(3)*. V nasprotju s številnimi drugimi povzročitelji okužb kolonizacija s CD zmanjša verjetnost za okužbo *(1)*.

Klostridijska driska se lahko pojavi ob zaužitju spor CD in spremembi črevesne mikrobiote, ki omogoči razmnoževanje CD. Do tega najpogosteje pride ob zdravljenju z antibiotiki. Okužbo lahko sproži že en sam odmerek antibiotika, na primer ob kirurški antibiotični profilaksi *(4)*. Drugi ogrožujoči dejavniki za nastanek klostridijske okužbe so:

- starost,
- pridružene bolezni,
- kirurški poseg,
- zmanjšana imunost in
- zdravljenje z zdravili, ki vplivajo na peristaltiko.

Okužba s CD se lahko pojavi do tri mesece po zdravljenju z antibiotiki *(1)*.

Bakterija CD je danes eden najpogostejših povzročiteljev z zdravstvom povezanih okužb prebavil. V bolnišnicah se prenaša z bolnika na bolnika, najpogosteje preko rok zdravstvenih delavcev (ZD), kontaminiranih površin ali predmetov. Lahko povzroči večje ali manjše izbruhe okužb in predstavlja velik izziv za strokovnjake s področja obvladovanja okužb, povezanih z zdravstvom (OPZ) *(1)*.

POGOSTOST IN BREME OKUŽB Z BAKTERIJO *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

Po podatkih točkovne prevalenčne raziskave Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni, ki je bila opravljena v letih 2011 in 2012, so OPZ prebavil po pogostosti na petem mestu in predstavljajo 7,7 % vseh OPZ *(5)*. Pri slabi polovici teh okužb (48 % okužb prebavil ali v povprečju skoraj 4 % vseh OPZ) je bila kot povzročitelj ugotovljena bakterija CD *(5)*. Delež CD okužb se je po državah zelo razlikoval – od 0 % v Bolgariji in Litvi do 10,6 % na Madžarskem in 11,3 % na Švedskem. V Sloveniji je bil delež okužb s CD nizek, < 1 % *(5)*.

Incidenca in resnost okužb s CD se v zadnjih letih povečujeta, kar je med drugim posledica pojava hipervirulentih sevov, med njimi sevov CD NAP1/027 (angl. *North American pulsed field 1*). Ocene kažejo, da je v državah Evropske unije (EU) na leto 124.000 okužb s CD *(5, 6)*. Število je najverjetneje podcenjeno predvsem na račun neizvedene mikrobiološke diagnostike.

Gabriel in sodelavci so v raziskavi, objavljeni v letu 2014, ugotovili, da se pri bolnikih, ki okužbo s CD pridobijo v bolnišnici, hospitalizacija podaljša za 2,7–21,3 dni. V primerih, ko so bolniki v bolnišnico sprejeti zaradi okužbe s CD, pa bolnišnična oskrba traja 5–13,6 dni. Ocenjujejo, da znašajo stroški zdravljenja okužbe s CD

2.992–29.000 ameriških dolarjev. Vsi stroški v zvezi s CD okužbami v evropski regiji so ocenjeni na 3 milijarde evrov, v ZDA pa na 3,2 milijarde ameriških dolarjev *(7)*.

CLOSTRIDIUM DIFFICILE V BOLNIŠNIČNEM OKOLJU IN PRENOS OKUŽB

Rezervoar CD v bolnišnicah sta človek in neživo okolje. Najpomembnejšo vlogo ima bolnik s simptomatsko CD okužbo *(1)*. Obremenitev okolja je sorazmerna z resnostjo bolezni – pri hujši bolezni je obremenitev okolja s CD večja *(1)*.

CD se v okolje izloča z iztrebki. Vegetativne oblike na zraku preživijo zelo kratek čas. Preživetje bakterije omogočajo spore, ki so odporne proti vplivom okolja, pa tudi proti alkoholnim razkužilom in običajnim sredstvom za čiščenje in razkuževanje prostorov. Še več, ob prisotnosti čistil in nekaterih razkužil se tvorba spor CD celo poveča *(1, 9)*. Na predmetih in različnih površinah spore CD preživijo tudi do pet mesecev, preko njih pa se lahko prenašajo z bolnika na bolnika *(8)*. CD se prenaša fekalno-oralno, do okužbe pride največkrat z zaužitjem spor.

Spore CD pogosto najdemo v bolnikovem okolju in na rokah ZD *(1)*. Spore najdemo na predmetih, ki prihajajo v neposredni stik z bolnikom, in praktično na vseh površinah v okolici bolnika s CD okužbo *(9)*. Najpogosteje so kontaminirani:

- straniščne školjke in površine v toaletnih prostorih,
- umivalniki, pipe in odtoki,
- pozivni gumbi in stikala,
- posteljne ograjice,
- telefoni in
- drugi predmeti ter površine, ki so v stiku z bolnikom ali se jih bolniki ali ZD, ki skrbijo za bolnika s CD, pogosto dotikajo.

CD so bili ugotovljeni na medicinskih pripomočkih, kot so *(9)*:

- UZ naprave,
- pulzni oksimetri,
- tipkovnice osebnih računalnikov,
- manšete za merjenje pritiska in
- stetoskopi.

Opisani so primeri prenosa okužbe preko termometrov in stetoskopov. Nivo kontaminacije je običajno nizek (1–3 log10), vendar raziskave na živalih nakazujejo, da je to dovolj za kolonizacijo ali okužbo *(9)*.

Pomemben vir spor CD je poleg iztrebkov tudi bolnikova koža. V raziskavi, ki jo je opravil Bobulsky s sodelavci, so med 27 bolniki z dokazano okužbo s toksigenim sevom CD, kontaminacijo kože dokazali pri 25 bolnikih (93 %) *(10)*. Med raziskovanimi predeli kože je bil najpogosteje kontaminiran predel dimelj, sledili so:

- koža na trebuhu,
- koža prsnega koša,
- roke in
- komolčna kotanja.

Večina bolnikov je imela kožo kontaminirano tudi po prenehanju driske – 70 % bolnikov 6 dni po prenehanju driske in 40 % bolnikov 9 dni po prenehanju driske *(10)*.

Bolnikova koža in bolnikova neposredna okolica sta lahko vir kontaminacije rok ZD v času, ko bolnika pregleduje ali neguje. Ob neustrezni higieni rok spore CD ostanejo na koži rok in jih ZD z rokami lahko prenese na druge bolnike, površine in predmete, ki se jih dotakne. Število CD na koži bolnika zmanjšamo z umivanjem in prhanjem, nekateri strokovnjaki priporočajo umivanje bolnikov s klorheksidinom.

Spore CD se prenašajo z bolnika na bolnika, najpogosteje z rokami ZD ali preko kontaminiranega okolja. Slednjega lahko kontaminirajo ZD predvsem po stiku z bolnikom, če ne upoštevajo higienskih načel, ali pa bolniki z okužbo s CD. Opisani so številni izbruhi okužb, povzročenih s CD v zdravstvenih ustanovah.

PREPREČEVANJE OKUŽB Z BAKTERIJO *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* V BOLNIŠNICAH

Poleg standardnih higienskih ukrepov, ki jih izvajamo pri vseh bolnikih ves čas obravnave ne glede na diagnozo, so za preprečevanje okužb s CD v bolnišnicah zelo pomembni:

- zmanjšana poraba antibiotikov,
- osamitev bolnikov,
- higiena rok,
- čiščenje in razkuževanje okolja,
- nadzor izvajanja ukrepov in
- zdravstveno-vzgojno delo z bolniki in svojci.

Smotrna raba antibiotikov

Antibiotiki predstavljajo najpomembnejši dejavnik tveganja za okužbo s CD *(11)*. Porušijo običajno črevesno mikrobioto in s tem omogočijo razmnoževanje bakterije CD, izločanje toksinov in nastanek klostridijske driske. Na incidenco okužb s CD pomembno vplivamo z zmanjšano porabo antibiotikov na sploh in z omejitvijo rabe določenih skupin antibiotikov (npr. cefalosporinov in fluorokinolonov) *(12)*. Pri tem so pomembni tudi drugi ukrepi *(11)*:

- omejevanje poročanja rezultatov antibiograma za določene antibiotike,
- nadzor nad predpisovanjem,
- spremljanje porabe antibiotikov in
- redno izobraževanje zdravnikov idr.

Osamitev bolnika z okužbo

Bolnika s sumom ali s potrjeno okužbo s CD kontaktno osamimo v enoposteljno enoto s toaletnim prostorom, ki ga drugi bolniki ne smejo uporabljati *(1)*. Z ukrepi kontaktne izolacije preprečujemo neposreden prenos mikroba od okužene/kolonizirane osebe in posredni prenos preko osebja z rokami, delovno obleko in stikom z okuženimi predmeti, pripomočki in površinami *(12)*. Smernice Združenja za strokovnjake za obvladovanje okužb in epidemiologijo (angl. *Association for Professionals in Infection Control and epidemiology*, APIC) posebej poudarjajo, da je treba osamiti vsakega bolnika z v bolnišnici pridobljeno drisko, najmanj do rezultatov mikrobiološke preiskave. Asimptomatskih nosilcev CD ni treba izolirati *(1)*. Izolacijske ukrepe izvajamo vedno skupaj s standardnimi higienskimi ukrepi *(13)*.

Bolnik sobe praviloma ne zapušča. Razlog osamitve zaradi okužbe s CD so predvsem spore, ki kontaminirajo bolnikovo okolje. Prenos na drugega bolnika lahko učinkovito preprečujemo s fizično prepreko. Najbolj kontaminirani so toaletni prostori in površine ter predmeti, ki se jih bolniki in ZD najpogosteje dotikajo. Zato je pomembno, da stranišča bolnika s CD okužbo ne glede na prostorske zmožnosti drugi bolniki ne uporabljajo. Ob pomanjkanju toaletnih prostorov to lahko zagotovimo z uporabo nočnih posod ali s sobnim straniščem *(2)*. V primeru, da je bolnikov s CD okužbo več, lahko uporabljamo kohortno izolacijo, vendar bolniki ne smejo biti hkrati kolonizirani z drugimi mikrobi, zaradi katerih je potrebna izolacija (npr. s proti meticilinu odpornim *Stapylococcus aureus* ali proti vankomicinu odpornim enterokokom).

Breme mikrobov na roki zmanjša uporaba rokavic. Pred vstopom v izolacijsko enoto si mora ZD nadeti rokavice in zaščitni plašč, glede na standardne predpise mora po potrebi uporabiti tudi drugo osebno varovalno opremo. Ob odhodu iz izolacijske enote je treba sneti rokavice, predpasnik in drugo osebno varovalno opremo, jo pravilno odložiti v ustrezne namenske posode ter si umiti roke z milom in vodo in jih dobro osušiti. ZD si mora roke umiti tudi, če je bil v stiku le z neposredno bolnikovo okolico.

V izolacijski enoti so zelo pomembni tudi:

- tehnika nedotikanja,
- uporaba opreme in pripomočkov za enkratno uporabo in

- uporaba pripomočkov in instrumentov le za enega bolnika (npr. merilci krvnega pritiska).

Kontaktno izolacijo lahko ukinemo šele po prenehanju driske, praviloma 48 ur po tem, ko bolnik začne normalno odvajati. Po prekinitvi kontaktne izolacije je treba dosledno izvajati standardne higienske ukrepe, saj so bakterije CD lahko še vedno prisotne na bolnikovi koži in v njegovi okolici. Nekateri strokovnjaki priporočajo, da se izolacijo izvaja do konca hospitalizacije, saj sta izločanje CD v iztrebkih in kontaminacija kože prisotni tudi po prenehanju driske *(14)*. Ob neupoštevanju higienskih načel lahko pride pri bolniku do ponovne okužbe, zato ob kohortni izolaciji bolnika po prenehanju driske premestimo *(14)*.

Higiena rok

Roke bolnikov in ZD so pomemben vir klostridijske okužbe. Spore CD so odporne proti alkoholu, zato alkoholna razkužila pri odstranjevanju CD spor niso učinkovita. Za preprečevanje prenosa spor z rokami številne smernice priporočajo umivanje rok z milom in vodo *(5, 15, 16)*. Vendar strokovnjaki pri tem niso enotni. Organizacija APIC umivanje rok na oddelkih, kjer ni CD izbruha, odsvetuje in navaja, da do sedaj opravljene raziskave niso dokazale zmanjšanje pojavnosti CD okužb ob umivanju rok ali povečanje ob uporabi antiseptikov za higieno rok *(1, 14)*.

Po umivanju je treba roke popolnoma posušiti. V nekaterih ustanovah je predpisano, da si ZD za tem roke tudi razkužijo. S tem preprečujejo prenos vegetativnih oblik klostridijev in drugih mikrobov, vendar je postopek zamuden in slabo vpliva na kožo rok.

Nasprotno so strokovnjaki enotnega mnenja, da uporaba rokavic pomembno zmanjša breme CD na rokah in ob pravilni uporabi zmanjša verjetnost prenosa CD *(1, 14, 16)*. Rokavice je treba nadeti pred vstopom v sobo. Uporabljati jih morajo vsi ZD, ki pregledujejo, zdravijo ali negujejo bolnika. Uporabiti jih morajo tudi v primeru, če se ne nameravajo dotakniti bolnika, ampak le predmetov ali površin v bolnikovem okolju. Rokavice je treba uporabljati in po potrebi zamenjati skladno s standardi ustanove.

Čiščenje in razkuževanje okolja

Okolje ima pomembno vlogo pri širjenju CD okužb. Bolnikova oprema in instrumenti se kontaminirajo s CD preko fecesa bolnika, preko bolnikovih rok ali preko rok ZD. Raziskave kažejo, da je incidenca okužb s CD premosorazmerna količini spor v brisih okolja *(11)*. Zaradi sposobnosti CD, da preživi na predmetih in površinah dolgo časa, je treba intenzivirati čiščenje in razkuževanje bolnikove sobe ter striktno upoštevati predpisana navodila *(1)*. Zaradi odpornosti spor na običajna razkužila, strokovnjaki večinoma priporočajo uporabo sporocidnih sredstev, vendar si glede tega nacionalna in mednarodna navodila niso enotna. Medtem ko evropska navodila priporočajo dnevno razkuževanje izolacijske sobe s sporocidnimi sredstvi, predvsem hipokloridom, pa ameriške smernice priporočajo hipoklorid predvsem ob izbruhih, v hiperepidemičnih okoljih in razmerah, kjer se CD širi kljub izvajanju drugih ukrepov *(11, 14)*.

Številna priporočila navajajo čiščenje in razkuževanje bolnikovega okolja najmanj enkrat na izmeno. Zelo pomembno je pravilno čiščenje po kontaminaciji z iztrebki, ravnanje z iztrebki ter čiščenje ob uporabi sobnega stranišča, v primerih, ko bolnik odvaja v postelji, in ob fekalni kontaminaciji (npr. po nekontroliranem odvajanju). Frekvenco čiščenja in razkuževanja je v izolacijski enoti treba prilagoditi stopnji onesnaženja in bolnikovemu razumevanju in doslednosti izvajanja higienskih ukrepov *(1)*.

Za razkuževanje bolnikove sobe in vse opreme je potrebna uporaba sporocidnega sredstva na osnovi klora ali vodikovega peroksida (H_2O_2), druga sredstva niso učinkovita *(1, 9)*. Če se izbruh širi, priporočajo uporabo sporocidnega sredstva tudi za sobe in opremo drugih bolnikov. Osebje mora poznati preparat, njegovo uporabo in čas, ki je potreben za delovanje. Imeti mora navodila za delo in pri uporabi teh sredstev pravilno uporabljati osebno varovalno opremo.

Za vzdrževanje čistega okolja in preprečevanje širjenja okužb je pomembno tudi čiščenje in razkuževanje prostorov po odpustu bolnika. Danes so na voljo različne naprave, med njimi dezinfektorji, ki delujejo s pomočjo UV žarkov, in dezinfektorji, ki delujejo s sproščanjem H_2O_2. Sredstva na osnovi H_2O_2 dosežejo mesta, ki so pri ročnem čiščenju nedosegljiva *(9)*. Pogoj za njihovo učinkovitost je, da so prostori pred dezinfekcijo dosledno očiščeni in da zaposleni upoštevajo čas delovanja. Slednje je pomembno tudi zaradi varnosti zaposlenih, saj so ta sredstva zdravju škodljiva.

Danes sta na tržišču dve vrsti aparatov, ki delujeta s sproščanjem H_2O_2. Ena vrsta tvori paro H_2O_2, ki vsebuje najmanj 30 % H_2O_2. V preskusih s sporami CD na posebnih nosilcih so s to vrsto dezinfekcije uničili več kot 6 $\log_{10}$ spor. Druga vrsta aparatov H_2O_2 razpršuje (vsebnost H_2O_2 je 5–6 %). V preskusih so s to vrsto dezinfekcije uničili približno 4 $\log_{10}$ spor CD. Dezinfekcija s pomočjo UV žarkov je manj učinkovita in uniči le približno 2 $\log_{10}$ spor CD *(9)*. Glavna omejitev teh vrst dezinfekcije je, da se lahko uporablja le v izpraznjenih prostorih, kar je običajno izvedljivo samo po odpustu bolnika.

Zdravstveno-vzgojno delo z bolnikom in svojci

Bolnik lahko širi CD na več načinov:

- neposredno ob stiku z drugimi bolniki (npr. preko kontaminiranih rok),
- preko kontaminacije okolja, predmetov, instrumentov in
- preko kontaminacije rok ZD.

CD lahko širijo tudi svojci in drugi obiskovalci. Zato je pomembno, da ZD pouči bolnika o širjenju okužbe, o ustrezni higieni rok, tehniki nedotikanja, prhanju in o uporabi stranišča. Z informacijami ne zmanjša le možnosti za kontaminacijo okolja in prenos okužb, temveč tudi razbremeni bolnika negativnih občutenj, kot sta na primer strah in občutek stigmatizacije. O prenosu okužbe, pomenu in pravilni izvedbi higiene rok ter drugih higienskih ukrepih ZD pouči tudi svojce in druge obiskovalce *(11)*.

Po vsakem odvajanju mora bolnik paziti, da ne kontaminira predmetov in površin, temeljito si mora umiti roke in jih osušiti. Priporoča se, da pri splakovanju stranišča po odvajanju stranišče pokrije s straniščnim pokrovom in s tem prepreči širjenje aerosola. Kanadske smernice priporočajo, da ZD nadzirajo higieno rok bolnikov, preden ti zapustijo bolniško sobo, in jim po potrebi pri higieni rok pomagajo *(15)*.

Nadzor nad izvajanjem ukrepov in izobraževanje

Pri obvladovanju okužb s CD je treba ukrepe izvajati dosledno. To lahko dosežemo:

- z izobraževanjem,
- z nadzorom nad izvajanjem ukrepov in
- s stalnim izboljševanjem.

Nadzor izvajanja ukrepov, ki ga izvajajo strokovnjaki s področja obvladovanja OPZ, mora biti vključen v proces obvladovanja OPZ. Priporočeno je, da oseba, ki je zadolžena za nadzor, pripravi načrt nadzorov. Z opazovanjem preverja izvedbo higiene rok, uporabe osebne varovalne opreme (predvsem rokavic in zaščitne obleke), izolacijskih ukrepov, nadzor čiščenja prostorov idr. Odstopanja beleži

in z izobraževanjem ali razgovori z zaposlenimi skrbi za strokovni razvoj zaposlenih in izboljševanje dela. Vonberg in sodelavci poudarjajo, da je eden izmed najbolj učinkovitih ukrepov za preprečevanje širjenja CD izobraževanje osebja, ki vključuje informacije o *(11)*:

- patogenosti, rezervoarju in načinih širjenja mikroba,
- pomenu kontaminacije okolja,
- učinkovitosti higiene rok in predmetov,
- dekontaminaciji instrumentov in površin,
- o vlogi zaščitnih rokavic in
- drugih preventivnih ukrepih.

Pomembno je izobraževanje ZD kot tudi osebja, ki čisti *(11)*.

Strokovnjaki s področja obvladovanja OPZ po potrebi izvedejo tudi druge ukrepe. Pri nadzoru čistosti okolja lahko uporabljajo fluorescentne označevalce, mikrobiološke brise ali merjenje organskega ATP z bioluminiscenco, s katerimi ugotavljajo ustreznost čiščenja *(1)*. Dokaz bakterije CD v vzorcih površin je zahtevnejši, ker so potrebna posebna gojišča, zato se redko uporablja *(14)*.

UKREPI OB IZBRUHU OKUŽB

Ob izbruhu okužb s CD je treba preveriti, katerih ukrepov za preprečevanje širjenja okužbe nismo dosledno izvajali in zakaj. Intenziviramo nadzor osebja in čiščenje okolice. Če je le mogoče, poleg bolnikov kohortiramo tudi osebje – ZD, ki dela z bolnikom s CD okužbo, ne sme skrbeti za druge bolnike. Potrebno je vsakodnevno spremljanje razmer in ugotavljanje novih primerov s sumom na CD okužbo. Če z ukrepi nismo uspešni, na oddelek ne sprejemamo novih bolnikov, dokler pojavljanje novih okužb s CD ne preneha. Preučimo možnost uporabe dodatnih dezinfekcijskih in drugih ukrepov.

ZAKLJUČEK

Okužbe z bakterijo CD predstavljajo veliko breme za bolnika in zdravstvo, zato je pomembno, da jih učinkovito preprečujemo. Predstavljajo poseben izziv strokovnjakom za obvladovanje okužb, saj se prenašajo s sporami, odpornimi na sredstva, ki jih običajno uporabljamo pri higieni rok in okolja. Za preprečevanje širjenja okužb so pomembni številni ukrepi, med njimi pravilna raba antibiotikov, zgodnja diagnostika in ugotovitev povzročitelja, osamitev bolnika, dosledna higiena rok in izvajanje drugih standardnih higienskih ukrepov ter poostrena higiena okolja. Vse pregledane nacionalne in mednarodne smernice poudarjajo pomen higiene rok, dosledne uporabe zaščitnih rokavic, kontaktne izolacije bolnika in pomen čiščenja opreme ter prostora v izolacijski enoti s sporocidnimi sredstvi.

LITERATURA

1. Association for Professionals in Infection Control and epidemiology. Guide to preventing Clostridium difficile infections. Washington: APIC [internet]; 2013 [citirano 2015 Aug 10]. Dosegljivo na: http://apic.org/Resource_/EliminationGuideForm/59397fc6-3f90-43d1-9325-e8be75d86888/File/2013CDiffFinal.pdf
2. Bouza E, Munoz P, Alonso R. Clinical manifestation, treatment and control of infections caused by Clostridium difficile. Clin Microbiol Infect. 2005; 11 (Suppl 4): 57–64.
3. Denno DM, Shaikh N, Stapp JR, et al. Diarrhea etiology in a pediatric emergency department: a case control study. Clin Infect Dis. 2012; 55 (7): 897–904.
4. Carignan A, Allard C, Pepin J, et al. Risk of Clostridium difficile infection after perioperative antibacterial prophylaxis before and during an outbreak of infection due to a hypervirulent strain. Clin Infect Dis. 2008; 46: 1838–43.
5. European Centre for Disease Prevention and Control. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals 2011–2012 [internet]. Stockholm: ECDC; 2013 [citirano 2015 Aug 10]. Dosegljivo na: http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/healthcare-associated-infections-antimicrobial-use-PPS.pdf
6. Davies KA, Davis GL, Ashwin HM, et al. Second part from the European, multi-centre, prospective biannual point prevalence study of Clostridium difficile infection in hospitalised patients with diarrhoeae (EUCLID). 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious disease; Barcelona; 2014.
7. Gabriel L, Beriot-Mathiot A. Hospitalization stay and costs attributable to Clostridium difficile infection: a critical review. J Hosp Infect. 2014; 88: 12–21.
8. Kalenic S. The role of the microbiology laboratoratory. IFIC Basic concepts of infection control, International federation of infection control [internet]. 2011 [citirano 2015 Aug 18]. Dosegljivo na: http://theific.org/wp-content/uploads/2015/03/chapter7.pdf
9. Barbut F. How to eradicate Clostridium difficile from the environment. J Hosp Infect. 2015; 89: 287–95.
10. Bobulsky GS, Al-Nassir WN, Riggs MM, et al. Clostridium difficile skin contamination in patients with C. difficile-associated disease. Clin Infect Dis. 2008; 46 (3): 447–50.
11. Vonberg RP, Kuijper EJ, Wilcox MH, et al. Infection control measures to limit the spread of Clostridium difficile. Clin Microbiol Infect. 2008; 14 (Suppl 5): 2–20.
12. Valiquette L, Cosette B, Garant MP, et al. Impact of a reduction in the use of high-risk antibiotics on the course of an epidemic of Clostridium difficile-associated disease caused by the hypervirulent NAP1/027 strain. Clin Infect Dis. 2007; 45 (Suppl 2): S112–S121.
13. Delovna skupina pri Ministrstvu za zdravje RS. Izolacija. In: Strokovne podlage za izdelavo programa za preprečevanje in obvladovanje bolnišničnih okužb [internet]. 2009 [citirano 2015 Aug 18]. Dosegljivo na: http://www.mz.gov.si/fileadmin/mz.gov.si/pageuploads/mz_dokumenti/delovna_podrocja/zdravstveno_varstvo/zdravstveno_varstvo_v_posebnih/NAKOBO_september_2010/MZ_pogl_4_Izolacija_2009.pdf
14. Dubberke ER, Carlig P, Carrico R, et al. Strategies to prevent Clostridium difficile infections in acute care hospitals: 2014 up-date. Infect Control Hosp Epidemiol. 2014; 35: 628–45.
15. Public Health Agency Canada. Clostridium difficile Infection [internet]. 2013 [citirano 2015 Aug 8]. Dosegljivo na: http://www.phac-aspc.gc.ca/nois-sinp/guide/c-dif-acs-esa/index-eng.php
16. Tameside hospital NHS Foundation trust. Clinical Lead Infection prevention and Control. Policy for the Prevention and Control of Clostridium difficile Associated Diarhoea [internet]. 2014 [citirano 2015 Aug 18]. Dosegljivo na: http://www.tamesidehospital.nhs.uk/documents/clostridiumdifficilepolicy.pdf

Mateja Logar[1]

V pričakovanju novih smernic Ameriškega združenja za infekcijske bolezni za obravnavo infekcijske driske

In Anticipation of the New Infectious Diseases Society of America Guidelines for the Management of Infectious Diarrhea

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: infekcijska driska, diagnosticiranje, zdravljenje

Infekcijska driska ostaja tudi v industrijsko razvitih državah pogosta bolezen, ki pa ima na srečno nizko smrtnost. Kulture iztrebkov so le redko pozitivne, zato je cena za pozitiven izvid preiskave zelo visoka. Smiselno in smotrno je prepoznati tiste bolnike in tiste vrste infekcijske driske, ko je v resnici treba poslati iztrebke na nadaljnje mikrobiološke preiskave. Sem sodijo: bolniki s hudim potekom bolezni; bolniki, ki potrebujejo sprejem v bolnišnico; bolniki s krvavo drisko; z imunsko pomanjkljivostjo; če je indicirano antibiotično zdravljenje; ali če sumimo, da je prišlo do izbruha bolezni. Z vidika javnega zdravja je smotrno pošiljati iztrebke na kulturo ali preiskave na viruse še pri osebah z drisko, ki delajo v pripravi ali razdeljevanju hrane ter v negovalnih in vzgojno-varstvenih ustanovah. Osnova zdravljenja ostaja preprečevanje izsušitve, kar najlažje dosežemo z oralno rehidracijsko raztopino. Antibiotično zdravljenje ne skrajša trajanja driske in je indicirano samo pri tistih bolnikih, pri katerih je večja nevarnost za razsoj bolezni ali nastanek izven črevesnih zapletov. Za izkustveno zdravljenje po naših smernicah uporabljamo azitromicin, kadar je to indicirano.

ABSTRACT

KEY WORDS: infectious diarrhea, diagnostic tests, treatment

Infectious diarrhea remains a common disease in industrialized countries, but fortunately, it has low mortality. Stool cultures are rarely positive, therefore, the price for a positive culture is very high. It is reasonable and rational to identify those patients and those types of infectious diarrhea in which it is in fact necessary to send the stool for further microbiological examinations. These include patients with severe course of the disease, patients who require hospitalization, patients with bloody diarrhea, patients with immunodeficiency, if antibiotic treatment is indicated, or if it is suspected that there has been an outbreak of the disease. From a public health perspective, it is reasonable to send the stool for culture or investigations on viruses in persons with diarrhea

[1] Doc. dr. Mateja Logar, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana; mateja.logar@kclj.si

who work in the preparation or distribution of food, in nursing homes, or in day-care centers. The basic goal of the treatment is to prevent dehydration, which can be lifesaving and can easily be achieved with oral rehydration solution. Antibiotic therapy does not shorten the duration of diarrhea and is indicated only if there is a higher risk of dissemination or complications for the patients. According to our guidelines, we use azithromycin for the empirical treatment of infectious diarrhea when indicated.

UVOD

Infekcijska driska ostaja tudi v industrijsko razvitih državah pogosta bolezen. Na leto je v Sloveniji prijavljenih 10.000–15.000 primerov infekcijske driske, ki predstavljajo približno 20–25 % vseh prijavljenih primerov infekcijskih bolezni. Bolezen je sicer precej bolj pogosta, saj bolniki z blago obliko bolezni zdravnika pogosto niti ne obiščejo. Trije najpogostejši bakterijski povzročitelji v Sloveniji so bakterije rodov *Salmonella, Campylobacter* in *Escherichia coli,* izmed bakterijskih povzročiteljev pa jim po pogostosti sledijo šigele in *Yersinia enterocolitica (1).* V industrijsko razvitih državah je smrtnost zaradi drisk nizka, najvišja je v skupini bolnikov, ki so starejši od 65 let *(2).* V Sloveniji v zadnjih 5 letih nismo zabeležili smrti zaradi infekcijske driske. Virusna driska je najpogostejša vrsta infekcijske driske, ki je povsod po svetu še vedno med glavnimi vzroki obolevnosti v otroškem obdobju. Med virusi najpogosteje dokažemo rotaviruse, kaliciviruse, adenoviruse in astroviruse. Žal večine drisk ne uspemo etiološko opredeliti, enako je tudi v ZDA *(1, 3).* S hitro globalizacijo in industrializacijo pridelave hrane, pojavom novih povzročiteljev in novimi diagnostičnimi metodami so odločitve o najbolj smotrnem diagnostičnem in terapevtskem ukrepanju zelo pereč problem, zato vsi z velikimi pričakovanju pričakujemo nova priporočila Ameriškega združenja za infekcijske bolezni (angl. *Infectious Diseases Society of America,* IDSA), ki bi morala biti objavljena že letos, vendar so njihovo objavo prestavili na jesen 2016 *(4).*

EPIDEMIOLOGIJA V SLOVENIJI

V letu 2013 je bilo prijavljenih 19.858 primerov infekcijskih drisk, kar je za manj kot 1 % manj kot v letu 2012. Največji delež prijavljenih infekcijskih drisk (70 %) predstavljajo etiološko neopredeljeni primeri. Med opredeljenimi povzročitelji infekcijskih drisk je bilo največ norovirusnih in rotavirusnih okužb. Med bakterijskimi povzročitelji so bili najpogostejši kampilobaktri, salmonele, *Clostridium difficile* in *E. coli (1).* V ZDA so bile salmonele leta 2012 še vedno najpogostejši povzročitelj bakterijskih drisk, sledili so kampilobaktri, *E. coli* O157:H7, vibriji in jersinije *(3).* Med starostnimi skupinami je bilo pri nas največ prijav v starosti 1–4 let ter 5–14 let, najmanj pa v starosti 65–74 let. Hospitaliziranih je bilo 17 % vseh prijavljenih primerov infekcijske driske. Največ hospitaliziranih je bilo zaradi okužbe s *C. difficile* (65 % prijavljenih primerov), sledijo adenovirusne okuže (59 %), rotavirusne okužbe (58 %) salmonelne okužbe (55 %), kampilobaktrske driske (43 %) in norovirusne okužbe (20 %). Po letu 2003 je število prijav salmoneloz, podobno kot v drugih državah evropske skupnosti, začelo upadati, naraščati pa so začele prijave virusnih črevesnih okužb, zlasti norovirusnih in rotavirusnih. Od leta 2003 do 2013 se je število prijavljenih salmonelnih gastroenterokolitisov zmanjšalo za več kot trinajstkrat. Do leta 2009 je bila salmonela najpogostejši bakterijski povzročitelj infekcijskih drisk v Sloveniji. Leta 2013 je bila salmonela dokazana pri 293 primerih infekcijske driske, najpogo-

steje so osamili *Salmonella* Enteritidis, ki je predstavljala 45 % vseh izoliranih salmonel. Od leta 2009 dalje se med opredeljenimi povzročitelji akutnih infekcijskih drisk najpogosteje pojavlja kampilobakter. Tudi v letu 2013 je bil v Sloveniji, podobno kot v številnih državah evropske skupnosti, kampilobakter najpogostejši bakterijski povzročitelj drisk. Število prijav v letu 2013 (996), je za 6 % višje kot leta 2012. Pri ljudeh je najpogostejši *Campylobacter jejuni*, ki predstavlja 87 % prijav, sledita *Campylobacter coli* (6 %) in *Campylobacter consisus* (3 %). V zadnjih letih beležimo naraščanje števila prijav akutnih gastroenterokolitisov, katerih povzročitelj je *C. difficile*. Od leta 1999, ko smo zabeležili dve prijavi, je v letu 2013 število prijav naraslo na 316. Okužbe se pojavljajo pri bolnikih z običajnimi dejavniki tveganja (starejše osebe, osebe s kroničnimi boleznimi, osebe, ki so se zdravile v bolnišnici, osebe, ki so prejemale antibiotike) verjetno pa tudi pri drugih osebah. V letu 2013 smo zabeležili 10 prijav griže, kar je 2,5-krat manj kot v letu 2012. Najpogostejša povzročiteljica griže je *Shigella sonnei*. Število prijav rotavirusnih okužb v letu 2013 je bilo 1.451, kar je za 4 % več kot v letu 2012. *Giardia lamblia* je bila kot povzročitelj driske prijavljena 42-krat, zabeležili smo tudi 4 okužbe z amebami. V zadnjih letih ponovno beležimo več primerov okužb z giardijami. Zabeležili smo osem izbruhov infekcijskih drisk *(1)*.

DIAGNOSTICIRANJE

O driski govorimo, če bolnik več kot vsaj trikrat dnevno odvaja manj formirane iztrebke. O akutni driski govorimo, če težave trajajo manj kot dva tedna, pri perzistentni driski trajajo težave 2–4 tedne in pri kronični driski več kot 4 tedne. Tukaj se pojavijo razlike z definicijami IDSA, ki opredeljuje, da je driska perzistentna, če traja 14–30 dni, kronična pa, če traja več kot 30 dni *(4, 5)*. Za postavitev diagnoze sta zelo pomembni anamneza in natančen klinični pregled. Pri anamnezi smo pozorni na podatke o predhodnem jemanju antibiotikov, podobno zbolelih doma ali v okolici, prehranskih navadah (uživanju morske hrane, prehranjevanju v restavracijah s hitro prehrano, uživanju toplotno slabo obdelanega mesa, nepasteriziranega mleka in mlečnih izdelkov, surovih jajc ter izdelkov iz surovih jajc itd.), prisotnost kroničnih bolezni ali motenj v imunskem odzivu. Oceniti poskušamo stopnjo izsušenosti in tveganje za nastanek zunajčrevesnih zapletov. Na osnovi epidemioloških podatkov in klinične slike ne moremo postaviti etiološke diagnoze.

Z neposrednim mikroskopiranjem iztrebkov lahko dokazujemo prisotnost levkocitov. Ti so prisotni, če je driska posledica okužbe s povzročitelji, ki povzročajo vnetje ali vdrejo v črevesno steno (šigele, enteroinvazivne in enterohemoragične *E. coli*, salmonele, kampilobaktri, *C. difficile, V. parahaemolitycus, E. histolytica*). Levkociti so prisotni v iztrebkih tudi pri neinfekcijskih vnetjih črevesa, ki prizadenejo črevesno steno, kot sta ulcerozni kolitis in Crohnova bolezen. Določanje fekalnega laktoferina (vezavna beljakovina za železo v levkocitih) je občutljivejša in bolj specifična preiskava, vendar je razmeroma draga in slabo dostopna *(6)*. V Sloveniji te preiskave ne uporabljamo, medtem ko smernice IDSA svetujejo, da iztrebke najprej mikroskopiramo na prisotnost levkocitov oziroma opravimo hitri test za dokaz laktoferina in nato samo vzorce, ki so pozitivni, pošljemo na dodatna mikrobiološka testiranja. Ob tem opozarjajo, da sta ta testa pogosto negativna pri bolnikih, pri katerih drisko povzroča enterohemoragična *E. coli (5)*.

Dokončna etiološka diagnoza je mikrobiološka. Bakterijskega povzročitelja prikažemo neposredno s kulturo iztrebka za poskus osamitve povzročitelja. Kulture so pozitivne v manj kot 6 % akutnih drisk *(4)*. V ZDA ocenjujejo, da zaradi niz-

ke občutljivosti metode stroški za en pozitiven izvid znašajo med 952 in 1.200 dolarji *(4, 7)*. Iz tega razloga se v Sloveniji za poskus osamitve odločamo samo pri bolnikih s hudim potekom bolezni; pri bolnikih, ki potrebujejo sprejem v bolnišnico; pri bolnikih s krvavo drisko; z imunsko pomanjkljivostjo; če je indicirano antibiotično zdravljenje; ali če sumimo, da je prišlo do izbruha bolezni (večje število oseb z drisko s skupno epidemiološko anamnezo) *(5)*. Podobno DuPont v preglednem članku o akutni driski pri imunsko kompetentnih osebah svetuje, da se iztrebki pošiljajo za poskus osamitve bakterij, če imajo bolniki vročino, višjo kot 38 °C, pridružene resne kronične bolezni, imajo grižo, so dehidrirani ali imajo koleri podobno vodeno drisko *(8)*. Tako kot pri nas tudi smernice IDSA in DuPont svetujejo, da pri bolnikih, ki so hospitalizirani in se jim je pojavila driska po več kot 3 dneh od sprejema, ne pošiljamo iztrebkov za dokaz klasičnih bakterijskih povzročiteljev, ampak je bolj smiselno testiranje na viruse in toksin *C. difficile*. Dodatno DuPont in v IDSA smernicah svetujejo odvzem iztrebkov za kulturo še pri starejših, bolnikih z imunsko oslabelostjo, osebah, ki imajo drisko in delajo v pripravi ali razdeljevanju hrane oziroma so zaposleni v negovalnih ali vzgojno-varstvenih ustanovah *(4, 8)*. Vse izolate dokončno opredelimo s serotipizacijo. V zadnjem času v diagnostiki uporabljamo tudi molekularne metode *(4)*. Večina avtorjev se strinja, da lahko z molekularnimi metodami dokažemo večje število povzročiteljev, vendar obstaja nevarnost, da bomo dokazali tudi mikrobe, ki samo prehodno kolonizirajo črevo in v resnici niso povzročitelji bolezni *(8, 9)*. Molekularne metode imajo svoje mesto pri dokazovanju okužb s *C. difficile*, verižna reakcija s polimerazo ima veliko senzitivnost *(10)*. Viruse dokažemo s pregledom iztrebkov z elektronskim mikroskopom, z dokazom virusnih antigenov z encimsko-imunsko metodo in z dokazom virusnega genoma z molekularnimi metodami. Nekateri hitri testi za dokaz virusnega antigena so slabše občutljivi. Metod osamitve virusa in dokaza virusnega genoma v klinični praksi ne uporabljamo. Rotavirusne okužbe lahko dokažemo serološko, vendar v vsakdanji praksi ta pristop ni uporaben.

Pri perzistentni driski pošiljamo iztrebke, poleg kulture iztrebka za dokaz bakterijskih povzročiteljev, tudi na pregled za dokaz parazitov. Pri kronični driski pošiljamo iztrebke samo za preiskave za dokaz parazitov. Zaradi intermitentnega izločanja parazitov v iztrebke in nizke občutljivosti metode je smiselno, da pošljemo iztrebke iz treh zaporednih odvajanj *(4, 5, 8)*.

ZDRAVLJENJE

Zdravljenje infekcijske driske obsega štiri pristope.

Nadomeščanje tekočine in elektrolitov

Najpomembnejši ukrep je nadomeščanje tekočine in elektrolitov, s katerim lahko preprečimo smrtni potek bolezni predvsem pri dojenčkih in starostnikih. Bolnikom, ki so blago do zmerno dehidrirani, lahko tekočino nadomeščamo enteralno – večinoma svetujemo uporabo oralne rehidracijske tekočine, ker z njo hitreje nadomestimo manjkajočo tekočino kot z navadno vodo, ob tem pa popravimo tudi blage elektrolitne motnje. Če so bolniki zelo izsušeni ali močno bruhajo, moramo tekočino nadomeščati parenteralno *(4, 5, 8)*.

Dietna prehrana

Med akutno drisko svetujemo blago prilagoditev prehrane. Odsvetujemo mleko, razen dojenja. Za dojenčke uporabljamo mleko, ki ne vsebuje laktoze. Za hitrejšo obnovo enterocitov naj bolniki uživa-

jo hrano, ki vsebuje dovolj kalorij, po drugi strani pa ne pospešuje peristaltike in ni težko prebavljiva. Svetujemo, da bolniki uživajo kuhana živila, ki vsebujejo škrob (krompir, testenine) in žitarice (riž, pšenica, oves). Primerni so tudi kuhana zelenjava, zelenjavne juhe, banane, jogurti, krekerji ipd. Obroki naj bodo majhni in pogosti. Ko pričnejo bolniki ponovno odvajati formirane iztrebke, posebne prehranske omejitve niso več potrebne *(5, 11)*. IDSA v svojih smernicah ne podaja posebnih priporočil glede prehrane.

Simptomatsko zdravljenje

Poleg nadomeščanja tekočine in elektrolitov skušamo bolnikom olajšati in omiliti tudi težave, pri čemer imajo pomembno vlogo zdravila za simptomatsko zdravljenje. Uporabljamo lahko bizmutov subsalicilat, ki za 50 % zmanjša število iztrebljanj, loperamid, ki za 80 % zmanjša število iztrebljanj, ali atapulgit (verjetno najbolj varno simptomatsko zdravilo), ki povzroči bolj formirane iztrebke in je na voljo predvsem v Južni Ameriki. Razen atapulgita simptomatskih zdravil nikoli ne predpisujemo samostojno pri dizenteričnem sindromu in pri dojenčkih. Uporabljamo jih lahko največ 48 ur *(4, 5)*. Za novejša zdravila, ki delujejo na kalcijeve kanalčke in na ta način zmanjšajo volumne iztrebkov ter s tem preprečujejo izsušitev, smernice IDSA ne podajajo priporočil, DuPont pa svetuje uporabo krofelemerja *(8)*. Pri nas najpogosteje predpisujemo racekadotril, ki dokazano zmanjša število iztrebljanj in preprečuje izsušitev pri otrocih z virusnimi driskami *(12, 13)*. Dobre rezultate so s tem zdravilom beležili tudi pri potovalnih driskah *(14)*. Za ostale povzročitelje za zdaj še ni zadosti podatkov. Za probiotike trenutno ni prepričljivih dokazov, da bi bili učinkoviti pri zdravljenju posameznih vrst drisk, imajo pa svoje mesto pri preprečevanju driske, povezane z antibiotičnim zdravljenjem *(8)*.

Antibiotično zdravljenje

V Sloveniji izkustveno zdravljenje z antibiotiki predpišemo bolnikom z dizenteričnim sindromom, katerega najpogostejši povzročitelji so v industrializiranih deželah šigele in kampilobaktri *(5)*. Podobno svetuje tudi DuPont, ki tako kot smernice IDSA svetuje zdravljenje vseh bolnikov, pri katerih drisko povzročajo kampilobaktri *(4, 8)*. Pri nas vedno zdravimo bolnike, pri katerih v iztrebkih dokažemo šigele, saj na ta način omejimo njihovo širjenje in okužbe. Pri dokazani driski, ki jo povzročajo kampilobaktri, pa se za usmerjeno zdravljenje odločimo samo pri imunsko oslabelih bolnikih ali bolnikih z drugimi nevarnostnimi dejavniki za zunajčrevesne zaplete. Pri okužbah s salmonelami se za antibiotično zdravljenje odločimo glede na klinično sliko in splošno bolnikovo stanje. Antibiotično zdravljenje ne skrajša trajanja bolezni, zato bolnikov brez osnovnih bolezni z razmeroma lahkim potekom salmoneloze ne zdravimo. Zdravimo bolnike z visoko vročino in s sistemskimi znaki, ki nakazujejo morebitni pojav bakteriemije. Vedno zdravimo tudi vse bolnike z dejavniki za težji potek bolezni. V to skupino uvrščamo:

- bolnike, starejše od 50 let ali mlajše od 3 mesecev,
- bolnike z rakavimi boleznimi,
- bolnike s kronično vnetno črevesno boleznijo,
- bolnike na kroničnem zdravljenju s hemodializo,
- bolnike s sladkorno boleznijo,
- bolnike z anevrizmo aorte, umetnimi zaklopkami in žilnimi vsadki,
- bolnike po presaditvi čvrstega organa,
- bolnike z vnetnimi/degenerativnimi boleznimi sklepov in umetnimi sklepi in
- bolnike s prirojenimi ali pridobljenimi motnjami imunskega odziva *(5)*.

Smernice IDSA svetujejo izkustveno zdravljenje pri dojenčkih, mlajših od 6 mese-

cev, in odraslih po 50. letu ter pri osebah z vstavljenimi umetnimi materiali, s prizadetostjo srčnih zaklopk, hudo aterosklerozo, z rakavimi boleznimi ali ledvično odpovedjo *(4)*. DuPont kot indikacije za izkustveno in usmerjeno zdravljenje drisk, ki jih povzročajo netifusne salmonele, navaja starost manj kot 3 mesece ali več kot 65 let, zdravljenje z glukokortikoidi, kronično vnetno črevesno bolezen, imunsko oslabelost, hemoglobinopatije, nadomestno zdravljenje s hemodializo, anevrizmo aorte in prisotnost umetnih srčnih zaklopk *(15)*. Naša priporočila dodatno vključujejo bolnike s sladkorno boleznijo, ki se je pri naših bolnikih izkazala kot pomemben nevarnostni dejavnik za nastanek zunajčrevesnih zapletov *(5)*.

Pri večini akutnih infekcijskih drisk zdravljenje z antibiotiki ni potrebno. Antibiotiki so kontraindicirani pri sumu na okužbo z enterohemoragično *E. coli*, ker lahko poslabšajo hemolitično-uremični sindrom *(4, 5, 8)*. Slovenska priporočila za zdravljenje akutne infekcijske driske predstavljamo v tabeli 1.

Smernice IDSA in tudi DuPont se ne opredelijo do izkustvenega antibiotičnega zdravljenja bakterijske driske. Pri nas smo se glede na povečano odpornost kampilobaktrov proti fluorokinolonom odločili za prehod na azitromicin. Pri zdravljenju salmonelne driske ostaja pri nas zdravilo izbire ciprofloksacin, ki ga predpišemo za 3–5 dni. Med tem ko DuPont svetuje levofloksacin za 7–10 dni, smernice

Tabela 1. Protimikrobne učinkovine za zdravljenje infekcijske driske v Sloveniji *(16)*. ETEC – enterotoksigena *Escherichia coli*, PO – *per os*.

Bolezen/povzročitelj	Zdravilo izbire (odmerek, način, trajanje)	Alternativno zdravilo (odmerek, način, trajanje)
izkustveno zdravljenje (povzročitelj še ni znan)	simptomatsko	azitromicin (500 mg/24 h PO, 3 dni)
Salmonella (netifusna)	ciprofloksacin (500 mg/12 h PO, 3–7 dni, 14 dni pri bolnikih z imunskimi pomanjkljivostmi)	azitromicin (500 mg/24 h PO, 3 dni)
Shigella	ciprofloksacin (500 mg/12 h PO, 3 dni)	azitromicin (500 mg/24 h PO, 3 dni)
Campylobacter jejuni	azitromicin (500 mg/24 h PO, 3 dni)	ciprofloksacin (500 mg/12 h PO, 3 dni)
Yersinia enterocolitica	ciprofloksacin (500 mg/12 h PO, 3 dni)	azitromicin (500 mg/24 h PO, 3 dni)
Vibrio parahaemolyticus	ciprofloksacin (500 mg/12 h PO, 3 dni)	azitromicin (500 mg/24 h PO, 3 dni)
ETEC	azitromicin (500 mg/24 h PO, 3 dni)	ciprofloksacin (500 mg/12 h PO, 3 dni)
Giardia lamblia	metronidazol (400 mg/12 h PO, 5–10 dni)	/
Entamoeba hystolitica	metronidazol (400 mg/12 h PO, 5–10 dni), nato še paromamicin (500 mg/8 h PO, 10 dni)	/

IDSA svetujejo triemtopirm/sulfamtoksazol (TMP/SMX) pri občutljivih sevih in fluorokinolone pri odpornih sevih za 5–7 dni. Tako ameriški avtorji kot naše smernice svetujejo vsaj 14-dnevno zdravljenje pri bolnikih, ki so imunsko oslabeli. Tudi za zdravljenje šigeloze smernice IDSA narekujejo TMP/SMX kot zdravilo prve izbire, medtem ko DuPont in naša priporočila na prvem mestu navajajo ciprofloksacin, vendar pri nas v odmerku 500 mg vsakih 12 ur, pri DuPontu pa je odmerek višji in znaša 750 mg vsakih 12 ur. Na drugem mestu je pri obeh azitromicin. Po vseh priporočilih traja zdravljenje 3 dni. Smernice IDSA za zdravljenje drisk, ki jih povzročajo kampilobaktri, svetujejo eritromicin 500 mg vsakih 12 ur, skupno 5 dni, med tem ko naše smernice in DuPont svetujejo azitromicin za 3 dni, pri nas je na drugem mestu ciprofloksacin prav tako 3 dni, pri DuPontu pa eritromicin, vendar v višjem odmerku kot pri IDSA, in sicer 500 mg vsakih 6 ur, skupno 5 dni. Po naših priporočilih je tudi za zdravljenje driske, ki jo povzročajo jersinije, na prvem mestu azitromicin, smernice IDSA svetujejo doksiciklin oziroma aminoglikozide, TMP/SMX ali flurokinolone, glede trajanja niso podali opredelitve. Pri ne-kolera vibrijih so DuPontova priporočila enaka našim, medtem ko smernice IDSA ne podajo posebnih priporočil. Enterotoksigene seve *E. coli* po naših priporočilih zdravimo z azitromicinom oziroma ciprofloksacinom 3 dni. Pri smernicah IDSA je na prvem mestu TMP/SMX ali fluorokinoloni, če je povzročitelj odporen, prav tako tri dni. DuPont na prvem mestu navaja rifaksimin, ki v Evropi ni na voljo, 200 mg trikrat dnevno skupno 3 dni ali ciprofloksacin 750 mg na 12 ur 1–3 dni (če se driska po prvem odmerku ustavi, nadaljevanje zdravljenja ni potrebno) oziroma azitromicin 1 g v enkratnem odmerku. Za zdravljenje giardioze so naša priporočila podobna smernicam IDSA, vendar slednje svetujejo vsaj 7-dnevno zdravljenje, naše pa 5-dnevno. DuPont v tem primeru namesto metronidazola svetuje tinidazol v odmerku 2 g v enkratnem odmerku, metronidazol v odmerku 250 mg trikrat dnevno 5–7 dni ali nitrazoksanid 500 mg dvakrat dnevno 3 dni. Tinidazol in nitrazoksanid v Sloveniji nista registrirana. V primerjavi z ameriškimi avtorji priporočamo pri nas nižje odmerke metronidazola za zdravljenje črevesne ameboze, trajanje je enako kot pri priporočilih IDSA. DuPont svetuje samo 5-dnevno zdravljenje. Vsi priporočamo še dodatek intraluminalnega sredstva, ki deluje na amebne spore. Pri nas je to paromomicin, v ZDA pa dodatno še diloksanid furoat ali dijodohidroksikvin *(4, 5, 8, 15)*.

ZAKLJUČEK

Zaradi spremenjene epidemiologije infekcijskih drisk in pojava odpornih sevov bakterijskih povzročiteljev je nujna posodobitev obstoječih smernic IDSA, ki so bile objavljene že leta 2001. Nove smernice bodo objavljene predvidoma jeseni 2016. V primerjavi s trenutnimi smernicami IDSA se naša priporočila razlikujejo predvsem pri zdravljenju drisk, ki jih povzročajo kampilobaktri in salmonele; glede tega smo bolj podobni DuPontovim priporočilom iz leta 2014. Pri nas bi morali izboljšati predvsem upoštevanje priporočil, kdaj je smiselno in smotrno pošiljati iztrebke na kulturo in dokaz virusnih povzročiteljev. Tudi v Sloveniji bi morali uvesti določanje laktoferina v iztrebkih, preden bi jih nato poslali na kulturo. Žal nimamo podatkov o pogostosti predpisovanja antibiotikov za zdravljenje driske na primarnem nivoju, vendar verjetno tako na primarnem kot na bolnišničnem nivoju še vedno prepogosto predpisujemo antibiotike za zdravljenje driske pri bolnikih, ki nimajo nevarnostnih dejavnikov za razsoj bolezni in nastanek zunajčrevesnih zapletov.

LITERATURA

1. Kraigher A. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2013 [internet]. 2014 [citirano 2015 Sep 29]. Dosegljivo na: http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/publikacije-datoteke/epidemiolosko_spremljanje_nalezljivih_bolezni_2013.pdf
2. Wilking H, Spitznagel H, Werber D, et al. Acute gastrointestinal illness in adults in Germany: a population-based telephone survey. Epidemiol Infect. 2013; 141: 2365–75.
3. National enteric disease surveillance: Shigella annual report, 2011. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2013 [citirano 2015 Sep 29]. Dosegljivo na: http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/pdfs/shigella-annual-report-2011-508c.pdf
4. Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. Clin Infect Dis. 2001; 32: 331–51.
5. Logar M, Zakotnik B. Okužbe prebavil: Infekcijska driska. In: Tomažič J, Strle F, eds. Infekcijske bolezni. Ljubljana: Združenje za infektologijo, Slovensko zdravniško društvo, 2014. p. 335–43.
6. Iida T, Naka A, Suthienkul O, et al. Measurement of fecal lactoferrin for rapid diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. Clin Infect Dis. 1997; 25: 167.
7. Guerrant RL, Wanke CA, Barrett LJ, et al. A cost effective and effective approach to the diagnosis and management of acute infectious diarrhea. Bull NY Acad Med. 1987; 63: 484–99.
8. DuPont H. Acute infectious diarrhea in immunocompetent adults. N Engl J Med. 2014; 370: 1532–40.
9. Liu J, Gratz J, Maro A, et al. Simultaneous detection of six diarrhea-causing bacterial pathogens with an in-house PCR-luminex assay. J Clin Microbiol. 2012; 50: 98–103.
10. Deshpande A, Pasupuleti V, Rolston DD, et al. Diagnostic accuracy of real-time polymerase chain reaction in detection of Clostridium difficile in the stool samples of patients with suspected Clostridium difficile infection: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 2011; 53: 81–90.
11. Sullivan PB. Nutritional management of acute diarrhea. Nutrition. 1998; 14: 758–62.
12. Guarino A, Ashkenazi S, Gendrel D, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Pediatric Infectious Diseases evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe: update 2014. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2014; 59: 132–52.
13. Lehert P, Chéron G, Calatayud GA, et al. Racecadotril for childhood gastroenteritis: an individual patient data meta-analysis. Dig Liver Dis. 2011; 43: 707–13.
14. Heather CS. Travellers' diarrhoea. BMJ Clin Evid. 2015. pii: 0901.
15. DuPont. Clinical practice. Bacterial diarrhea. N Engl J Med. 2009; 361: 1560–9.
16. Čižman M, Beović B. Kako predpisujemo protimikrobna zdravila v bolnišnicah. Ljubljana: Sekcija za protimikrobno zdravljenje Slovenskega zdravniškega društva; 2013.

Irena Grmek Košnik[1*], Ingrid Berce[2], Marija Trkov[3], Mateja Ravnik[4], Matejka Bremec[5], Zdenka Horvat Šardi[6], Alenka Štorman[7], Tatjana Harlander[8], Živa Petrovič[9], Mateja Pirš[10]

Okužbe z večkratno odpornim kampilobaktrom v Sloveniji

Infections With Multiple Resistant Campylobacter in Slovenia

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Campylobacter* spp., *Campylobacter jejuni, Campylobacter coli*, večkratno odporne bakterije

Kampilobakterioza je vodilna bakterijska zoonoza v Evropi in po svetu. Širjenje odpornih sevov kampilobaktrov preko hrane in posledične okužbe pri ljudeh so velik javnozdravstveni problem. Namen prispevka je predstaviti podatke o pojavnosti humanih kampilobakterioz za leti 2013 in 2014 v Sloveniji. V letu 2013 smo v Sloveniji iz iztrebkov bolnikov osamili 883 izolatov *Campilobacter jejuni,* odpornost proti kinolonom je bila 64 %, in 75 izolatov *C. coli,* odpornost proti kinolonom je bila 59 %. V letu 2014 pa smo osamili 1.036 izolatov *C. jejuni,* odpornost proti kinolonom je bila 69 % in 88 izolatov *C. coli* z 80 % odpornostjo proti kinolonom. Bolniki so bili stari od 0 do 95 let, najvišji delež obolelih, kar 19 %, je bil v starostni skupini 0–4 let, sledila je starostna skupina 20–24 let (8,2 %). V letu 2014 je bilo kar 60 % obolelih s *C. jejuni* hospitaliziranih. Glede na nizko stopnjo odpornosti *C. jejuni* v Sloveniji ostaja eritromicin še vedno učinkovit terapevtik za zdravljenje humane kampilobakterioze

[1*] Doc. dr. Irena Grmek Košnik, dr. med., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj; irena.grmek.kosnik@nlzoh.si

[2] Ingrid Berce, dr. vet. med., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Nova Gorica, Vipavska cesta 13, 5000 Nova Gorica

[3] Dr. Marija Trkov, dr. vet. med., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo Ljubljana, Grabloviceva ulica 44, 1000 Ljubljana

[4] Mag. Mateja Ravnik, univ. dipl. kem., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj

[5] Matejka Bremec, univ. dipl. mikr., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Koper, Verdijeva ulica 11, 6000 Koper

[6] Zdenka Horvat Šardi, univ. dipl. mikr., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Murska Sobota, Ulica arhitekta Novaka 2b, 9000 Murska Sobota

[7] Alenka Štorman, dr. med., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Celje, Gregorčičeva ulica 5, 3000 Celje

[8] Tatjana Harlander, dr. med., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Novo mesto, Mej vrti 5, 8000 Novo mesto

[9] Živa Petrovič, univ. dipl. biol., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

[10] Asist. dr. Mateja Pirš, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

ABSTRACT

KEY WORDS: *Campylobacter* spp., *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, multidrug-resistant bacteria

Campylobacteriosis is the leading bacterial zoonosis in Europe and worldwide. The spread of resistant campylobacters strains through food and the resulting human infections are a major public health problem. The purpose of this paper is to present data on the incidence of human campylobacteriosis in 2013 and 2014 in Slovenia. In 2013 we isolated 883 isolates of *Campylobacter jejuni* from faeces of patients in Slovenia; resistance to quinolones was 64% , and 75 isolates *C. coli*, resistance to quinolones was 59%. In 2014, we isolated 1,036 *C. jejuni*, with resistance to quinolones reaching 69%, and 88 isolates of *C. coli* with 80% resistance to quinolones. The patients ranged from 0 to 95 years of age, the highest proportion of sufferers was in the age group of 0 to 4 years (19%), followed by the age group of 20 to 24 years (8.2%). In 2014, 60% of people suffering from *C. jejuni* were hospitalized. In view of the low resistance of *C. jejuni* and *C. coli* in Slovenia, erythromycin still remains an effective therapeutic for the treatment of human campylobacteriosis.

UVOD

Kampilobakterioza spada med zoonoze, to je bolezen, skupna ljudem in živalim. Bolniki imajo vodeno drisko, v hujši obliki tudi krvavo, bruhajo, imajo povišano temperaturo, krče v trebuhu, lahko so močno prizadeti. Povzročitelj obolenja pride v telo skozi usta in se izloča z blatom *(1–4)*.

Po epidemioloških podatkih je bakterija rodu *Campylobacter*, posebej vrsti *C. jejuni* in *C. coli*, v Evropi in Severni Ameriki najpogosteje izoliran patogen v prebavnem traktu pri ljudeh. V obdobju 2007–2011 smo v Sloveniji osamili 4.998 humanih in 1.950 perutninskih izolatov *Campylobacter* spp. *(2)*. Pri ljudeh in pri perutnini je prevladoval *C. jejuni*, ki je bil najpogosteje osamljen pri otrocih, starih do 5 let (24,3 %). V Sloveniji je bila incidenca kampilobakterioz v obdobju 2007–2010 vedno višja od evropskega povprečja in je od leta 2008 stalno naraščala; leta 2010 je dosegla 49,9/100.000 prebivalcev *(2)*.

Za človeka so po navadi vir okužbe živila živalskega izvora, možen je tudi prenos preko blata obolelih ljudi in živali. Od živil živalskega izvora so najpomembnejši vir okužbe meso, notranji organi, jajca in včasih tudi mleko. Nevarnost za okužbo ljudi predstavljajo predvsem živila, ki niso dovolj prepečena in prekuhana (ocvrti ali pečeni piščanci, čevapčiči, ražnjiči), uživanje surovega svežega mesa (tatarski biftek) in jedi iz surovih jajc. *C. jejuni* najdemo v črevesju številnih živalskih vrst, medtem ko je *C. coli* razširjen predvsem med prašiči, *C. fetus* subs. *fetus* pa se nahaja pri ovcah in govedu. Obolevnost in umrljivost živali je velika, večina okuženih živali trajno izloča kampilobakterije *(1)*.

Odpornost kampilobaktrov proti številnim antibiotikom, še posebej proti kinolonom, kakor tudi pomanjkanje učinkovitih metod za kontrolo širjenja takih sevov, predstavlja velik javnozdravstveni problem in grožnjo za človeštvo *(2)*.

Prenos teh obolenj s človeka na človeka je sicer možen, vendar v higiensko urejenih razmerah in pri ljudeh s higienskimi navadami (umivanje rok po uporabi stranišča in pred jedjo) le izjemen, saj je treba za okužbo zaužiti veliko število bakterij. Pri majhnih otrocih in oslabelih osebah, pri katerih za razvoj obolenja zadostuje manjše število bakterij, je ta način prenosa bolj pogost. Možna je tudi okužba ljudi

preko blata bolnih ali zdravih domačih živali, predvsem psov in mačk.

MATERIALI IN METODE

V Sloveniji spremljamo okužbe s *Campylobacter* spp. in protimikrobno odpornost *C. jejuni* in *C. coli* pri ljudeh na nacionalni ravni. Sistem spremljanja poteka že od leta 2007 in je nastal na pobudo slovenskih mikrobiologov in Laboratorija za klinično mikrobiologijo Zavoda za zdravstveno varstvo Nova Gorica. V mreži sodeluje vseh devet slovenskih kliničnih mikrobioloških laboratorijev, ki izvajajo sistematično laboratorijsko diagnostiko bakterijskih povzročiteljev črevesnih okužb *(2)*. Nacionalni sistem spremljanja vključuje zbirne podatke o laboratorijsko potrjenih prvih primerih kampilobakterioz pri bolnikih v Sloveniji, starosti in spolu bolnikov, datumu prejema vzorca v laboratorij, vrsti povzročitelja iz rodu *Campylobacter* in rezultatih testiranja odpornosti proti klinično pomembnim antibiotikom. Z metodo difuzije v agarju z diski se testira ciprofloksacin, eritromicin in tetraciklin, skladno s smernicami EUCAST (angl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) in z navodili Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. *EU protocol for harmonised monitoring of antimicrobial resistance in human Salmonella and Campylobacter isolates*, marec 2014) *(5)*. V letu 2014 smo začeli spremljati tudi podatek o hospitalizaciji, ki posredno kaže na težo obolenja.

Podatke za leto 2013 smo povzeli iz objave Slovenske komisije za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKOUPZ) *(6)*. Podatke za leto 2014 smo obdelali iz poročil Nacionalnega laboratorija za zdravje okolje in hrano ter podatkov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

REZULTATI

Campylobacter jejuni

Zajeti izolati: prvi izolati pri bolnikih, iz vseh vzorcev, brez nadzornih kužnin.

Obdobje: 1. 1. 2013–31. 12. 2013 in 1. 1. 2014–31. 12. 2014.

Poudarki, dodatki, pojasnila: Črevesne okužbe, povzročene z bakterijo *C. jejuni*, se praviloma ne zdravijo z antibiotiki. Odpornost proti ciprofloksacinu je zelo pogosta. V letu 2014 je bilo kar 60 % obolelih s *C. jejuni* hospitaliziranih.

Tabela 1. Odpornost humanih izolatov *Campylobacter jejuni* za leto 2013 in 2014. S – *susceptible*, I – *intermediate*, R – *resistant*.

		LETO 2013				LETO 2014			
Antibiotik	**Okrajšava**	**Število prvih izolatov**	**% S**	**% I**	**% R**	**Število prvih izolatov**	**% S**	**% I**	**% R**
eritromicin	E	883	99	0	0	1.036	99	0	0
ciprofloksacin	CIP	883	36	0	64	1.036	31	0	69
tetraciklin	Te	883	72	1	27	1.036	64	0	36

Campylobacter coli

Zajeti izolati: prvi izolati pri bolnikih, iz vseh vzorcev, brez nadzornih kužnin.

Obdobje: 1. 1. 2013–31. 12. 2013 in 1. 1. 2014–31. 12. 2014.

Poudarki, dodatki, pojasnila: Črevesne okužbe, povzročene z bakterijo *C. coli*, se praviloma ne zdravijo z antibiotiki. Odpornost proti ciprofloksacinu je zelo pogosta. V letu 2014 je bilo hospitaliziranih 50 % obolelih s *C. coli*.

Tabela 2. Odpornost humanih izolatov *Campylobacter coli* za leto 2013 in 2014. S – *susceptible*, I – *intermediate*, R – *resistant*.

		LETO 2013				LETO 2014			
Antibiotik	**Okrajšava**	**Število prvih izolatov**	**% S**	**% I**	**% R**	**Število prvih izolatov**	**% S**	**% I**	**% R**
eritromicin	E	75	99	0	1	88	97	0	3
ciprofloksacin	CIP	75	41	0	59	88	20	0	80
tetraciklin	Te	75	59	4	37	88	52	0	48

RAZPRAVA

V letu 2013 smo v Sloveniji iz iztrebkov bolnikov osamili 883 izolatov *C. jejuni* in 75 izolatov *C. coli*, v letu 2014 pa 1.036 *C. jejuni* in 88 izolatov *C. coli*. Tako kot v obdobju 2007 do 2011, tudi v letu 2014 še vedno prevladuje *C. jejuni* (87,5 %), sledi *C. coli* (7,4 %), v 5,1 % pa so bili osamljeni t. i. ne-jejuni in ne-koli kampilobaktri *(2)*. V letu 2013 in 2014, glede na slovensko objavo 2007 in 2011, ni opaziti znatnega spreminjanja števila laboratorijsko potrjenih primerov humanih kampilobakterioz *(2)*. Podatki za leto 2014 kažejo na to, da je večina okužbe v toplejših mesecih leta, od maja do konca septembra, kar je značilno za zmerni pas. Starost obolelih je bila od 0 do 95 let, najvišji delež obolelih, kar 19 %, je bil v starostni skupini od 0 do 4 let, sledila je starostna skupina od 20 do 24 let (8,2 %) in starostna skupina od 15 do 19 let (8 %), v ostalih petletnih starostnih skupinah smo beležili nižjo prevalenco kampilobaktrov (7–2,3 %). V Sloveniji je v letu 2014 obolelo več moških (58 %) kot žensk (42 %). Vsi omenjeni podatki so primerljivi s podatkih drugih EU držav (7).

Podatki za leto 2013 in 2014 kažejo, da je *C. coli* bolj odporen od *C. jejuni*. Največja stopnja odpornosti kampilobaktrov je bila proti ciprofloksacinu in sicer 59 % za leto 2013 oz. 80 % v letu 2014. Odpornost proti tetraciklinu je bila 37 % v letu 2013 oz. 48 % v letu 2014. Odpornost proti eritromicinu je nizka pri obeh sevih. Za *C. coli* je bila v letu 2013 1 %, v letu 2014 3 %, kar kaže na to, da imamo večkratno odpornih sevov kampilobaktrov v Sloveniji na srečo malo.

V poznih osemdesetih prejšnjega stoletja so znanstveniki iz Evrope in Azije začeli poročati o zaznavanju odpornosti bakterije *C. jejuni* na fluorokinolone, kasneje od 1995 tudi iz Amerike. Ta tip odpornosti je sprožila uporaba fluorokinolonov za zdravljenje živine. V Avstraliji, kjer fluorokinoloni niso registrirani, je *C. jejuni* ohranil občutljivost za fluorokinolone *(8)*. Po navedbah strokovnjakov se tudi Slovenija sooča z visoko stopnjo kolonizacije piščancev in kontaminacije trupel živali v klavnicah s termotolerantnimi kampilobaktri *(2)*. Ekstremno visoka odpornost bakterije *C. jejuni* proti ciprofloksacinu pri perutninskih in zelo visoka pri humanih izolatih ter zelo visoka odpornost proti tetraciklinu pri perutnini so realnost, ki je v Sloveniji dosegla zaskrbljujoče razsežnosti *(2)*. Odpornost humanih *C. jejuni* je ostala vseskozi zelo nizka proti gentamicinu (0,2–1 %), nizka proti eritromicinu (0,4–2,5 %), srednja proti tetraciklinu (7,8–19,1 %) oz. visoka le leta 2009 (21,5 %). Prevalenca proti ciprofloksacinu odpornih humanih sevov je ostala vse obdobje zelo visoka in stabilna (58,2–67,2 %) *(2)*. Brojlerji (pitani piščanci) so bili kolonizirani s kampilobaktri v 73–88 %, trupla živali v 81–93 %, meso pa v 49–79 % vzorcev. Odpornost perutninskih izolatov *C. jejuni* je bila nizka proti eritromicinu in gentamicinu (0–2,6 %), zelo visoka proti tetraciklinu (56–64,8 %)

oz. visoka le leta 2008 (32 %) in vseskozi ekstremno visoka proti ciprofloksacinu (72,2–92,1 %). V Sloveniji izstopa podatek o visokem deležu s kampilobaktri kolonizirane perutnine in zaskrbljujoča ekstremno visoka odpornost *C. jejuni* proti kinolonom pri ljudeh in pri perutnini *(2)*.

Eritromicin je še vedno prvo zdravilo izbora za zdravljenje humane kampilobakterioze *(9)*. Odpornost proti eritromicinu je, razen na Malti (10,2 %) in v Združenem kraljestvu (5,4 %), povsod v EU nizka (povprečno 1,7 % leta 2010), trend pa stabilen. Enako je v Sloveniji, saj delež odpornih *C. jejuni* ne presega 2,5 % *(2)*. Glede na nizko stopnjo odpornosti tudi izolatov *C. jejuni* pri perutnini v Sloveniji ostaja eritromicin še vedno učinkovit terapevtik za zdravljenje humane kampilobakterioze *(2)*.

Ciprofloksacin je drugo zdravilo izbora za zdravljenje humane kampilobakterioze pri odraslih. Ker je kampilobakterioza najpogostejša bakterijska zoonoza v Sloveniji in odpornost slovenskih izolatov *C. jejuni* proti ciprofloksacinu presega 60 %, je ciprofloksacin verjetno že neprimeren za empirično terapijo bakterijskih drisk *(2)*.

Tetraciklin in gentamicin se lahko uporabljata za sistemsko zdravljenje kampilobakterioz, odpornih proti makrolidom ali fluorokinolonom *(10, 11)*. Odpornost pri humanih izolatih *C. jejuni* proti tetraciklinu je bila srednje stopnje (< 20 %) v letih 2007, 2008 in 2010, oz. visoka leta 2009 (21,5 %). Nasprotno pa ostaja visoko ohranjena občutljivost humanih in perutninskih izolatov *C. jejuni* za gentamicin.

V letu 2014 smo pri šestindvajsetletnem moškem z več mesecem trajajočimi prebavnimi težavami izolirali *Campylobacter coli*, ki je našo pozornost pritegnil zaradi odpornosti *(12)*. Sev je bil po navodilih testiranja EUCAST odporen na vse predlagane antibiotike: eritromicin, tetracikline in ciprofloksacin. Zaradi izjemne odpornosti smo stopili v stik z napotno zdravnico, ki je povedala, da ima bolnik dejansko težave že več mesecev. Bolnik je v teh mesecih shujšal kar nekaj kilogramov, ves čas ima občutek napenjanja in meteorizma kljub jemanju Amoksiklava in kasneje Sumameda. UZ trebuha je pokazal nekoliko zadebeljen ileum in cekum, ki sta bila še v mejah normale. Nadaljnja nestandardizirana testiranja so pokazala, da je sev občutljiv za kloramfenikol, gentamicin, tigeciklin in imipenem. Bolnik je bil ponovno obravnavan pri infektologu. Iz anamneze bolnika opisanega primera kot tudi nacionalnih podatkov o občutljivosti izolatov kampilobaktrov lahko sklepamo, da je verjetno bolnik omenjeni večkratno odporni sev pridobil v tujini. Najverjetnejša pot okužbe je bila preko hrane, saj je bolnik v anketiranju navajal različna sumljiva živila. Pri domačem, leto dni starem psu, uvoženem iz Španije, bakterije nismo izolirali.

V Italiji so pri izolatih kampilobaktrov iz piščancev dokazali visoko stopnjo odpornosti (65–100 %) proti kinolonom, teraciklinom in sulfametoksazolu s trimetoprimom, pri izolatih iz puranov pa 74–96 % odpornost. Zaznali so tudi odpornost proti ampicilinu (97 % pri piščancih, 88 % pri puranih) in pri najmanj treh cefalosporinih (93–100 % pri piščancih, 100 % pri puranih). Obratno ni bilo izolata kampilobaktra, odpornega proti kloramfenikolu. Pri obeh vrstah perutnine so bili izolati kampilobaktra občutljivi za amoksicilin s klavulansko kislino in aminoglikozide, za makrolide in za klindamicin med izolati pri puranih in za *C. jejuni* iz piščancev, medtem ko je bila večina izolatov *C. coli* iz piščancev (87,5 %) odpornih. Ostale razlike med vrstami *C. jejuni* in *C. coli* so bile ugotovljene predvsem pri piščancih, s celotno prevlado odpornosti *C. coli* glede na *C. jejuni* *(13, 14)*.

Za preprečevanje okužb s kampilobaktri je najbolj pomembna pravilna pripra-

va hrane ter pravilno hranjenje živil in že pripravljene hrane. Najpomembnejše pravilo v preprečevanju kampilobakterioze je, da uživamo le dobro prepečeno ali prekuhano meso, saj visoka temperatura uničuje bakterije. Meso mora biti prepečeno in/ali prekuhano tudi v notranjosti, zato je poleg temperature pomemben tudi čas toplotne obdelave. Pripravljeno hrano, ki je ne zaužijemo takoj, lahko hranimo krajši čas le v hladilniku. Tudi jajc ne uživamo surovih. Uživamo le prekuhano ali skisano mleko, ki ga do uporabe hranimo v hladilniku. V vsaki kuhinji morajo biti zagotovljeni taki pogoji, da ne okužimo toplotno že obdelanih živil in živil, ki jih uživamo surove. Za rezanje surovega mesa in drobovine uporabljamo deske in nože, ki jih ne smemo uporabljati za druge namene (rezanje salam, kuhanega mesa, zelenjave, kruha). Delovne površine, kjer pripravljamo meso, temeljito očistimo in osušimo. Krpe, ki jih uporabljamo, pogosto menjamo ali prekuhavamo. Tudi za prehrano psov in mačk uporabljamo prekuhano meso.

ZAKLJUČEK

Zdravniki moramo biti pozorni, da driske, ki zahtevajo zdravljenje, etiološko opredelimo in zdravimo po antibiogramu. Posebej pozorni moramo biti v primerih, ko prebavne težave vztrajajo tudi po antibiotični terapiji. Danes živimo v času globalizacije. Epidemiologi in mikrobiologi moramo biti pripravljeni na vse – na nove mikroorganizme kot tudi na stare mikroorganizme z novimi oblikami odpornosti.

LITERATURA

1. Andlovic A. Kampilobakterji. In: Gubina M, Ihan M. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Ljubljana: Med Razgl; 2002. p. 217–20.
2. Berce I, Gruntar I. Kampilobakterioza – pojavnost in nadzor pri človeku in perutnini v Sloveniji. In: 4. Baničevi dnevi. Med Razgl. 2012; 51: 45–53.
3. Feierl G, Jelovcan S. Campylobacteriosis in Austria: situation and trends, Wien Klin Wochenschr. 2009; 121: 103–7.
4. Republika Slovenija. Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano in Ministrstvo za zdravje. Program monitoringa zoonoz in povzročiteljev zoonoz 2015 [internet]. Ljubljana [citirano 2015 Sep 9]. Dostopno na: http://www.uvhvvr.gov.si/fileadmin/uvhvvr.gov.si/pageuploads/DELOVNA_PODROCJA/Zivila/zoonoze/Program_monitoringa_zoonoz_za_leto_2015.pdf
5. EUCAST: Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 5.0 [internet]. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [citirano 2015 Sep 9]. Dosegljivo na: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
6. Štrumbelj I, Berce I, Harlander T, et al. Pregled občutljivosti bakterij za antibiotike – Slovenija 2013. Ljubljana: Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ); 2014. 1. izdaja. Dosegljivo na: http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz
7. European food safety authority, European centre for disease prevention and control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. EFSA Journal. 2012; 10 (3): 2597.
8. Rokosz N, Rastawicki W, Wołkowicz T. Microbiological diagnosis of infections caused by Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in humans. Postepy Hig Med Dosw. 2014; 68 (0): 48–56.
9. Giaccomelli M, Salata C, Martini M, et al. Antimicrobial Resistance of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli from Poultry in Italy. Microb Drug Resist. 2013 (ePub ahead of print).
10. Belanger AE, Shryock TR. Macrolide-resistant *Campylobacter*: the meat of the matter. J Antimicrob Chemother. 2007; 60: 715–23.
11. Skjøt - Rasmussen LS, Ethelberg S, Emborg HD, et al. Trends in occurence of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from broiler chickens, broiler chicken meat, and human domestically acquired cases and travel associated cases in Denmark. Int J Food Microbiol. 2009; 131 (2–3): 277–9.
12. Grmek Košnik I, Ribič H, Škerjanc M, et al. Primer odpornega seva *Campylobacter coli* pri bolniku iz Ljubljane. Enboz [internet]. 2014 [citirano 2015 Sep 20]; 4 (2): 11–14. Dosegljivo na: http://www.ivz.si/enboz?pi=5&_5_Filename=attName.png&_5_MediaId=7790&_5_AutoResize=false&pl=223-5.3.8
13. Butzler JP. Campylobacter, from obscurity to celebrity. Clin Microbiol Infect. 2004; 10: 868–76.
14. Rasmussen LS, Ethelberg S, Emborg HD, et al. Trends in occurence of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from broiler chickens, broiler chicken meat, and human domestically acquired cases and travel associated cases in Denmark. Int J Food Microbiol. 2009; 131: 277–9.

Ingrid Berce[1*], Tanja Milanič Koron[2], Mateja Pirš[3], Romina Kofol[4]

Campylobacter concisus – porajajoči se patogen: primeri okužb pri otrocih na Goriškem

Campylobacter concisus – *An Emerging Pathogen: Cases of Enteric Infections in Children from the Gorica Region*

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Campylobacter concisus*, klinična slika, driska, gastroenteritis, patogeneza, incidenca, prevalenca

Poleg že znanih pomembnih patogenov, kot sta *Campylobacter jejuni* in *C. coli*, se kopičijo tudi dokazi o kliničnem pomenu porajajočih se kampilobaktrov, med katere sodi tudi *C. concisus*. Podatki o okužbi s *C. concisus* v Sloveniji so skopi. Le posamezni klinični mikrobiološki laboratoriji uporabljajo poleg selektivnih gojišč še filtracijsko tehniko za izolacijo kampilobaktrov, ki je optimalna metoda za izolacijo porajajočih se *Campylobacter* spp. Zaradi težav pri izvedbi filtracijske tehnike je pojavljanje porajajočih se vrst *Campylobacter* spp. v Sloveniji podcenjeno. Namen naše študije je bil opredeliti mikrobiološke značilnosti izolatov *C. concisus* ter klinične in epidemiološke značilnosti okužb, povezanih s tem kampilobaktrom, hkrati pa smo želeli predstaviti laboratorijske izkušnje z metodo membranske filtracije po protokolu Cape Town. V šestmesečnem obdobju (januar–junij 2015) smo obdelali 446 diareičnih vzorcev blata iz Goriške regije. Kampilobaktre smo iskali s kultivacijo na selektivnem gojišču ter na neselektivnem agarju z uporabo membranske filtracije. Ugotovili smo visoko prevalenco *C. concisus* (11,2 %) tako pri bolnikih z akutnim gastroenteritisom kot tudi s kroničnim enteritisom, še posebej med otroki, mlajšimi od 10 let, in odraslimi nad 60. letom starosti. Incidenca *C. concisus* je bila 52,6 %, v istem obdobju pa je bila incidenca *C. jejuni* 25,3 %. Ugotovili smo veliko genetsko raznolikost izolatov *C. concisus*. Rezultati študije kažejo na pomembnost in podcenjenost porajajočega se patogena *C. concisus* v Sloveniji. Pokazali smo, da je metoda membranske filtracije po protokolu Cape Town preprost in učinkovit način za izolacijo porajajočih se vrst iz rodu *Campylobacter*.

[1*] Ingrid Berce, dr. vet. med., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Center za medicinsko mikrobiologijo, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Nova Gorica, Vipavska cesta 13, 5000 Nova Gorica; ingrid.berce@nlzoh.si

[2] Tanja Milanič Koron, dr. med., Splošna bolnišnica »Dr. Franca Derganca« Nova Gorica, Oddelek za otroške bolezni, Ulica padlih borcev 13 A, 5290 Šempeter pri Gorici

[3] Asist. dr. Mateja Pirš, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

[4] Romina Kofol, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

ABSTRACT

KEY WORDS: *Campylobacter concisus*, clinical manifestations, diarrhoea, gastroenteritis, pathogenesis, incidence, prevalence

In addition to *Campylobacter jejuni* and *C. coli* there is increasing recognition of the clinical importance of emerging campylobacter species including *C. concisus*. There is some data on *C. concisus* infection in Slovenia. The majority of clinical microbiology laboratories do not use selective media and filtration technique to isolate *Campylobacter* spp., which would be an optimal method for isolation of emerging *Campylobacteria*. In Slovenia, the emerging campylobacters are underisolated and underestimated due to difficulties in performing the filtration technique. The aims of our study were to provide some microbiological, epidemiological and clinical characteristics of *C. concisus* as well as to demonstrate our experience with the Cape Town protocol method for isolating this pathogen. During a 6-month period (January–June 2015) 446 diarrhoeic stool samples from the Gorica Region were cultivated for *Campylobacter* spp. on a selective medium and on a non-selective agar with the addition of filter technique. We found a high prevalence of *C. concisus* (11.2%) among patients with acute and persistent gastroenteritis, especially among children (< 10 years) and adults (> 60 years). The incidence of *C. concisus* was 52.6% compared to 25.3% of *C. jejuni* at that time. We have also demonstrated high genetic diversity of *C. concisus* isolated during the study period. Our study suggests that *C. concisus* could be an important and underestimated emerging pathogen in Slovenia. Membrane filtration technique was found to be a simple and efficient isolation protocol for emerging *Campylobacter* spp.

LABORATORIJSKE PRIJAVE OKUŽB S *CAMPYLOBACTER CONCISUS* V SLOVENIJI

Kampilobakterioza je v Sloveniji in Evropski uniji (EU) še vedno najpogosteje prijavljena črevesna nalezljiva bolezen. Leta 2013 je bilo 6 % več prijav kampilobaktrov kot leto prej, incidenčna stopnja pa se je leta 2013 povečala za 3 % v primerjavi s petletnim povprečjem. Po incidenci je prednjačila novogoriška zdravstvena regija s 83 primeri na 100.000 prebivalcev pred murskosoboško (73/100.000) in celjsko (61/100.000). *Campylobacter jejuni* je bil najpogostejša osamljena vrsta povzročitelja (87 %), sledila sta mu *C. coli* (6 %) in *C. concisus* (3 %). V regiji z najvišjo incidenco v državi je bilo to razmerje drugačno. *C. jejuni* je bil v novogoriški regiji ugotovljen le v 52 %, *C. coli* v 2 %, *C. concisus* pa v 26 % primerov. V letu 2013 je bila v Sloveniji incidenčna stopnja okužb s *C. jejuni* 42/100.000, s *C. concisus* pa 1,21/100.000 prebivalcev. Prav tega leta beležimo prve prijave okužb z vrsto *C. concisus* v Sloveniji. Laboratorijsko potrjeni primeri okužb so vse do danes samo iz dveh slovenskih kliničnih mikrobioloških laboratorijev.

Incidenca *C. concisus* je zanesljivo močno podcenjena, saj se povzročitelj pojavlja le v 3 slovenskih zdravstvenih regijah: goriški, koprski in ljubljanski regiji, glede na epidemiologijo kampilobakterioz v naši državi pa bi bilo pričakovati enakomerno razporeditev po regijah. *(1).*

NAMEN

V prispevku prikazujemo naše izkušnje z osamitvijo in tipizacijo 21 sevov *C. concisus* ter klinične značilnosti okužb, povzročenih s to vrsto kampilobaktra pri otrocih,

ki so se zdravili zaradi akutne ali prolongirane driske na Oddelku za otroške bolezni Splošne bolnišnice »Dr. Franca Derganca« Nova Gorica (SBG) v prvi polovici leta 2015. Predstavljene so tudi nekatere mikrobiološke in epidemiološke značilnosti tega porajajočega se patogena. Prikazana je priporočena metoda za osamitev *C. concisus* in drugih netermofilnih kampilobaktrov iz vzorcev iztrebkov.

BAKTERIJA *C. CONCISUS* V POVEZAVI Z GASTROENTERITISOM IN KRONIČNO VNETNO ČREVESNO BOLEZNIJO

Bakterije iz rodu *Campylobacter* uvrščamo v družino *Campylobacteraceae*, red *Campylobacterales* in razred *Epsilonproteobacteria*. Decembra 2014 je bilo v rodu opisanih 26 vrst, 2 začasni vrsti in 9 podvrst kampilobaktrov. Rod *Campylobacter* je bil prvič poimenovan leta 1963. Tipska vrsta iz tega rodu je *C. fetus (2)*. Najbolj znani in opisani vrsti sta *C. jejuni* in *C. coli*, ki sta tudi pri nas na prvem mestu med povzročitelji bakterijskih gastroenteritisov *(1, 2)*.

Vse več je poročil o porajajočih se vrstah kampilobaktrov, med katerimi so *C. concisus, C. ureolyticus, C. upsaliensis, C. lari* in drugi. Tudi te vrste zelo verjetno prispevajo k etiologiji gastroenteritisov, še posebej v primerih, ko ni ugotovljen noben drug povzročitelj. Porajajoči se kampilobaktri so dejansko podcenjeni in slabo prepoznani tako mikrobiološko kot posledično tudi klinično. Vzrok so specialne tehnike za osamitev bakterij. Številni mikrobiološki laboratoriji se takih tehnik še ne poslužujejo, saj so relativno zamudne in zahtevne *(2)*.

Čeprav je *C. concisus* poznan že več kot 30 let, so ga prvih 10 let po odkritju opisovali zgolj v zvezi z periodontalnimi okužbami, vendar zanesljive povezave do danes niso uspeli potrditi. V zadnjih 20 letih pa je zanimanje zanj naraslo in vse več je raziskav, ki ga povezujejo z intestinalnimi obolenji, predvsem z akutnim gastroenteritisom in perzistentno drisko ter v zadnjem času s kronično vnetno črevesno boleznijo (KVČB) *(2–4)*. Kolonizacija s *C. concisus* je odvisna od razpoložljivosti H_2 v črevesnem okolju, saj je ta nujen za optimalno rast in virulenco te bakterije *(5)*.

Epidemiološki podatki iz evropskih držav v zadnjih letih so spremenili naše razumevanje o kliničnem pomenu bakterije *C. concisus* v zvezi z akutnim gastroenteritisom. Na Nizozemskem so leta 2011 ugotovili enako prevalenco okužb s *C. concisus* kot s *C. jejuni* (4,1 %) *(2)*. V Švici so v letu 2013 samo z izboljšanjem atmosferskih pogojev za kultivacijo *C. concisus*, tako, da so dvignili delež H_2, dosegli porast incidence *C. concisus* z 0 na 1,92 %. Pojav so opisali kot lažni izbruh *(6)*.

Na Danskem so že v letih 2009 in 2010 izmerili zelo visoko incidenco *C. concisus* v splošni populaciji (35/100.000 prebivalcev). Delež osamljenih *C. concisus* (44,5 %) se je močno približal deležu *C. jejuni* (54,6 %). Prevalenca *C. concisus* pri odraslih in otrocih med vsemi preiskanimi vzorci je bila 3,9 %, *C. jejuni* pa 4,8 % *(7, 8)*.

Danci so opazili, da so v splošni populaciji za gastroenteritisom, povzročenim s *C. concisus*, najpogosteje obolevali otroci, stari manj kot eno leto, nato otroci v starostni skupini 1–4 let in odrasli, starejši od 65 let. Povzročitelj je imel skoraj konstantno prevalenco čez celo leto. Mikrob je v primerjavi s *C. jejuni* povzročil blažje oblike akutnega gastroenteritisa, ki je pri več kot 80 % bolnikov potekal s prolongirano drisko > 2 tedna. Visoko število bolnikov je po 6 mesecih še vedno navajalo bolečine v trebuhu, mehko blato in različno konsistenco blata od dneva do dneva, kar pa se ni razlikovalo od poznih simptomov, značilnih za sindrom razdražljivega črevesja, ki so jih navajali bolniki okuženi s *C. jejuni* ali *C. coli (7)*. V nadaljevanju študije so zaključili, da obstaja 25 % tveganje za razvoj sindroma razdražljivega črevesa-

ja pri bolnikih, ki so zboleli za gastroenteritisom, povzročenim s *C. concisus*, faktorji tveganja pa so bili psihološki *(2, 9)*.

Tudi na Portugalskem so leta 2012 beležili podobne podatke. Pri 298 bolnikih z drisko je bila prevalenca *C. concisus* 8 %, *C. jejuni* pa 13,7 %. *C. concisus* s 24,2 % deležem je sledil najbolj pogosti vrsti *C. jejuni* z 41,4 % *(10)*. O primerih gastroenteritisov, povezanih s *C. concisus*, poročajo tudi iz drugih delov sveta *(2)*.

C. concisus povezujejo tudi z drugimi resnimi gastrointestinalnimi obolenji, kot sta obliki KVČB (Crohnova bolezen in ulcerozni kolitis), pa tudi z nekaterimi boleznimi požiralnika, funkcionalnimi gastrointestinalnimi motnjami, celiakijo, holecistitisom in rakom kolona. Sodobne študije kažejo na to, da je med porajajočimi se patogeni prav *C. concisus* tisti, ki kaže najtrdnejše dokaze za povezavo med infekcijo s tem povzročiteljem in KVČB. V številnih študijah so ugotovili, da je bila prevalenca *C. concisus* statistično značilno višja pri bolnikih z ulceroznim kolitisom in Crohnovo boleznijo kot pri kontrolnih skupinah. Popolna povezava med KVČB in sicer genetsko zelo heterogeno bakterijo *C. concisus* še ni dokončno potrjena in je predmet intenzivnih raziskav specifičnih genetskih variant te bakterije. Prav tako kot *C. jejuni* tudi *C. concisus* povzroča zunajčrevesne lokalne izolirane in sistemske infekcije *(2)*.

VIRULENČNI FAKTORJI IN REZERVOAR BAKTERIJE TER GENETSKA RAZNOLIKOST *CAMPYLOBACTER CONCISUS*

C. concisus je sestavni del ustne mikrobiote večine ljudi *(4)*. Ustna votlina je zelo verjetno naravni rezervoar bakterije, kjer živijo vsi štirje genetski tipi tega mikroba, tako patogeni kot nepatogeni *(2, 4, 11)*. Najbolj pomemben rezervoar med živalmi je perutnina. Prenos je zoonotski s hrano, s človeka na človeka pa se prenaša fekalno-oralno ali preko okuženih predmetov in površin *(2)*.

C. concisus je genetsko zelo raznolik mikrob. Posebne genetske variante, ki jih imenujemo tudi genomospeciesi, so po danes znanih podatkih mogoče povezane z obolenji. Znani so 2–4 genetsko variabilni genomospeciesi. Novejša dognanja so pripeljala do hipoteze, da obstajata 2 patotipa *C. concisus*, ki se razlikujeta od nepatogenih sevov. Prvi tip so adherentni in invazivni sevi (AICC), za katere je značilno, da imajo sposobnost preživeti intracelularno, kar omogoča eksotoksin 9/DnaI in drugi virulenčni faktorji. Drugi patotip pa so toksigeni sevi *C. concisus* (AToCC), ki proizvajajo toksin Zot (*zonula occludens toxin*), ta pa je usmerjen na tesne stike med celicami gostitelja *(2, 12)*. Sevi, osamljeni iz vzorcev bolnikov s kroničnimi črevesnimi boleznimi, imajo značilno povečano sposobnost invazije črevesnih celic v primerjavi s sevi *C. concisus*, izoliranimi pri bolnikih z akutnim gastoenteritisom, in pri zdravi kontrolni skupini, za kar je odgovoren eksotoksin 9/DnaI, ki je na plazmidu *(13)*.

CAMPYLOBACTER CONCISUS – NEKATERE SPECIFIČNE ZNAČILNOSTI MIKROORGANIZMA

Poleg sodobnih metod za dokaz bakterijskih povzročiteljev črevesnih okužb, kot so sekvenciranje genoma in pomnoževanje značilnih odsekov nukleinskih kislin ter določanja antigenov, se rutinsko najpogosteje še vedno uporabljajo metode, ki omogočajo osamitev povzročitelja *(14, 15)*. Kampilobaktri so zahtevne bakterije, saj zahtevajo posebne atmosferske in temperaturne pogoje rasti, pa tudi vrste gojišč, na katerih uspevajo. Termofilne kampilobaktre, ki se prenašajo z živali na človeka, predvsem najpogostejši vrsti *C. jejuni* in *C. coli*, lahko že desetletja uspešno kultiviramo in osamimo na selektivnih gojiščih z antibiotiki, ki zavirajo rast

normalne črevesne mikrobiote *(16)*. Nekateri drugi, predvsem porajajoči se *Campylobacter* spp., pa so občutljivi na nekatere antibiotike v selektivnih gojiščih in jih na klasičen način ne moremo osamiti. Uspešno jih lahko kultiviramo z metodo membranske filtracije na neselektivnem gojišču, ki omogoča izolacijo številnih bakterij iz rodu *Campylobacter* spp., med njimi tudi porajajoči se *C. concisus (17, 18)*.

C. concisus je zelo zahteven mikroorganizem. Njegove številne lastnosti botrujejo temu, da je v neredkih mikrobioloških diagnostičnih laboratorijih še vedno podcenjen in neprepoznan. Njegova rast je namreč močno ali popolnoma zavrta na običajnih selektivnih gojiščih, primernih za rast kampilobaktrov, ki se inkubirajo v mikroaerobni mešanici na 42 °C 2 dni. Pogoji s previsoko temperaturo in atmosfero, kjer primanjkuje vodika, ter prekratek inkubacijski čas so vse prej kot optimalni za uspešno osamitev *C. concisus*. Za uspešno rast je primerna kultivacija kužnin na neselektivnih gojiščih z ovčjo ali konjsko krvjo po predhodni membranski filtraciji kužnin po protokolu Cape Town z modifikacijami *(17–19)*.

TIPIČNA RAST *C. CONCISUS*

Na neselektivnih gojiščih s 5 % ovčje ali konjske krvi raste počasi, 2–4 dni ali več, bolje na 35 °C kot na 42 °C. Kolonije so majhne, velike 1–2 mm, okrogle, gladke, ravnih robov, sivkaste ali sivorjave barve in svetleče. So zelo majhni, tanki in rahlo ukrivljeni ali spiralni po Gramu negativni bacili. Imajo enega ali dva polarna bička, ki jim omogočata tipično gibanje. Tako kot drugi kampilobaktri tudi *C. concisus* včasih oblikuje dolge bacilarne oblike ali prehaja v kokoidno obliko *(20)*.

MATERIALI IN METODE

Fekalni vzorci

Od januarja do junija 2015 smo na Oddelku za medicinsko mikrobiologijo Nova Gorica Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano pri 446 diareičnih vzorcih iztrebkov otrok in odraslih, ki so bili hospitalizirani ali obravnavani izvenbolnišnično, opravili klasično koprokulturo. Vsi vzorci iztrebkov so bili pregledani na prisotnost patogenih črevesnih bakterij iz rodu *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica* in *Y. pseudotuberculosis*, na *E. coli*, ki povzročajo črevesne okužbe, ter na *Aeromonas* spp. po naročilu lečečega zdravnika.

Osamitev *Campylobacter* spp.

Za osamitev *Campylobacter* spp. smo uporabili dve metodi: kultivacijo na selektivnem gojišču CSM (*Campylobacter Selective Medium*) po Karmaliju (Oxoid) brez predhodne filtracije, in neselektivno gojišče s triptozo ter ovčjo krvjo (TBA, Oxoid) po predhodni membranski filtraciji kužnin po protokolu Cape Town z modifikacijo *(17–19)*.

Kultivacija na selektivnem gojišču CSM po Karmaliju

Iztrebke smo suspendirali v 1 mL sterilne fiziološke raztopine v razmerju 1:2 do 1:10 in jih direktno nacepili na selektivno gojišče CSM ter zredčili po metodi štirih kvadrantov. Petrijevke smo zložili v 3,5 L lonce (Oxoid), iz katerih smo evakuirali zrak, nato pa jih napolnili z mikroaerobno mešanico plinov v končni koncentraciji 5 % O_2, 10 % CO_2 in 85 % N_2. Plošče smo inkubirali 3 dni na 42 °C, pregledovali pa dnevno *(19)*.

Membranska filtracija iztrebkov po protokolu Cape Town z modifikacijo

Uporabili smo male plošče TBA s 5 % ovčje krvi, fi 50 mm. Na sredino krvnega agarja smo aseptično nanesli polikarbonatni (PC) membranski filter, fi 47 mm, velikosti por 0,60 µm (Nuclepore, Whatman). Nanj smo s sterilno Paster-

jevo pipeto enakomerno v krogu nanesli 8 kapljic suspenzije iztrebkov, plošče pa previdno prestavili za 40 minut v termostat na 35 °C z običajno aerobno atmosfero. Nato smo s sterilno pinceto zelo previdno odstranili membranske filtre, da ne bi prišlo do kontaminacije. Plošče smo inkubirali v anaerobni atmosferi brez katalizatorja na 35 °C. Tako smo dosegli mikroaerobno atmosfero s povečanim tlakom H_2 (6 % O_2, 6 % CO_2, 3 % H_2, 85 % N_2), ki je ugodna za rast *C. concisus*. Plošče smo pregledovali dnevno in podaljševali inkubacijo do skupno štirih dni. Vse sumljive in morfološko različne kolonije (po velikosti, barvi, času pojava, itd.) smo subkultivirali na TSA pod enakimi pogoji kot primarno kužnino *(17, 18)*.

Identifikacija *Campylobacter* spp.

Vse sumljive kolonije smo identificirali do vrste. Poleg barvanja po Gramu smo naredili še teste na prisotnost oksidaze, katalaze in hipurikaze *(21, 22)*. Hipurat pozitivne seve smo identificirali kot *Campylobacter jejuni*. Vse ostale seve smo identificirali do vrste s pomočjo metode masne spektrometrije (MALDI-TOF, Bruker).

Molekularna tipizacija *Campylobacter concisus*

Pri izolatih *C. concisus* smo za izolacijo bakterijske DNK uporabili komercialni izolacijski testni komplet *LightCycler® Advanced Lysis Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija) v skladu z navodili proizvajalca. Genetsko raznolikost izolatov *C. concisus* smo opredelili z več gensko analizo s sekvenciranjem (angl. *Multilocus Sequence Typing*, MLST). Metodo MLST smo povzeli po Miller in sod. *(24)*.

Klinično smo opisali le vseh 21 pediatričih bolnikov, ki so se v času od 01. 01. 2015 do 30. 06. 2015 zdravili zaradi akutne ali dolgotrajne driske na Oddelku za otroške bolezni SBG in so imeli dokazano enterično okužbo s *C. concisus*. Med njimi je bilo 9 hospitaliziranih in 12 ambulantno obravnavanih otrok. Pri vseh je pediater naročil preiskavo na vse običajne patogene črevesne bakterije, vključno s preiskavo na kampilobakter.

REZULTATI IN RAZPRAVA

Pogostost osamitve *Campylobacter* spp. iz vseh preiskanih vzorcev z metodo izolacije na selektivnem gojišču in na neselektivnem gojišču s predhodno membransko filtracijo vzorcev prikazuje tabela 1.

Tabela 1. Število in delež osamljenih *Campylobacter* spp. iz 446 vzorcev glede na vrsto gojišča od januarja do junija 2015. CSM - *Campylobacter Selective Medium*, MF - membranska filtracija.

	Incidenca	Rast samo CSM		Rast samo MF		Rast CSM in MF	
Mikroorganizem	**N**	**Delež (%)**	**N**	**Delež (%)**	**N**	**Delež (%)**	**N**	**Delež (%)**
C. concisus	50	52,6	3	6,0	44	88,0	3	6,0
C. jejuni	24	25,3	2	0,2	2	8,3	20	83,3
C. ureolyticus	13	13,7	0	0,0	13	100,0	0	0,0
C. curvus	4	4,2	0	0,0	4	100,0	0	0,0
Druge vrste	4	4,2	1	25,0	3	75,0	0	0,0
Skupaj	95	100,0	6	6,3	66	69,5	23	24,2

C. concisus je bil najbolj pogosto osamljena vrsta (50/95) med pozitivnimi vzorci v polletnem obdobju. Incidenca *C. jejuni* je bila v istem obdobju več kot dvakrat nižja.

Prevalenca *C. concisus* je bila v tem obdobju 11,2 % (50/446) med preiskanimi vzorci, *C. jejuni* pa 5,3 % (24/446). Izolati *C. concisus* so se pojavljali enakomerno skozi vseh 6 mesecev; januarja 6, februarja 12, marca 11, aprila 4, maja 6 in junija 11. Število osamljenih *C. jejuni* po mesecih pa je bilo vseskozi nizko in je začelo naraščati šele junija. Danci so ugotovili, da ima *C. concisus* skoraj konstantno prevalenco skozi vse leto, kar je v nasprotju s sezonskim pojavljanjem *C. jejuni* v toplejših mesecih v zmernem pasu in je značilno tudi za Slovenijo *(1, 7)*. Nižja prevalenca *C. jejuni* v zimskem in spomladanskem času do konca junija 2015 je bila pričakovana, saj je zanj značilen strm porast šele v poletnih mesecih.

Z uporabo izključno selektivnega gojišča CSM smo osamili samo 30,5 % (29/95) vseh kampilobaktrov, z metodo membranske filtracije pa nam je uspelo izolirati 93,7 % (89/95) *Campylobacter* spp. Če bi uporabljali samo selektivno gojišče, bi imeli lažno negativne rezultate v kar 69,5 % (66/95) primerov okužb. S pomočjo MF smo lahko osamili 88 % (44/50) *C. concisus*, na gojišču CSM, ki je selektivno predvsem za *C. jejuni* in *C. coli*, pa le 12 % (6/50) izolatov te vrste (tabela 1). Španci so z MF uspeli osamiti 75 % vseh kampilobaktrov, Goossens s sodelavci pa 87,3 %, kjer so uporabljali membranske filtre velikosti por 0,65 µm, pa celo 94–95 % *(23)*.

C. concisus kot povzročitelj gastroenteritisa je bil večinoma uspešno osamljen z metodo membranske filtracije pri otrocih in imunsko kompromitiranih odraslih tudi drugod. Ker metoda ni standardizirana, se deleži izolacij razlikujejo glede izolacijske in identifikacijske metode, geografskih faktorjev, virov in poti širjenja, število testiranih vzorcev in razlik v populaciji glede starosti in zdravstvenega stanja *(7, 20)*.

Če primerjamo naše podatke o prevalenci iz tabele 1 s podatki iz Južne Afrike, kjer je bila desetletna prevalenca *C. concisus* pri otrocih 5 %, v Avstraliji 3 %, na Danskem v splošni populaciji otrok in odraslih 3,9 %, ugotavljamo zelo visoko prevalenco okužb s to vrsto kampilobaktra v Goriški zdravstveni regiji v polletnem opazovalnem obdobju *(20)*.

C. concisus je bil najpogosteje osamljen pri otrocih od 0–10 let starosti (52 %) in pri odraslih, starejših od 60 let (tabela 2).

Tabela 2. Prevalenca *C. concisus* glede na starostno skupino med pozitivnimi vzorci.

	Starostne skupine v letih								
C. concisus	< 1	1–4	5–10	11–18	19–30	31–45	46–60	> 60	Skupaj
N	8	10	8	3	2	5	5	9	50
Delež (%)	16	20	16	6	4	10	10	18	100

Genetska raznolikost izolatov *C. concisus*, opredeljena z metodo MLST, je bila velika. Opredelili smo 17/21 izolatov *C. concisus* otrok iz SBG in 24 naključno izbranih izolatov odraslih bolnikov. Med 41 izolati smo dokazali 23 različnih sekvenčnih tipov (ST), ki so že znani, ostali pa pripadajo novim, še neprepoznanim ST. Pri vseh izolatih otrok iz SBG smo dokazali drugačen ST; enak ST smo dokazali pri največ dveh izolatih različnih bolnikov.

Klinične značilnosti okužb s *Campylobacter concisus* pri bolnišnično obravnavanih otrocih

Med 21 pediatričnimi bolniki, ki so se v času od 01. 01. 2015 do 30. 06. 2015 zdravili zaradi akutne ali dolgotrajne driske na Oddelku za otroške bolezni SBG in so imeli dokazano enterično okužbo s *C. concisus* je bilo 12 dečkov in 9 deklic v starosti od 3 mesecev do 18 let. Med njimi je bilo 9 hospitaliziranih in 12 ambulantno obravnavanih. Največ otrok, pri katerih je bil osamljen *C. concisus*, je bilo v starostnih skupinah < 1 leto (6), 1–4 leta (7) in v starostni skupini 5–10 let (7). Le en oboleli otrok je bil starejši od 10 let. Vzorce blata smo v laboratoriju ocenili po bristolski klasifikaciji. Med 21 *C. concisus* pozitivnimi vzorci je bilo 14 vzorcev z mehko konsistenco blata. Med njimi sta imela dva bolnika koinfekcijo, eden s *C. ureolyticus* in eden s *C. jejuni*. Dvoje vzorcev je bilo kašastih, le eden pa tekoč. Otrok, ki je odvajal tekoče blato, je bil sočasno okužen še s *Salmonella* Thomson. Štirje bolniki so ob sprejemu v laboratorij izločali normalno blato.

Pogostost simptomatike pri naših bolnikih prikazuje tabela 3.

Tabela 3. Klinični simptomi pri 21 otrocih, ki so imeli gastroenteritis povzročen s *C. concisus*.

Simptomi	Pogostost (%)
abdominalne bolečine	40,5
vročina	31,5
driska	31,5
meteorizem	31,5
kri in sluz na blatu	22,5
slabost in bruhanje	18
spremenjena konsistenca blata	13,6
inapetenca	1
enkopreza	1

Hospitalizirani otroci so imeli akutni gastroenteritis, ki je trajal < 1 teden, potek je bil buren z vročino in drisko. Pri ambulantno obravnavanih bolnikih pa so težave vztrajale dlje časa (14 dni do več mesecev), potek pa je bil blag.

Pri bolnikih, ki so zaradi okužbe s kampilobaktrom potrebovali bolnišnično obravnavo, so bili pokazatelji vnetja praviloma povišani: povprečna vrednost SR 40 mm/h (z razponom od 16–77), povprečna vrednost CRP 55 mg/L (z razponom od 11–115) in povprečna vrednost levkocitov 11,0 x 10^9 L (z razponom od 5,0–20,6). Pri ambulantno obravnavanih bolnikih so bili vnetni parametri v okvirih normalnih vrednosti. Kalprotektin v blatu kot pokazatelj vnetnega dogajanja v črevesju je bil določen le pri 7 bolnikih. Pri bolniku, ki je bil sočasno okužen z dvema vrstama kampilobaktrov, je bil zelo povišan (3090 mcg/g; dopustna meja je 100 mcg/g), pri 3 bolnikih blago, pri ostalih pa je bil negativen. Večina ambulantno obravnavanih otrok je imela opravljen tudi UZ trebuha. Pri nobenem otroku ni bilo videti intenzivnih znakov črevesnega draženja, le pri posameznikih je bilo zaznati mezenterijski limfadenitis in meteorizem.

Pri vseh 21 pediatričnih bolnikih je bil *C. concisus* prepoznan kot pomemben povzročitelj akutnega gastroenteritisa ali kot povzročitelj blagega dolgotrajnega bakterijskega enteritisa.

ZAKLJUČEK

Z uporabo metode membranske filtracije iztrebkov po protokolu Cape Town z modifikacijo za osamitev netermofilnih kampilobaktrov smo uspeli dokazati visoko incidenco (52,6 %) in prevalenco (11,2 %) *C. concisus* v Goriški zdravstveni regiji. Incidenca *C. concisus* med vsemi osamljenimi kampilobaktri je v prvi polovici leta 2015 presegla incidenco *C. jejuni* za več kot dvakrat. V tem obdobju je bil *C. concisus* najbolj prevalentna vrsta kampilobaktra in vsaj dvakrat pogosteje osamljena iz diare-

ičnih vzorcev bolnikov kot *C. jejuni*. Najpogosteje so obolevali otroci do 10 let starosti in osebe, starejše od 60 let, pri katerih je *C. concisus* povzročal akutni gastroenteritis ali prolongirano drisko. Ugotovili smo tudi, da izolati pripadajo različnim sekvenčnim tipom, kar nakazuje na veliko genetsko raznolikost izolatov *C. concisus*.

V slovenskem prostoru obstaja vrzel tako na kliničnem kot mikrobiološkem in epidemiološkem področju glede pomena porajajočih se kampilobaktrov, kot je *C. concisus*. Ostaja še veliko odprtih vprašanj, ki so povezana z genetsko raznolikostjo te bakterije in njeno patogenostjo.

Metoda membranske filtracije po protokolu Cape Town z modifikacijo je dala zanimive in vzpodbudne rezultate, ki spreminjajo epidemiološko sliko kampilobakterioz tudi pri nas. Z izsledki tega prispevka želimo vzpodbuditi strokovno javnost, da bi metoda, kljub začetni zahtevnosti, našla pot tudi v druge klinične mikrobiološke laboratorije in pripomogla k etiološki razjasnitvi bakterijskih drisk ter bolj realni oceni pravega deleža kampilobakterioz med črevesnimi nalezljivimi boleznimi v Sloveniji.

LITERATURA

1. Kraigher A., Sočan M, Klaus I, et al. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji. Nacionalni inštitut za javno zdravje [internet]. 2014 [citirano 2015 Sep 16]. Dosegljivo na: http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/publikacije-datoteke/epidemilosko_spremljanje_nalezljivih_bolezni_2013.pdf
2. Kaakoush NO, Castano-Rodriguez N, Mitchell HM, et al. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. Clin Microbiol Rev. 2015; 28 (3): 687–720.
3. Tanner ACR, Badger S, Ali CH, et al. Wolinella gen. nov., Wolinella succinogenes (Vibrio succinogenes Wolin et al.) comb. nov., and description of Bacteroides gracilis sp. nov., Wolinella recta sp. nov., Campylobacter concisus sp. nov., and Eikenella corrodens from humans with periodontal disease. Int J Syst Evol Microbiol. 1981; 31: 432–45.
4. Kaakoush NO, Mitchell HM. *Campylobacter concisus* - A new player in intestinal disease. Front Cell Infect Microbiol. 2012; 2 (4): 1–15.
5. Hoyul L, Ma R, Grimm MC, et al. Examination of the anaerobic growth of *Campylobacter concisus* strains. Int J Microbiol. 2014: 1–7.
6. Casanova C, Schweiger A, von Steiger N, et al. *Campylobacter concisus* pseudo-outbreak caused by improved culture conditions. J Clin Microbiol. 2015; 53 (2): 660–2.
7. Nielsen HL, Ejlertsen T, Engberg J, et al. High incidence of Campylobacter concisus in gastroenteritis in North Jutland, Denmark: a population-basedstudy. Clin Microbiol Infect. 2013; 19 (5): 445–50.
8. Nielsen HL, Engberg J,Ejlertsen T, et al. Clinical manifestations of *Campylobacter concisus* infection in children. Ped Infect Dis J [internet]. 2013 [citirano 2014 Feb 27]; 32 (11): 1194–8. Dosegljivo na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23743545
9. Nielsen HL, Engberg J, Ejlertsen T, et al. Psychometric scores and persistence of irritable bowel after Campylobacter concisus infection. Scand J Gastroenterol [internet]. 2014 [citirano 2015 Sep 16]; 49 (5): 545–51. Dosegljivo na:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24646319
10. Ferreira S, Julio C, Queiroz JA, et al. Molecular diagnosis of *Arcobacter* and *Campylobacter* in diarrhoeal samples among Portuguese patients. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014; 78 (3): 220–5.
11. Ismail Y, Mahendran V, OctaviaS, et al. Investigation of the enteric pathogenic potential of oral Campylobacter concisus strains isolated frompatients with inflammatory bowel disease. PLoS One. 2012; 7 (5): 1–11.
12. Kaakoush NO, Mitchell HM, Man SM. Role of emerging *Campylobacter species* in inflammatory bowel diseases. Inflamm Bowel Dis [internet]. 2014 [citirano 2015 Sep 21]; 20. Dosegljivo na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=12.%09Kaakoush+NO%2C+Mitchell+HM%2C+Man+SM+Role+of+emerging+Campylobacter+species+in+inflammatory+bowel+diseases+Inflamm+Bowel+Dis+2014%3B
13. Kaakoush NO, Deshpande NP, Wilkins MR, et al. The pathogenic potential of *Campylobacter concisus* strains associated with chronic intestinal diseases. PLoS One. 2011; 6 (12): 1–16.

14. Platts-Mills JA, Liu J, Gratz J, et al. Detection of Campylobacter in stool and determination of significance by culture, enzyme immunoassay, and PCR in developing countries. J Clin Microbiol. 2014; 52 (4): 1074–80.
15. Platts-Mills JA, Kosek M. Update on the burden of Campylobacter in developing countries. Curr Opin Infect Dis. 2014; 27 (5): 444–50.
16. Platts-Mills JA, Liu J, Houpt ER. New concepts in diagnostics for infectious diarrhea. Mucosal Immunol. 2013; 6 (5): 876–85.
17. Lastovica AJ. Emerging *Campylobacter* spp.: the tip of the iceberg. Clinical Microbiol Newsletter. 2006; 28 (7): 49–56.
18. Nielsen HL, Engberg J, Ejlertsen T, et al. Comparison of polycarbonate and cellulose acetate membrane filters for isolation of *Campylobacter concisus* from stool samples. Diag Microbiol Infect Dis. 2013, 76 (4): 549–50.
19. Karmali MA, Simor AE, Roscoe M, et al. Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of Campylobacter organisms from feces. J Clin Microbiol. 1986; 23 (3): 456–9.
20. Istivan T, Ward P, Coloe P. *Campylobacter concisus*: an emerging pathogen of the gastrointestinal tract. In: Mendez-Vilas A, ed. Current Research, Technology and Education. Topics in Applied Microbilogy and Microbial Biotechnology. Barcelona: Formatex; 2010; p. 626–34. Dosegljivo na: http://www.formatex.info/microbiology2/isbn2-contents.pdf
21. Lastovica AJ, Allos BM. Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. In: Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ, eds. *Campylobacter* 3rd *ed.* Washington: ASM Press; 2008. p. 123–49.
22. Nakari UM, Puhakka A, Siitonen A. Correct identification and discrimination between Campylobacter jejuni and C. coli by a standardized hippurate test and species-specific polymerase chain reaction. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008; 27 (7): 513–8.
23. Lopez L, Castillo FJ, Clavel A, et al. Use of a selective medium and a membrane filter method for isolation of Campylobacter species from Spanish paediatric patients. Eur J Clin Microb Infect Dis. 1998; 17 (7): 489–92.
24. Miller WG, Chapman MH, Yee E, et al. Multilocus sequence typing methods for the emerging *Campylobacter* species *C. hyointestinalis*, *C. lanienae*, *C. sputorum*, *C. concisus*, and *C. curvus*. Front Cell Infect Microbiol. 2012; 45 (2): doi: 10.3389.

Jasna Dragičević[1*], Tadeja Kotar[2], Janez Tomažič[3], Barbara Šoba[4], Ana Kovač[5], Nina Starašinič[6], Miha Skvarč[7]

Cista v jetrih zaradi okužbe s trakuljo rodu *Echinococcus* spp.

Cystic Lesion in the Liver Caused by Echinococcus *spp.*

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: ehinokokoza, diagnostika, zdravljenje

Ehinokokoza je zoonoza, ki jo povzroča pasja trakulja. Bolezen je prisotna povsod po svetu. Slovenija ne sodi med države z visoko pojavnostjo cistične ehinokokoze. Bolezen je razširjena predvsem v vzhodnih delih države. Poznamo več oblik bolezni. *Echinococcus granulosus* povzroča cistično ehinokokozo, s katero se srečujemo najpogosteje. *E. mulitilocularis* povzroča alveolarno ehinokokozo, ki oponaša maligno rast, *E. vogeli* pa povzroča policistično ehinokokozo. Okužba dolgo poteka prikrito. Kaže se s cistami v različnih organih, najpogosteje v jetrih (v približno 70 %) in pljučih (v približno 15 %), ledvicah, vranici, možganih, srcu, vretencih in mišicah (v 10–20 %). V diagnostiki se zanašamo predvsem na ultrazvočno preiskavo trebuha, serološke preiskave na ehinokokna protitelesa pa tudi mikrobiološki pregled vsebin cist. V prispevku smo prikazali primer bolnika, pri katerem so bile serološke preiskave negativne, v nativnem mikroskopskem preparatu vsebine jetrne ciste pa smo uspešno potrdili parazita. Prikazali smo tudi 48 bolnikov, ki so bili zdravljeni v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana med letoma 2006 in 2015. Med temi je bilo prvič diagnosticirano 36 bolnikov, ostalih 12 bolnikov pa se je že v preteklosti zdravilo zaradi cistične ehinokokoze. Pri 10 (27,7 %) bolnikih od prvič diagnosticiranih 36 bolnikov so bile serološke potrditvene preiskave negativne. V takšnih primerih je treba, če je le možno, na mikrobiološko analizo poslati vsebino cist, s katero v nativnem mikroskopskem preparatu zanesljivo dokažemo povzročitelja. Z verižno reakcijo s polimerazo vsebine ciste lahko zanesljivo dokažemo povzročitelja. Pri zdravljenju cistične ehinokokoze se kot samostojno ali kot podporno zdravljenje uporablja albendazol.

[1*] Jasna Dragičević, dr. med, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; jasnax6gmail@gmail.com

[2] Tadeja Kotar, dr. med, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana; tadejakotar@hotmail.com

[3] Prof. dr. Janez Tomažič, dr. med, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana; janez.tomazic@kclj.si

[4] Asist. dr. Barbara Šoba, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; barbara.soba@mf.uni-lj.si

[5] Ana Kovač, dr. med, Splošna bolnišnica Novo mesto, Šmihelska cesta 1, 8000 Novo mesto; ancikovac@yahoo.com

[6] Nina Starašinič, dr. med, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana; nina_starasinic@hotmail.com

[7] Asist. dr. Miha Skvarč, dr.med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; miha.skvarc@mf.uni-lj.si

ABSTRACT

KEY WORDS: echinococcosis, diagnostic, treatment

Echinococcosis is a zoonosis caused by tapeworms of the genus *Echinococcus*. The disease is present worldwide. In Slovenia, the incidence of the disease is very low; the disease is present in the eastern part of the country. *Echinococcus granulosus* causes cystic hydatidosis (or cystic echinococcosis) which is the most frequent disease. *E. mulitilocularis* causes alveolar form and *E. vogeli* polycistic form. The infection can be asymptomatic for a long period of time. The liver and the lungs are most commonly affected organs. The golden standard in diagnostics is abdominal ultrasound together with serological tests and microbiologycal examination of the cyst content. In this article, we present a clinical case of one patient whose serological confirmation tests were negative. We also examine the content of the cyst from the liver of this patient and successfully identified *Echinococcus* spp. In addition, we present 48 patients who were treated at the University Medical Centre Ljubljana between 2006 and 2015. Out of these 48 patients, 36 were diagnosed for the first time. Other 12 patients have already had medical treatment because of cystic echinococcosis in the past. Ten (27.7%) of these 36 patients had negative serological confirmation tests. In such cases, if it is possible, the content of the cysts from the affected organs should be sent to microbiological analysis. By performing polymerase chain reaction of the cyst content we can also successfully identify the parasite. Albendazol is an effective drug that can be used as a sole treatment or as an adjuvant therapy.

UVOD

Ehinokokoza, imenovana tudi hidatidoza, je bolezen, povzročena z larvalno ali odraslo obliko pasje trakulje *Echinococcus* spp. Bolezen je prisotna povsod po svetu. Poznamo več oblik bolezni. *Echinococcus granulosus* povzroča cistično ehinokokozo, s katero se srečujemo najpogosteje. *E. mulitilocularis* povzroča alveolarno ehinokokozo, *E. vogeli* pa policistično ehinokokozo. *E. oligarthrus* v redkih primerih povzroča ehinokokozo pri človeku. *E. granulosus* najdemo povsod po svetu, vendar pogosteje na podeželju, kjer psi zaužijejo organe okuženih živali. *E. mulitilocularis* se pogosteje pojavlja v severni polobli, vključno z osrednjo in severno Evropo, Azijo in Severno Ameriko *(1)*.

Odrasla trakulja *E. granulosus* je velika 3–6 mm. Telo je razdeljeno na tri segmente, in sicer glavo, kratek vrat ter telo. Na glavi se nahaja skoleks s štirimi prisesk, s katerim se parazit pritrjuje na steno črevesa. Na skoleksu je izrastek s 30 do 40 kaveljčki, ki so urejeni v dve vrsti. Telo odrasle trakulje je razdeljeno v proglotide, s katerimi se parazit razmnožuje in, ker je hermafrodit, ne potrebuje spolnega partnerja *(2)*. Življenjski krog *E. granulosus* vključuje dva gostitelja: vmesnega (ovca, koza, prašič, konj, kamela, divje živali in tudi človek) in končnega (domači psi in drugi predstavniki iz družine psov). Odrasel parazit naseljuje tanko črevo končnega gostitelja psa. Gravidne proglotide v črevesju izležejo jajčeca, ki se izločajo z blatom. Ko jih zaužije vmesni gostitelj, se iz njih v črevesu izležejo nezrele ličinke (onkosfere). Onkosfere predrejo skozi črevesno steno in preidejo v cirkulacijo ter različne organe, posebej v jetra in pljuča. V organih vmesnega gostitelja onkosfere se razvijejo v ciste (metacestode), ki se postopoma povečujejo in proizvaja-

jo protoskolekse in ciste hčerke *(1)*. Končni gostitelj se okuži, če zaužije drobovino okuženih vmesnih gostiteljev. Po zaužitju se v psu protoskoleksi pritrdijo na črevesno steno in se v 32–80 dneh razvijejo v odraslega parazita. Človek se s pasjo trakuljo okuži z zaužitjem jajčec. Pes lahko s svojimi iztrebki onesnaži živila ali vodo. Nevarna je presna solata. Jajčeca pridejo psu večkrat tudi na dlako. Človek se okuži, ko psa poboža ali ko mu pes poliže roko *(3)*. Iz jajčec se v črevesju izležejo onkosfere, iz katerih potem nastanejo ciste v različnih organih, vendar najpogosteje v jetrih in pljučih. Prenos s človeka na človeka ni možen, saj ehinokok za zaključitev življenjskega kroga potrebuje še vmesnega gostitelja *(4)*. Pri *E. multilocularis* so končni gostitelji lisice, mačke, kojoti, volkovi in redkeje psi. Vmesni gostitelji so mali glodavci. Odrasla trakulja meri 1,2 –3,7 mm *(1)*.

EHINOKOKOZA V SLOVENIJI

Slovenija ne sodi med države z visoko incidenco cistične ehinokokoze (CE). V obdobju 1956–68 je bila prevalenca CE 4,8/100.000 prebivalcev, v obdobju 2002–2006 pa se je znižala na 1.7/100.000 prebivalcev*(5)*. Tak padec prevalence je verjetno zaradi manj pogostega ali bolj nadzorovanega klanja živali na kmetijah, izboljšanih splošnih in sanitarnih razmer pri rejenju živali na kmetijah, še posebej prašičev, boljša skrb za pitno vodo ter nadzor in antihelmintsko zdravljenje psov. Bolezen je razširjena predvsem v vzhodnih delih države. Prašičereja je najpogostejša v teh delih Slovenije in ravno prašiča je Brglez v 70-ih letih opisal kot epidemiološko najpomembnejšega vmesnega gostitelja CE *(6)*.

DIAGNOSTIKA

Večino ehinokoknih cist v jetrih najdemo naključno ob pregledu z UZ zaradi drugih težav. Zlati standard v diagnostiki predstavlja UZ preiskava trebuha, s katero ugotovimo prisotnost cist v notranjih organih, njihovo število, velikost in vitalnost. Spremembe na UZ so patognomonične (npr. jasno vidna laminarna plast s snežinkam podobnimi vključki v cisti – t. i. hidatidni pesek) *(5)*. Za opredelitev stadija se danes uporablja razvrstitev Svetovne zdravstvene organizacije, ki ciste razvršča glede na fazo razvoja: v aktivne CE1 in CE2, prehodne ciste CE3 ter degenerirane ciste CE4 in CE5 (tabela 1) *(4)*. Prednosti UZ preiskave so neinvazivnost, lahka dostopnost ter cenovna ugodnost. S CT preiskavo lahko vidimo majhne ciste z velikostjo ≥ 1 cm premera, preiskujemo katerikoli organ in diferencialno diagnostično ločimo lezije, povzročene z metacestodami *Echinococcus*-a, od drugih neparazitnih lezij *(4)*. Ehinokok povzroča nespecifične spremembe v laboratorijskih izvidih (hiperbilirubinemija ali/in zvišane transaminaze ali/in gama-glutamil-transferaza (γ-GT). Pri bolnikih, pri katerih pride do rupture cist v biliarni sistem, poleg zvišanja γ-GT ugotavljamo tudi zvišanje alkalne fosfataze, amilaze ter eozinofilcev *(4)*.

Najbolj pomembno vlogo v diagnostiki imajo serološke metode, s katerimi dokazujemo protitelesa proti ehinokoknim antigenom. Na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani kot presejalni test uporabljamo indirektno hemaglutinacijo (IHA) kot potrditveni test pa test Western blot (WB).

Občutljivost IHA testa pri CE je 82 %, pri alveolarni ehinokokozi (AE) pa 68 %. Občutljivost testa WB pri CE je 98 %, pri AE pa 97 %. Navzkrižne reakcije in s tem povezani lažno pozitivni rezultati so možni v primeru, ko ima bolnik cisticerkozo, fasciolozo ali avtoimunsko bolezen. Lažno pozitivni rezultati so možni tudi pri rakavih bolnikih. Ehinokok ima izjemno sposobnost »skrivanja« pred imunskim sistemom, zaradi česar so serološke prei-

skave lahko lažno negativne. Raziskave so pokazale, da so ravni serumskih protiteles pri 10 % bolnikov z jetrnimi cistami in pri kar 40 % bolnikov s pljučnimi cistami pod ravnjo zaznave *(4, 7)*. Pri bolnikih s cistami v pljučih, možganih ali vranici serumska protitelesa niso zaznavna za razliko od bolnikov s cistami v kosteh, kjer je imunski odziv močen.

Ruptura ehinokoknih cist povzroči močen imunski odziv. Bolniki s kalcificiranimi in odmrlimi cistami so po navadi seronegativni *(1)*.

S testom WB testom ne moremo ali zelo težko ločimo okužbo z *E. granulosus* od *E. multilocularis*. To nam omogoča reakcija s pomočjo verižne polimeraze (angl. *polymerase chain reaction*, PCR). PCR je v veliko pomoč v nejasnih primerih, ko ni jasno, katera vrsta je povzročila obolenje, ko je serologija nejasna, ali ko želimo razjasniti morebitne lažno pozitivne rezultate pridobljene s pomočjo serologije. Edini primeren vzorec je vsebina ciste, kjer v primeru CE iščemo kaveljčke, protoskolekse in tudi DNA parazita.

ZDRAVLJENJE

V preteklosti je bil edini način zdravljenja CE operativni poseg. Cilj operativnega posega je popolna odstranitev hidatidnih cist *(7)*. Operacija je priporočljiva pri zapletenih jetrnih cistah, ob razpoku ciste ali, kadar obstaja komunikacija z žolčnim sistemom, ko so prisotne hčerinske ciste ali ko ciste pritiskajo druge organe. Operacija je metoda izbora v primeru sočasno prisotne bakterijske okužbe ali če so ciste v možganih, pljučih ali ledvicah *(1)*. Pri cistah v jetrih, ki so večje od 7,5 cm, po navadi obstaja komunikacija z žolčnim sistemom in v takšnih primerih je operacija metoda izbire. Danes so kemoterapija, punkcija cist in PAIR (perkutana aspi-

Tabela 1. Razvrstitev lezij cistične ehinokokoze po Svetovni zdravstveni organizaciji 2001 *(4, 7)*. CL – cistična sprememba (angl. *cystic lesion*), CE – cistična ehinokokoza, ABZ – albendazol, PAIR – punkcija, aspiracija, injekcija, reaspiracija.

Stadij	Ultrazvočni videz in opombe	Zdravljenje
CL	unilokularna, cistična lezija (CL) brez hiperehogenega obroča (stena ciste), okrogla ali ovalna, izvid ni patognomoničen ne tvori hčerinskih cist diferencialna diagnoza zahteva nadaljnjo diagnostiko	
CE 1	aktivna, vsebuje protoskolekse, unilokularna enostavna cista, vidna hiperehogena stena kapsule s snežinkam podobnimi vključki v cisti-hidatidni pesek, okrogle ali ovalne, praviloma tvori hčerinske ciste, patognomoničen videz	< 5 cm ABZ > 5 cm PAIR + ABZ
CE 2	aktivna, vsebuje protoskolekse, multivezikularna, multiseptirana okrogla ali ovalna cista, hčerinske ciste dajo satast videz, hiperehogena stena ciste vidna	PAIR + ABZ
CE 3	prehodna, nepravilno oblikovana unilokularna cista, tranzicijski stadij (deloma degenerirana, lahko še tvori hčerinske ciste), patognomoničen videz	
CE 3a	plavajoča membrana (odstop laminarne plasti)	> 5 cm PAIR + ABZ < 5 cm ABZ
CE 3b	pretežno solidna s hčerinskimi cistami	PAIR + ABZ
CE 4	Neaktivna, brez hčerinskih cist, »klobčiči volne« – znak degeneracije membran, večina cist ne vsebuje protoskoleksov, izvid ni patognomoničen, diferencialno diagnostično lahko tumor ali granulom	
CE 5	Neaktivna, kalcinirane ciste, večina cist ne vsebuje protoskoleksov, diagnoza ni zanesljiva, CE je zelo verjetna (*E. granulosus*), vendar izvid ni patognomoničen	

racija, injekcija kemikalij in reaspiracija) nadomestili potrebo po operativnem posegu. Cilj PAIR je uničenje zarodne plasti in odstranitev protoskoleksov. Z UZ vodeno punkcijo se cista punktira, iz nje se odstrani del hidatidne tekočine, nato pa se vanjo vbrizga visoko koncentrirana raztopina etanola ali močno hipertonične raztopine natrijevega klorida, nato se cista ponovno aspirira. Kemoterapija z benzimidazoli je indicirana za nezapletene ciste premera manj kot 5 cm, pri inoperabilnih cistah ali kadar se ciste pojavijo v več organih. Protiparazitna zdravila se uporabljajo tudi kot zaščita pri invazivnih diagnostičnih in terapevtskih posegih na hidatidnih cistah *(7)*. Zdravilo izbora je albendazol. Dajemo ga v odmerku 10–15mg/kg dnevno, deljeno v 2 odmerka. Zdravljenje traja 3–6 mesecev.

PRIKAZ PRIMERA

Petintridesetletnemu bolniku, ki je bil po poklicu gradbeni delavec, je bila med hospitalizacijo na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja naključno najdena ehinokokna cista. Odraščal je v Bosni, v otroštvu je imel stik z mačkami in psi.

Sredi junija leta 2014 je zbolel s cefaličnim tetanusom. Zdravljen je bil na Nevrološki kliniki Univerzitetnega kliničnega centra (UKC) Ljubljana, nato je bil zaradi poslabšanja kliničnega stanja z razvojem respiratorne odpovedi premeščen v Respiracijski center Klinike za Infekcijske bolezni in vročinska stanja UKC Ljubljana. V sklopu zdravljenja tetanusa je bil opravljen UZ abdomna, kjer je bila vidna multicistična formacija v levem jetrnem režnju velikosti 5,3 × 6,2 × 6,6 cm, sumljiva za ehinokokno cisto. Opravljene so bile serološke preiskave na ehinokokni antigen. Test IHA je bil pozitiven v titru 1:32, test WB pa negativen. Med hospitalizacijo je bil 21. 7. 2014 opravljen tudi CT toraksa, na katerem je bila v levem jetrnem režnju vidna multilokularna cistična formacija prečno velikosti 7 × 5,5 cm, kraniokavdalno velikosti cca 5–6 cm. Štiriinpetdeseti dan hospitalizacije zaradi tetanusa je bil bolnik v izboljšanem stanju odpuščen v domačo oskrbo. Redno je hodil na kontrole, kjer so ugotavljali izboljšanje kliničnega stanja. Dne 14. 10. 2014 so bile ponovno opravljene serološke preiskave. Rezultati so bili naslednji: preiskava *Echinococcus* spp. (metoda IHA) 1:32, potrditveni test WB neopredeljiv. 7. 2. 2015 so ponovno poslali serum za ugotavljanje protiteles v krvi. Presejalni test IHA in potrditveni test WB sta bila tokrat oba negativna. Ehinokokna cista v jetra je bila UZ sledena, na zadnji kontroli 14. 4. 2015 je bila sprememba enake velikosti kot na CT preiskavi 21. 7. 2014. Dne 17. 6. 2015 je bil bolnik na kontrolnem pregledu, kjer so se odločili za zdravljenje s albendazolom v odmerku 400 mg na 12 ur. Dne 8. 7. 2015 je bil bolnik sprejet na Kliniko za Infekcijske bolezni in vročinska stanja UKC Ljubljana zaradi izpraznitvene punkcije in sklerozacije ehinokokne ciste v jetrih. Interventni radiologi so opravili perkutano drenažo s sklerozacijo. Vstavljen je bil dren. Iz drenažne tekočine jetrne ciste v nativnem mikroskopskem preparatu je bil mikrobiološko potrjen *Echinococcus* spp., vidni so bili kaveljčki. Bolnik je bil odpuščen domov v klinično izboljšanem stanju z navodili, da nadaljuje zdravljenje z albendazolom dvakrat na dan do zaključka treh mesecev. Na kontrolnem pregledu 20. 7. 2015 je bolnik navajal krče v epigastriju ter siljenje na bruhanje. V laboratorijskih preiskavah so bili ugotovljeni zvišani vnetni parametri (CRP 98 mg/l, levkociti 24,3 x 10^9/L) ter izrazita eozinofilija. Bolnik je bil naročen na kontrolni pregled, vendar se na pregled ni oglasil.

ZAKLJUČEK

Serološke preiskave v diagnostiki CE niso popolnoma zanesljive in v primeru negativne ali nejasne serologije si mora-

mo pomagati z drugimi diagnostičnimi metodami. Če je le možno, je priporočljivo pošiljanje vsebine ciste na mikrobiološko preiskavo, s katero zanesljivo v primeru okužbe v nativnem mikroskopskem preparatu dokažemo kaveljčke in protoskolekse, značilne za parazita. Uporabimo lahko tudi metodo PCR. Edina primerna kužnina za PCR je vsebina ciste. S PCR bi lahko ločili tudi okužbo z *E. multilocularis* od okužbe z *E. granulosus*.

Ko smo po tej izkušnji pregledali vse pozitivne primere ehinokokoze, ki so bili obravnavani na Infekcijski Kliniki UKC Ljubljana, smo ugotovili, da se pogosto odločijo za zdravljenje bolnika, ki ima samo klinično dokazano ehinokokozo, kljub negativni serološki diagnozi. V obdobju 2006–2015 se je zaradi CE zdravilo 48 bolnikov. Od tega je bilo prvič diagnosticiranih 36 bolnikov, ostalih 12 bolnikov se je že v preteklosti zdravilo zaradi CE (tabela 2). Večina bolnikov je bila iz Slovenije, 10 bolnikov iz bivših jugoslovanskih republik. Devet bolnikov je navajalo stik s psi. Za ostale so bili po-

Tabela 2. 48 bolnikov, ki so bili obravnavani v UKC Ljubljana v letih 2006–2015 zaradi ehinokokoze. PAIR – punkcija, aspiracija, injekcija, reaspiracija.

Starost ob 1. pregledu	50,8
Spol	
Ženski	26 (54,2 %)
Moški	22 (45,8 %)
Kraj okužbe	
Neznano (domnevno Slovenija)	35 (72,9 %)
Države nekdanje Jugoslavije	10 (20,8 %)
Drugo	3 (7,3 %)
Mesto lezij (lokacija cist)	
Jetra	41 (85 %)
Drugo	7 (15 %), vretenca 1, pljuča 4, možgani 1, vranica 1
Število lezij pri bolniku	
Solitarne	22 (45,8 %)
Več lezij	26 (54,2 %)
Opravljena serološka diagnostika	
Da	44 (91,6 %)
Ne	4 (8,4 %)
Rezultat serologije	
Pozitivno	37
Negativno	7
Western blot negativen	10 (27,7 %)
Terapija	
Albendazol	39
PAIR	6
Operacija	24
Po operaciji material za diagnostiko	15 (od tega 12 potrjenih ehinokokoz)

datki nezanesljivi. Za 7 bolnikov ni zanesljivih podatkov o seroloških preiskavah in zdravljenju. Diagnostika je temeljila predvsem na slikovnih (UZ, CT, RTG) ter seroloških preiskavah. Bolniki so bili večinoma zdravljeni z albendazolom. Pri 10 (27,7 %) bolnikih od prvič diagnosticiranih 36 so bile serološke potrditvene preiskave negativne. Problem je tudi, da le redko dobimo vsebino ciste v mikrobiološki pregled. V primeru lažno pozitivnih seroloških rezultatov in vprašljive mikroskopije nativnega preparata lahko samo s PCR zavrnemo ali potrdimo okužbo z *Echinococcus* spp. Obravnavo bi izboljšalo tudi upoštevanje kriterijev Svetovne zdravstvene organizacije in vzpostavitev registra ehinokokoz, s katerim bi poenotili in izboljšali oskrbo bolnikov z domnevno ehinokokozo.

LITERATURA

1. CDC: Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern [internet]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; c2015 [citirano 2015 Oct 6]. Dosegljivo na: http://www.cdc.gov/dpdx/echinococcosis/index.html
2. Thompson RCA, McManus DP. Aetiology: parasites and life-cycles. In: Eckert J,Gemmell MA, Meslin FX, eds. WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern [internet]. Pariz: World Organisation for Animal Health; 2002 [citirano 2013 Nov 21]. Dosegljivo na: http://whqlibdoc.who.int/publications/2001/929044522X.pdf
3. Logar J. Parazitologija človeka. Radovljica: Didakta; 2010. p. 122–7.
4. Pawlowski ZS, Eckert J, Vuitton DA, et al. Echinococcosis in humans: clinical aspects, diagnosis and treatment. In: Eckert J., Gemmell MA, Meslin FX, eds. WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern [internet] Pariz: World Organisation for Animal Health; 2002 [citirano 2013 Nov 21]. p. 20–71. Dosegljivo na: http://whqlibdoc.who.int/publications/2001/929044522X.pdf
5. Logar J, Soba B, Kotar T. Serological evidence for human echinococcosis in Slovenia. BMC Infect Dis. 2008; 8: 63.
6. Brglez J. Echinococcosis in Slovenia. Zdrav Vestn. 39: 265–7.
7. Jamšek Č, Logar M. Ehinokokoza – tleča nevarnost? Med Razgl. 2014; 53 (1): 87–94.

Matej Kokalj[1*], Barbara Šoba[2], Eva Grilc[3], Jana Svetičič Marinko[4], Miha Skvarč[5]

Povečano število primerov drisk pri otrocih zaradi okužbe s praživaljo rodu *Cryptosporidium* spp.

Increased Number of Diarrhea Cases in Children due to Infection with Protozoan Cryptosporidium *spp.*

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: kriptosporidij, driska, otroci, govedo

Cryptosporidium spp. so znotrajcelični paraziti, ki primarno okužijo epitelijske celice prebavil različnih vrst vretenčarjev. Zaradi visoke odpornosti na klorove spojine, dolgega preživetja v okolju, visoke infektivnosti in odpornosti na zdravljenje predstavljajo potencialen javnozdravstveni problem. V prispevku opisujemo pet primerov driske (štirje otroci in ena odrasla oseba, ki je skrbela za otroke), povzročene s *Cryptosporidium* spp., v razmiku dveh tednov na omejenem geografskem območju osrednje Slovenije.

ABSTRACT

KEY WORDS: cryptosporidium, diarrhea, children, cattle

Cryptosporidium spp. are intracellular parasites that primarily infect epithelial cells of gastrointestinal tract of different vertebrates. With its high resistance to chlorine compounds, long viability in the environment, high infectivity and resistance to treatment they represent a potential public health problem. In this report, we describe five cases of diarrhea (four children and one adult that worked with children) caused by *Cryptosporidium* spp. in the time period of two weeks in a limited geographical area of the central Slovenia.

[1*] Matej Kokalj, dr. med., Splošna bolnišnica Slovenj Gradec, Gosposvetska cesta 1, 2380 Slovenj Gradec; matej.kokalj@sb-sg.si

[2] Asist. dr. Barbara Šoba, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

[3] Eva Grilc, dr. med., Nacionalni inštitut za javno zdravje, Zaloška cesta 29, 1000 Ljubljana

[4] Jana Svetičič Marinko, dr. med., Nacionalni inštitut za javno zdravje, Zaloška cesta 29, 1000 Ljubljana

[5] Asist. dr. Miha Skvarč, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

UVOD

Cryptosporidium spp. je eden izmed najpomembnejših povzročiteljev driske tako pri imunsko kompetentnih kot imunsko oslabljenih posameznikih. Je znotrajcelični parazit, ki primarno okuži epitelijske celice prebavil različnih vrst vretenčarjev. Pri pticah in imunsko močno oslabljenih bolnikih so lahko prizadeta tudi dihala. Prenos okužbe je fekalno-oralen. Ciste so močno odporne tako na okoljske kot na kemijske dejavnike, infektivni odmerek je nizek. Zaradi teh značilnosti lahko *Cryptosporidium* spp. povzroča tudi večje epidemije in predstavlja potencialen javnozdravstveni problem *(1–4)*.

OPIS

Okužba pri človeku se prične z zaužitjem oocist velikosti 5–8 µm, ki pri stiku z želodčnim sokom ekscistirajo in sprostijo štiri sporozoite. Ti sporozoiti okužijo epitelijske celice prebavil, kjer zajedajo v t. i. parazitoforni vakuoli, ki jo tvori celica sama. Znotraj vakuole najprej poteka nespolno razmnoževanje (merogonija), kasneje pa tudi spolno razmnoževanje (gametogonija) s končno tvorbo novih oocist (sporogonija). Približno 20 % oocist ima tanko ovojnico. Za te oociste predvidevajo, da se razpočijo že v črevesju ter povzročijo avtoinfekcijo. Na ta način se ohranja okužba gostitelja. Ostalih 80 % oocist ima debelo ovojnico in se nespremenjene izločijo v okolje, kjer so takoj kužne. V okolju preživijo več mesecev. Odporne so na:

- nizke temperature,
- visoko slanost,
- kloriranje vode in
- večino razkužil.

Pri filtriranju pitne vode so potrebni zelo drobni filtri velikosti 1 µm. So visoko infektivne, za okužbo zadostuje 1–10 oocist *(1, 3, 5, 6)*.

Cryptosporidium spp. je razširjen po celem svetu, oociste so v okolju ubikvitarne. Do okužbe človeka najpogosteje pride s fekalno-oralnim prenosom, saj so oociste prvotno prisotne izključno v iztrebkih človeka in živali. Poleg neposredne je mogoča tudi posredna okužba z vodo ali hrano, ki je kontaminirana z oocistami kriptosporidija. Kriptosporidioza se pojavlja endemično in sporadično. Okužbe so bolj pogoste v toplih in vlažnih mesecih, ko lahko obilica padavin povzroči kontaminacijo pitne vode s površinsko *(7)*. Leta 1993 je tako v ZDA (Milwaukee, Wisconsin) prišlo do velike hidrične epidemije s kriptosporidijem, v kateri je zbolelo 400.000 ljudi *(8)*. V državah v razvoju okužba s kriptosporidijem prizadene predvsem otroke do 2. leta starosti in je eden izmed petih najpogostejših povzročiteljev driske v tej starostni skupini. V razvitih državah so poleg okužb otrok pomembne tudi *(4)*:

- okužbe starostnikov v negovalnih domovih,
- okužbe imunsko oslabljenih bolnikov in
- okužbe bolnikov na hemodializi.

Trenutno je poznanih skoraj 20 različnih vrst in genotipov kriptosporidijev, ki lahko okužijo človeka. *Cryptosporidium parvum* in *Cryptosporidium hominis* sta odgovorna za veliko večino okužb pri ljudeh. *C. hominis* je prevladujoči patogen v državah v razvoju (predvsem pri otrocih in okuženih z virusom HIV), v Severni Ameriki, Avstraliji in na Japonskem, medtem ko je *C. parvum* prevladujoči patogen predvsem na Srednjem Vzhodu. Porazdelitev obeh je v Evropi približno enakovredna. Razlika v porazdelitvi vrst je najverjetneje posledica različnih načinov prenosa in virov okužbe *(1)*. *C. hominis* okuži predvsem človeka in primate, zato ga uvrščamo med antropofilne patogene, medtem ko *C. parvum* okuži predvsem ljudi in prežvekovalce ter spada med zoonotske patogene *(9)*. Novejše tipizacijske študije so s sekvenčno analizo gena *gp60* pokazale, da je veli-

ka večina okužb s *C. parvum* povzročena z dvema podtipoma *(10, 11)*:

- tip IIa, ki je bil izoliran tako pri ljudeh kot pri živalih, in
- tip IIc, ki je bil izoliran samo pri ljudeh.

S tem so pokazali, da okužba s *C. parvum* ni posledica samo zoonotskega prenosa, ampak tudi prenosa samo med ljudmi. Največ goveda se s *Cryptosporidium* spp. okuži v prvih mesecih življenja. V tem obdobju je prevalenca okužbe do 100 %, pri odraslih živalih po 2. letu življenja pa pade na 5 % *(9)*. *C. parvum* po 3. mesecu starosti pri govedu ni več prisoten. Zamenjajo ga ostale, za človeka veliko manj ali celo nepatogene vrste *(12)*.

V Sloveniji se kriptosporidioza pojavlja v vseh starostnih skupinah, dobra polovica primerov je pri otrocih do 14. leta (slika 1). Največ okužb je v ljubljanski regiji (slika 2). Po letu 2001 beležimo okrog 10 primerov letno *(13)*. Z 89 % deležem identifikacij močno prevladuje *C. parvum*, na drugem mestu je *C. hominis* z 8 % *(14)*. Od vseh primerov identificiranih *C. parvum* jih 94 % pripada podtipu IIa, torej se prenašajo tako med ljudmi kot med živalmi. Pri mladih teletih v prvih tednih po skotitvi s skoraj 100 % deležem podtip IIa močno prevladuje *(7, 14, 15)*.

KLINIČNA SLIKA

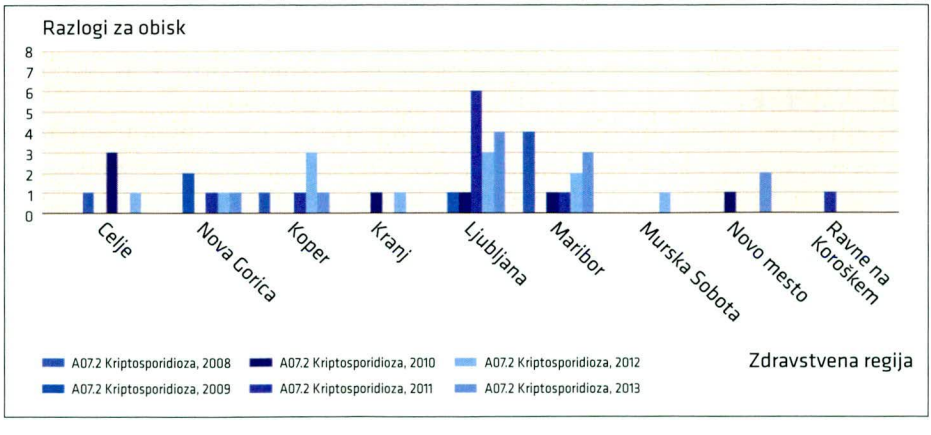
Inkubacijska doba bolezni po zaužitju viabilnih oocist je v povprečju 7 dni (2–10 dni). Pri imunsko kompetentnih posameznikih se okužba največkrat kaže z obilno vodeno ali sluzasto drisko od 5- do 10-krat dnevno. Ostali manj pogosti simptomi in znaki so:

- abdominalne bolečine in krči,
- slabost,
- bruhanje,
- nizka vročina in
- izguba teže.

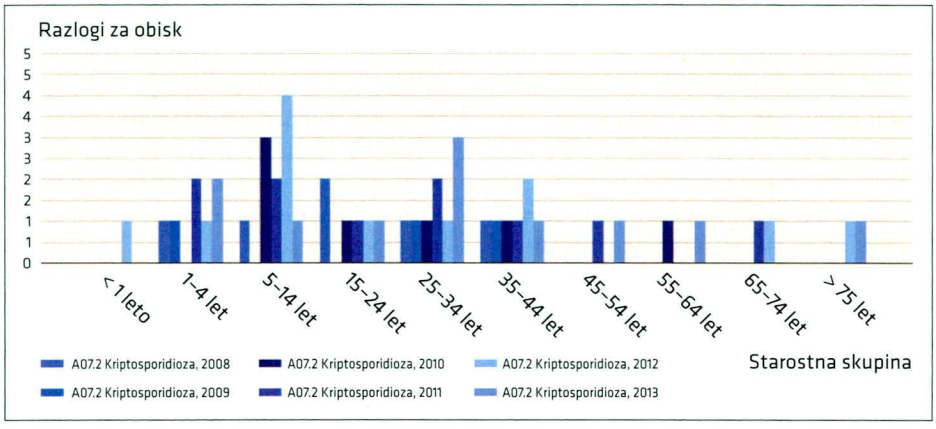
Simptomi in znaki, ki se redkeje pojavljajo in so bolj pogosti pri okužbi s *C. hominis*, so *(5)*:

- bolečina v sklepih,
- bolečina v očesih,
- glavobol,
- omotica in
- utrujenost.

Bolezen običajno traja 9–21 dni, občasno tudi dlje, in preneha sama od sebe *(3)*. Pri imunsko oslabljenih bolnikih se driska ponavlja, traja več mesecev in se lahko konča s smrtjo. Pri omenjenih bolnikih lahko okužba povzroči tudi vnetje dihal, žolčnika, jeter in trebušne slinavke *(16, 17)*.



Slika 1. Porazdelitev prijavljenih primerov okužb s kriptosporidijem po regijah v Sloveniji v letih 2008–2013.



Slika 2. Porazdelitev prijavljenih primerov okužb s kriptosporidijem po starostnih skupinah v Sloveniji v letih 2008–2013.

DIAGNOSTIKA

Mikrobiološka diagnostika temelji na mikroskopskem dokazu oocist v blatu, za kar uporabljamo več metod koncentriranja in barvanja oocist. V primerjavi s klasično mikroskopijo se občutljivost in specifičnost z uporabo direktne imunofluorescence (DIF) močno povečata, zato je trenutno DIF metoda izbora za rutinsko dokazovanje okužb. Možna je tudi detekcija antigena z encimsko imunoadsorpcijsko metodo (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), vendar se zaradi manjše občutljivost v primerjavi z DIF klinično redkeje uporablja. Molekularne metode se uporabljajo predvsem v raziskovalne namene *(1, 18–21)*.

ZDRAVLJENJE

Zdravljenje pri okužbi s kriptosporidijem je v glavnem podporno (rehidracija). Usmerjeno protiparazitno zdravljenje navadno ni potrebno, saj je bolezen pri imunsko kompetentnih bolnikih praviloma samoomejujoča. Pri imunsko oslabljenih bolnikih se bolezensko stanje izboljša z izboljšanjem njihovega imunskega stanja, npr. z zmanjšanjem imunosupresivne terapije ali protiretrovirusnim zdravljenjem *(1)*. Trenutno je ameriška Agencija za hrano in zdravila (angl. *Food and Drug Administration*, FDA) za zdravljenje kriptosporidioze odobrila samo nitazoksanid, a le za imunsko kompetentne bolnike *(22)*. Pri imunsko oslabljenih bolnikih sta bila za zdravljenje uporabljena paromomicin in spiramicin, vendar njuna učinkovitost ni bila dokazana *(17)*.

OPIS PRIMEROV IN RAZPRAVA

V prispevku predstavljamo primere štirih okužb s kriptosporidijem pri otrocih, starih od 7 mesecev do 4 let, v širši okolici Ljubljane (občine Domžale, Kamnik in Ribnica) ter primer okužbe pri 25-letni ženski, ki je zbolela med bivanjem v Afriki. Opisani primeri so bili diagnosticirani v sredini avgusta 2015 z metodo DIF v dvotedenskem časovnem intervalu.

Pri bolnikih je bilo identificiranih več različnih epidemioloških dejavnikov tveganja za okužbo. Vsi bolniki izhajajo iz podeželskega okolja, kjer imajo v svoji neposredni okolici kmetijske živali in kmetijske površine, ki lahko predstavljajo potencialen vir okužbe. Pri najmlajši bolnici so imeli v času njene okužbe na kmetiji starih staršev mlado tele, staro manj kot 3 mesece, ki je imelo gastrointestinalne težave z obilnim odvajanjem.

Tabela 1. Podatki bolnikov s kriptosporidiozo.

Bolnik	1	2	3	4	5
Starost ob okužbi	12 mesecev	18 mesecev	25 let	4 leta	7 mesecev
Datum sprejema vzorca	11. 8. 2015	12. 8. 2015	22. 8. 2015	24. 8. 2015	25. 8. 2015
Identifikacija	*C. parvum*	*C. parvum*	*Cryptosporidium* spp. + *Blastocystis* spp.	*C. parvum*	*C. parvum*
Verjetna lokacija okužbe	ni podatka	Blejsko jezero	Afrika, Etiopija	ni podatka	mlado tele z drisko, domače okolje

Neposreden kontakt z živaljo je bil zanikan, vendar je v tem obdobju za tele skrbel dekličin oče.

Za drugega bolnika, ki za razliko od ostalih prihaja iz dolenjske regije, smo heteroanamnestično izvedeli, da je v času, ki sovpada z inkubacijsko dobo bolezni, med kopanjem v Blejskem jezeru zaužil večje količine jezerske vode. Ostali člani družine jezerske vode niso zaužili in niso imeli zdravstvenih težav. Tretja bolnica, 25-letna ženska, je v okviru prostovoljnega dela preživela mesec dni v Etiopiji, kjer je pomagala pri delu v sirotišnici. Tam je delala z otroci in mladostniki, ki so ostali brez staršev, torej so izhajali iz najrevnejšega in za bolezni najbolj ogroženega sloja prebivalstva. Zbolele so tudi nekatere od ostalih prostovoljk na odpravi, vendar so bili pri njih povzročitelji drisk drugi. Za preostala dva otroka dodatnih dejavnikov tveganja nismo ugotovili. Po nam znanih podatkih so bili vsi oboleli imunsko kompetentni in brez pridruženih bolezni. Vsi bolniki so anamnestično opisovali tipične simptome (npr. slabost, abdominalne bolečine in krči, pogosta driska), najmlajša bolnica je tudi izgubila telesno težo. Napotna diagnoza je bila v vseh primerih akutna ali kronična driska.

V okviru mikrobiološke diagnostike je bil pri vseh bolnikih opravljen tudi pregled na ostale črevesne parazite ter na najpogostejše bakterijske (salmonele, šigele, jersinije in kampilobaktre) in virusne (elektronska mikroskopija na viruse: rotavirusi, adenovirusi 40/41, norovirusi, astrovirusi) povzročitelje drisk. Preiskave na ostale patogene so bile pri vseh otrocih negativne, le pri bolnici, ki je bila v Afriki, smo v blatu našli *Blastocystis* spp. Z metodo verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) v realnem času smo iz kužnin opredelili, ali gre za vrsto *C. parvum* ali gre za kriptosporidij druge vrste. Pri vseh štirih otrocih je bila dokazana vrsta *C. parvum*, pri prostovoljki pa je okužbo povzročil kriptosporidij druge vrste, identifikacija je v teku.

Vsi štirje zgoraj opisani otroci so bili v domačem okolju ali med rekreacijskimi aktivnostmi v potencialnem stiku z izločki goveda. Predvidevamo, da je do okužbe prišlo s stikom z okoljem, ki je bilo fekalno onesnaženo z iztrebki goveda. Kot vir okužbe je na slovenskem podeželju pomembno izpostaviti manjša lokalna vodna zajetja, saj so zaradi načina zajema pitne vode močno izpostavljena potencialnemu fekalnemu onesnaženju. Glede na dobro obstojnost cist kriptosporidija v okolju, njihovo visoko infektivnost, odpornost na klorove spojine, težavno filtriranje, razširjenost živinoreje in močno razširjenost podtipa IIa *C. parvum* v Sloveniji, identifikacija *C. parvum* pri teh otrocih sovpada z dosedanjimi ugotovitvami. Ujemanje opazimo tudi z zgoraj prikazanimi podatki Nacionalnega inštituta za javno zdravje (NIJZ) (slika 1 in 2), ki prikazujejo največje število okužb pri otrocih do 14. leta v ljubljanski regiji. Razlog za prevladujoče

število okužb v tej regiji pripisujemo veliki gostoti prebivalstva ter dejstvu, da se tudi tukaj ljudje na periferiji z vodo oskrbujejo iz manjših zajetij, ki so nemalokrat v bližini kmetijskih površin. Za natančnejšo opredelitev epidemioloških značilnosti bi bila potrebna:

- genetska opredelitev kriptosporidijev s sekvenčno analizo gena *gp60* ali podobnimi tipizacijskimi metodami,
- pregled vpletenega goveda,
- pregled jezerske vode iz Blejskega jezera in
- pregled določenih manjših vodnih zajetij na kriptosporidije.

S trenutnimi informacijami možnosti okužbe iz istega vira ne moremo z gotovostjo ovreči, vendar zaradi odsotnosti novih okužb s kriptosporidijem v sledečih mesecih menimo, da do pomembnejše kontaminacije pitne vode ali hrane ni prišlo.

Pri 25-letni bolnici, ki je zbolela v Afriki, pa za razliko od otrok okuženih v Sloveniji, pričakujemo drugačen mehanizem okužbe. Pri njej ni bil identificiran *C. parvum*, glede na obstoječe epidemiološke podatke in porazdelitev vrst kriptosporidijev po svetu pa predvidevamo, da gre za okužbo povzročeno s *C. hominis*. Pri bolnici je bil identificiran tudi *Blastocystis* spp. – parazit, ki živi v črevesju ljudi ter živali in je potencialen povzročitelj drisk *(23)*. Vsi ti podatki kažejo, da je bila bolnica izpostavljena fekalni kontaminaciji, najverjetneje človeškega izvora, kar je glede na higienske razmere in naravo dela, ki ga je opravljala v Etiopiji, močno verjetno.

ZAKLJUČEK

Pri naših primerih kriptosporidioze smo prikazali dva različna načina okužbe s kriptosporidiji. Na eni strani imamo okužbo s *C. parvum* – vrsto, ki je razširjena v Evropi, prevladuje v Sloveniji in je močno povezana z živinorejo. Po drugi strani pa prikazujemo okužbo, najverjetneje povzročeno s *C. hominis* – vrsto, ki prevladuje v Afriki in je tam zelo pogosta pri otrocih *(1, 6)*.

LITERATURA

1. Jorgensen HJ, Pfaller AM, Carroll CK, et al. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: ASM Press; 2015.
2. Šoba B. Genetska pestrost izolatov kriptosporidijev vrste Cryptosporidium parvum v Sloveniji [doktorsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2008.
3. DPDx: Cryptosporidiosis [internet]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; 2013 [citirano 2015 Sep 21]. Dosegljivo na: http://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/dx.html
4. Chalmers RM, Davies AP. Minireview: clinical cryptosporidiosis. Exp Parasitol. 2010; 124 (1): 138–46.
5. Logar J. Parazitologija človeka. Radovljica: Didakta; 2010.
6. Dillingham RA, Lima AA, Guerrant RL. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. Microbes Infect. 2002; 4 (10): 1059–66.
7. Stantič-Pavlinič M, Xiao L, Glaberman S, et al. Cryptosporidiosis associated with animal contacts. Wien Klin Wochenschr. 2003; 115 (3–4): 125–7.
8. Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, et al. A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. N Engl J Med. 1994; 331 (3): 161–7.
9. Santín M, Trout JM, Fayer R. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. Vet Parasitol. 2008; 155 (1–2): 15–23.
10. Kaneshiro ES, Cushion MT, Marciano-Cabral F, et al. Highlights and summaries of the 11th International Workshops on Opportunistic Protists. Eukaryot Microbiol. 2011; 58 (1): 1–6.
11. Widmer G, Sullivan S. Genomics and population biology of Cryptosporidium species. Parasite Immunol. 2012; 34 (2–3): 61–71.
12. Sopwith W, Osborn K, Chalmers R, et al. The changing epidemiology of cryptosporidiosis in North West England. Epidemiol Infect. 2005; 133 (5): 785–93.
13. NIJZ: Podatkovni portal [internet]. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje; 2015 [citirano 2015 Sep 21]. Dosegljivo na: https://podatki.nijz.si/pxweb/sl/NIJZ%20podatkovni%20portal/
14. Šoba B, Logar J. Genetic classification of Cryptosporidium isolates from humans and calves in Slovenia. Parasitology. 2008; 135 (11): 1263–70.
15. Šoba B, Petrovec M, Mioč V, et al. Molecular characterisation of Cryptosporidium isolates from humans in Slovenia. Clin Microbiol Infect. 2006; 12 (9): 918–21.
16. Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of Cryptosporidium infection in immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev. 2002; 15 (1): 145–54.
17. Abubakar I, Aliyu SH, Arumugam C, et al. Treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised individuals: systematic review and meta-analysis. Br J Clin Pharmacol. 2007; 63 (4): 387–93.
18. Smith HV, Nichols RA. Cryptosporidium: detection in water and food. Exp Parasitol. 2010; 124 (1): 61–79.
19. Bialek R, Binder N, Dietz K, et al. Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect Cryptosporidium parvum in fecal specimens. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002; 43 (4): 283–8.
20. Garcia LS, Shimizu RY. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of Giardia lamblia and Cryptosporidium parvum in human fecal specimens. J Clin Microbiol. 1997; 35 (6): 1526–9.
21. Johnston SP, Ballard MM, Beach MJ, et al. Evaluation of three commercial assays for detection of Giardia and Cryptosporidium organisms in fecal specimens. J Clin Microbiol. 2003; 41 (2): 623–6.
22. Bailey JM, Erramouspe J. Nitazoxanide treatment for giardiasis and cryptosporidiosis in children. Ann Pharmacother. 2004; 38 (4): 634–40.
23. Sekar U, Shanthi M. Blastocystis: Consensus of treatment and controversies. Trop Parasitol. 2013; 3 (1): 35–9.

Urška Dermota[1*], Marta Košir[2], Bonia Miljavac[3], Irena Grmek Košnik[4]

Določevanje stafilokoknih toksinov pri zastrupitvah s hrano – prikaz primera z Dolenjske

Detecting Staphylococcal Enterotoxins in Food Poisoning: A Case Study of an Outbreak in the Lower Carniola region

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: stafilokokna zastrupitev s hrano, safalada, krompirjeva solata, enterotoksin tipa SEC, PCR, PFGE, Dolenjska

IZHODIŠČA. Stafilokokna zastrupitev s hrano nastane zaradi uživanja hrane, onesnažene z enterotoksini bakterije *Staphylococcus aureus*. V prispevku opisujemo obravnavo izbruha na Dolenjskem. METODE. Ob izbruhu smo izvedli epidemiološko raziskavo in terenski ogled kuhinje podjetja. Odvzeli smo vzorce hrane, brise na snažnost s čistih površin kuhinje in brise rok kuharja. Zaposlenim v kuhinji smo odvzeli bris nosu in žrela ter pregledali blato na prisotnost patogenih črevesnih bakterij. Posameznim obolelim smo kultivirali blato. Izolatom bakterije *Staphylococcus aureus* iz brisov zaposlenih in vzorcev živil, smo določili enterotoksine z verižno reakcijo s polimerazo. Sorodnost med izolati *Staphylococcus aureus* iz živil in humanih vzorcev smo primerjali z elektroforezo v pulzirajočem gelu. REZULTATI. Obolelo je 36 od skupno 180 izpostavljenih oseb. Med obolelimi je 34 oseb zaužilo v olju cvrto safalado, 33 oseb pa krompirjevo solato. Pri sedmih zaposlenih smo v brisu nosu dokazali *Staphylococcus aureus*, pri enem pa v brisu žrela. Pri štirih izolatih *Staphylococcus aureus* smo dokazali prisotnost enterotoksinov tipa SEC, SEG, SEI, SELL in SELN ter pri enem izolatu prisotnost enterotoksinov tipa SEB, SELK in SELQ. Dva izolata *Staphylococcus aureus* nista tvorila enterotoksinov. V obeh živilih prisotnosti stafilokoknega enterotoksina nismo potrdili, pri izolatu *Staphylococcus aureus*, ki smo ga osamili iz safalade, smo dokazali prisotnost stafilokoknih enterotoksinov tipov SEC, SEG, SEI, SELL in SELN, v krompirjevi solati pa enterotoksin tipa SEA. ZAKLJUČKI. Na podlagi pridobljenih rezultatov laboratorijskih preiskav nismo uspeli dokazati direktne povezave med domnevnim virom okužbe in obolelimi. Rezultati epidemiološkega poizvedovanja kažejo na nedvomno vzročno povezavo med zaužitjem malice, safalade s krompirjevo solato, in zdravstvenimi posledicami pri obolelih.

[1*] Dr. Urška Dermota, univ. dipl. mikr., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj; urska.dermota@nlzoh.si

[2] Marta Košir, dr. med., Nacionalni inštitut za javno zdravje, Enota Novo mesto, Mej vrti 5, 8000 Novo mesto.

[3] Bonia Miljavac, dr. med., Nacionalni inštitut za javno zdravje, Enota Novo mesto, Mej vrti 5, 8000 Novo mesto.

[4] Doc. dr. Irena Grmek Košnik, dr. med., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj.

ABSTRACT

KEY WORDS: staphylococcal food poisoning, saveloy, potato salad, enterotoxin type SEC, PCR, PFGE, Lower Carniola

BACKGROUNDS. Staphylococcal food poisoning emerges due to the ingestion of staphylococcal enterotoxins performed in food by enterotoxigenic strains of bacteria *Staphylococcus aureus*. In this article, we describe an epidemiological investigation of an outbreak in the Lower Carniola region of Slovenia. METHODS. At the outbreak, we carried out an epidemiologic study and a field inspection of the kitchen. We collected food samples, environmental samples on cleanliness, and swabs from the cook's hands. Nose and throat swabs were taken from the kitchen employees and their stool was analysed for the presences of pathogenic bacteria. The stools of the patients were also cultured. The enterotoxins of the bacteria *Staphylococcus aureus* isolates were determined with the polymerase chain reaction. Relatedness between the isolates of *Staphylococcus aureus* from the food and human samples was determined by pulsed field gel electrophoresis. RESULTS. Thirty-six persons from a total of 180 exposed got ill. Thirty-four of the ill persons ingested saveloy and 33 persons ingested potato salad. *Staphylococcus aureus* was detected in the nose swabs of seven employees and in the throat swab of one employee. In four isolates of *Staphylococcus aureus*, the presence of enterotoxins of the types SEC, SEG, SEI, SELL and SELN was confirmed and in one isolate the presence of enterotoxins of the types SEB, SELK and SELQ was determined. Two isolates of the *Staphylococcus aureus* have not formed enterotoxins. In both food types, the presence of staphylococcal enterotoxins was not detected, in the isolate of the *Staphylococcus aureus*, isolated from the saveloy, the presence of enterotoxins of the types SEC, SEG, SEI, SELL and SELN was determined and in the potato salad the presence of enterotoxins of the type SEA. CONCLUSIONS. On the basis of the present results of laboratory analyses no proof of direct connection between the assumed infection source and the illness could be provided. The results of the epidemiologic research indicate an undoubted causal connection between the ingestion of the meal, saveloy with potato salad, and the health consequences for the ill patients.

IZHODIŠČA

Stafilokokna zastrupitev s hrano je pogosto prijavljena nalezljiva bolezen, ki je posledica zaužitja onesnažene hrane z enim ali več enterotoksini bakterije *Staphylococcus aureus* (angl. *staphylococcal enterotoxin*, SE) *(1–3)*. Po podatkih iz literature so do danes pri *S. aureus* odkrili več kot 23 različnih tipov enterotoksinov. Toksine razdelimo glede na način delovanja v dve skupini: enterotoksine in toksine, ki so podobni stafilokoknim enterotoksinom (angl. *staphylococcal enterotoxin-like*, SEL). Med enterotoksine uvrščamo tiste tipe toksinov, ki po zaužitju hrane povzročajo bruhanje oz. imajo emetično lastnost (SEA-SEE, SEG-SEJ, SER-SET). Druge toksine, ki nimajo emetične aktivnosti, pa uvrščamo med toksine, ki so podobni stafilokoknim enterotoksinom (SELK-SELQ, SELU-SELX) *(1, 3–5)*. Enterotoksini se tvorijo v logaritemski fazi rasti bakterije ali med prehodom iz logaritemske v stacionarno fazo rasti. Odporni so na toplotno obdelavo, zmrzovanje, sušenje, na nizek pH, proti kislinam in proteoličnim encimom *(1, 3)*. Stafilokokne enterotoksine uvrščamo med superantigene, saj lahko poleg zastrupitve

s hrano povzročajo tudi sindrom toksičnega šoka. Zapisi za enterotoksine se nahajajo na fagih, plazmidih, patogenih otokih ali drugih mobilnih genetskih elementih bakterije *S. aureus* (tabela 1) *(1, 3–6)*.

Bakterijo *S. aureus* najdemo pri zdravih osebah kot del normalne flore kože človeka. Najpogosteje naseljuje nosnice, predele pod pazduho, perinej in dimlje. Približno 30–40 % populacije je asimptomatskih nosilcev, ki imajo bakterijo v nosnicah *(2)*. Hrano s stafilokoki najpogosteje onesnaži človek, ki ne upošteva navodil higiene med procesom rokovanja s hrano. Bakterija *S. aureus* se od klicenosca ali osebe s stafilokokno okužbo kože na hrano prenaša kapljično, s kašljanjem in/ali kihanjem, neposredno preko rok ali posredno preko onesnaženih predmetov. Hrana se lahko s stafilokoki onesnaži tudi neposredno iz živali, npr. krav, ovc, koz in perutnine *(3, 5)*. Največjo nevarnost za zastrupitev s stafilokoki predstavljajo pogrete jedi, vnaprej pripravljeni izdelki, meso in mesni izdelki, izdelki, ki vsebujejo jajca, mleko in mlečni izdelki, kreme in sladoledi *(1, 3, 5)*.

Tabela 1. Povzetek karakteristik enterotoksinov in toksinov, ki so podobni stafilokoknim enterotoksinom bakterije *Staphylococcus aureus*. kDa – kilo Dalton, (da) – šibka reakcija, np – ni podatka *(1, 3, 6–7)*.

Tip toksina	Molekulska masa (kDa)	Oznaka gena	Lokacija gena	Emetska lastnost
SEA	27,1	*sea*	profag	da
SEB	28,4	*seb*	kromosom, plazmid, patogeni otok	da
$SEC_{1, 2, 3}$	27,5–27,6	*sec*	plazmid	da
SED	26,9	*sed*	plazmid	da
SEE	26,4	*see*	profag	da
SEG	27,0	*seg*	lokus *egc*, kromosom	da
SEH	25,1	*seh*	transpozon	da
SEI	24,9	*sei*	lokus *egc*, kromosom	da
SELJ	28,5	*selj*	plazmid	np
SELK	26,0	*selk*	patogeni otok	(da)
SELL	26,0	*sell*	patogeni otok	(da)
SELM	24,8	*selm*	lokus *egc*, kromosom	(da)
SELN	26,1	*seln*	lokus *egc*, kromosom	(da)
SELO	26,7	*selo*	lokus *egc*, kromosom	(da)
SELP	27,0	*selp*	profag	(da)
SELQ	25,0	*selq*	patogeni otok	(da)
SER	27,0	*ser*	plazmid	da
SES	26,2	*ses*	plazmid	da
SET	22,6	*set*	plazmid	da
SELU	27,1	*selu*	lokus *egc*, kromosom	np
$SELU_2$ (SEW)	26,6	*selu2*	lokus *egc*, kromosom	np
SELV	24,9	*selv*	lokus *egc*, kromosom	np
SELX	np	*selx*	jedro genoma	np

Stafilokokno zastrupitev s hrano v sanitarnem mikrobiološkem laboratoriju potrdimo, ko v hrani dokažemo prisotnost več kot 10^5 kolonij (angl. *colony-forming unit*, CFU) bakterije *S. aureus* na gram hrane. V hrani dokažemo prisotnost stafilokonega enterotoksina ter dokažemo *S. aureus* z enakimi lastnostmi tudi pri osebi, ki se je s hrano zastrupila *(5)*. Pri izbruhih nalezljivih bolezni je pomembno hitro ukrepanje z namenom iskanja vira okužbe, epidemiološko poizvedovanje o obolelih, preprečevanje širjenja in obvladovanje izbruha ter medsebojno sodelovanje epidemiologov, higienikov, inšpektorjev in mikrobiologov *(5, 8)*.

Namen in cilji raziskave

V prispevku opisujemo primer stafilokokne zastrupitve s hrano v enem izmed podjetij na Dolenjskem. Prvo informacijo o sumu na zastrupitev s hrano smo na Nacionalnem inštitutu za javno zdravje, območni enoti Novo mesto (NIJZ OENM), prejeli 17. julija 2015, ob 18.30. Obveščeni smo bili, da je zdravniško pomoč poiskalo deset oseb, ki so imele prebavne težave. Vse osebe, ki so poiskale zdravstveno pomoč, so se prehranjevale v kuhinji podjetja in zaužile malico, ki je vsebovala safalado, cvrto v olju, s krompirjevo solato. Na podlagi zbranih informacij smo postavili hipotezo, da je vir zastrupitve hrana, ki so jo zaužili pri dopoldanski ali popoldanski malici. Sledile so začetne aktivnosti za epidemiološko preiskavo, pridobivanje informacij o poteku dogodka, pridobivanje kontaktov obolelih, anketiranje, odvzem in zbiranje vzorcev za laboratorijsko diagnostiko in usklajevalni pogovori za ukrepanje in preprečevanje nadaljevanje izbruha.

METODE

V skupini za raziskavo izbruha smo sodelovali: NIJZ OENM, Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, območna enota Novo mesto (UVHVVR OENM), oddelki Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (NLZOH), in sicer Oddelek za okolje in zdravje, Oddelek za mikrobiološke analize živil, vod in drugih vzorcev okolja in Oddelek za medicinsko mikrobiologijo v Novem mestu, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo v Kranju, Oddelek za mikrobiološke raziskave Maribor ter Oddelek za mikrobiološke analize živil, vod in drugih vzorcev okolja v Mariboru. O sumu na izbruh smo obvestili tudi Zdravstveni inšpektorat Republike Slovenije, območno enoto Novo mesto (ZIRS OENM).

Epidemiološka in okoljska preiskava ter odvzem vzorcev

Predstavniki NIJZ OENM, NLZOH in UVHVVR OENM smo opravili izredni pregled v kuhinji podjetja v soboto, 18. julija 2015, na katerem smo priporočili takojšnje ukrepe za preprečevanje širjenja morebitnega črevesnega nalezljivega obolenja. Za namene laboratorijske raziskave smo odvzeli vzorce živil, brise na snažnost s čistih površin v kuhinji ter brise rok kuharja. Vsem zaposlenim v kuhinji, ki so opravljali delo v petek, 17. julija 2015, smo odredili preiskavo blata na patogene črevesne bakterije ter odvzem brisa nosu in žrela na *S. aureus*. Štirim obolelim v izbruhu smo odredili preiskavo blata na rotaviruse, adenoviruse, noroviruse, na patogene črevesne bakterije, ki vključuje pregled na salmonele, šigele, kampilobakter, jersinije, *S. aureus, Escherichia coli* in *Clostridium perfringens*.

Laboratorijske preiskave

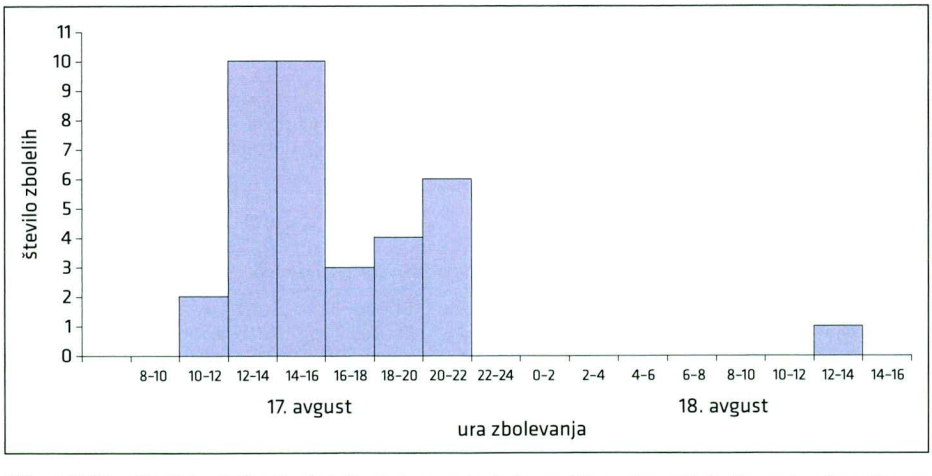
Vzorce hrane in brise na snažnost smo preiskali na Oddelku za mikrobiološke analize živil, vod in drugih vzorcev okolja NLZOH *(9–11)*. Vzorce, odvzete zaposlenim v kuhinji in obolelim osebam, pa smo po standardnih postopkih preiskali na Oddelku za medicinsko mikrobiologijo NLZOH. Vse izolate bakterije *S. aureus* smo identificirali z masnim spektrometrom MALDI-

TOF (angl. *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight*) tehnologije (Biotyper, Bruker Daltonic GmBH, Bremen, Nemčija). Občutljivost izolatov *S. aureus* na antibiotike smo testirali v skladu s standardom EUCAST (angl. *European committee on antimicrobial susceptibility testing*) *(12)*. Gene enterotoksinov bakterije *S. aureus* smo dokazovali v različnih multipleks reakcijah PCR (angl. *polymerase chain reaction*) po predhodno objavljenih postopkih *(13, 14)*. Sorodnost izolatov *S. aureus*, osamljenih iz živil in humanih vzorcev, smo ugotavljali z elektroforezo v pulzirajočem gelu (angl. *pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE) *(15)*.

REZULTATI

Rezultati epidemiološke preiskave

Na osnovi podatkov, ki smo jih uspeli pridobiti z anketiranjem obolelih, smo ugotovili, da je v povezavi z uživanjem hrane 17. julija 2015 v kuhinji podjetja na Dolenjskem s prebavnimi težavami zbolelo 36 oseb (34 moških in 2 ženski) od skupno 180 izpostavljenih oseb, ki so zaužile dopoldansko ali popoldansko malico. Ta je vsebovala safalado, cvrto v olju, in krompirjevo solato. Med zbolelimi je 34 oseb zaužilo safalado in 33 krompirjevo solato. Drugih skupnih virov prehranjevanja v dneh pred pojavom težav oboleli niso navajali. Prvi bolnik je zbolel pol ure po zaužitju malice. Pri 35 osebah so se črevesne težave pojavile še isti dan, le pri eni naslednjega dne, kar kaže na skupni vir okužbe. Inkubacijski čas od zaužitja hrane do pojava prvih znakov bolezni je trajal v skupnem povprečju 3,8 ur. Pri osebah, ki so zaužile dopoldansko malico, je bil v povprečju 3,5 ure, pri osebah, ki so zaužile popoldansko malico, pa 2,7 ure. V epidemični krivulji sta nakazana dva vrha; prvi v nekaj urah po zaužitju dopoldanske malice, drugi pa v nekaj urah po zaužitju popoldanske malice (slika 1). Glede na starostno strukturo je obolel po en bolnik iz starostne skupine 15–19 let in 20–24 let, 20 iz starostne skupine 25–44 let in 14 bolnikov iz starostne skupine 45–64 let. Bolezenski znaki, ki so jih navedli bolniki, so bili slabost in driska (33 oseb), bruhanje (29 oseb), krči v trebuhu (24 oseb) in mrzlica (12 oseb). Noben bolnik ni poročal o povišani telesni temperaturi. Prebavne težave so pri večini izzvenele že isti dan, v povprečju so trajale 20 ur. Ambulantno je bilo obravnavanih 16 bolnikov, dve osebi sta bili na nekajdnevni hospitalizaciji v Splošni bolnišnici Brežice. Umrl ni nihče.



Slika 1. Epidemična krivulja števila obolelih glede na pojav bolezenskih znakov pri izbruhu zastrupitve s hrano.

Rezultati laboratorijskih preiskav humanih vzorcev

Preiskava blata štirih bolnikov na viruse in patogene črevesne bakterije *S. aureus*, črevesne *E. coli* ter *C. perfringens* je bila negativna. Tudi preiskava blata 20 zaposlenih v kuhinji podjetja je bila negativna. Pri sedmih (35 %) od skupno 20 zaposlenih v kuhinji smo v brisu nosu in pri enem (5 %) v brisu žrela dokazali bakterijo *S. aureus*. Vsi izolati *S. aureus* so bili odporni proti penicilinu in občutljivi na preostale testirane antibiotike. Pri štirih izolatih *S. aureus* smo dokazali prisotnost enterotoksinov tipa SEC, SEG, SEI, SELL in SELN, pri enem pa prisotnost enterotoksinov tipa SEB, SELK in SELQ. Dva izolata *S. aureus* nista tvorila enterotoksinov.

Rezultati okoljske preiskave

Štirje brisi od skupno 12, odvzetih na snažnost, je bilo sanitarno-mikrobiološko neustreznih. Brisi rok, odvzeti zaposleni osebi v kuhinji podjetja, so ustrezali kriteriju primernega higienskega stanja rok. V vzorcih hrane (safalada in krompirjeva solata) smo dokazali 50 CFU/g oz. 100 CFU/g koagulazno pozitivnih stafilokokov pri temperaturi 37 °C. V obeh živilih prisotnost stafilokoknega enterotoksina nismo potrdili, pri izolatu *S. aureus*, ki smo ga osamili iz safalade, smo dokazali prisotnost stafilokoknih enterotoksinov tipov SEC, SEG, SEI, SELL in SELN, v krompirjevi solati pa enterotoksin tipa SEA (tabela 2).

Preliminarni rezultati preverjanja sorodnosti z metodo PFGE enterotoksin

Tabela 2. Rezultati odvzetih brisov na snažnost in vzorcev hrane (safalada, cvrta v olju, in krompirjeva solata). CFU – colony-forming unit, g – gram, * vzorca sta bila shranjena v isti posodi.

Odvzeti brisi na snažnost v kuhinji podjetja	**Število mikroorganizmov pri 30 °C**	**Število enterobakterij pri 37 °C**	**Število koagulazno pozitivnih stafilokokov pri 37 °C**
prijemalka	> 1.000 CFU	< 5 CFU	nismo našli
posoda za mešanje krompirjeve solate	> 1.000 CFU	> 1.000 CFU	
salamoreznica	> 1.000 CFU	30 CFU	
deska za delikateso	> 1.000 CFU	20 CFU	

bris, odvzet iz rok zaposlene osebe v kuhinji	***primerno higiensko stanje rok*** (število črevesnih enterokokov: < 10 CFU; število koagulazno pozitivnih stafilokokov pri 37 °C: < 10 CFU)				
krompirjeva solata*	Stafilokokni enterotoksini	Število koagulazno pozitivnih stafilokokov pri 37 °C	Število *Bacillus cereus*	Število sulfitreducirajočih klostridijev	Skupno število mikroorganizmov pri 30 °C
	nismo dokazali	100 CFU/g	< 100 CFU/g	< 10 CFU/g	1.700 CFU/g
	živilo zdravstveno ustrezno				
safalada, cvrta v olju*	Stafilokokni enterotoksini	Število koagulazno pozitivnih stafilokokov pri 37 °C	Število *Bacillus cereus*	Število sulfitreducirajočih klostridijev	Skupno število mikroorganizmov pri 30 °C
	nismo dokazali	50 CFU/g	< 100 CFU/g	< 10 CFU/g	2.200 CFU/g
	živilo zdravstveno ustrezno				

pozitivnih sevov *S. aureus*, izoliranih iz humanih vzorcev in vzorcev živil, ne potrjujejo sorodnosti. V času oddaje prispevka končnih rezultatov še nismo prejeli.

RAZPRAVA

Obravnavali smo izbruh stafilokokne zastrupitve s hrano, v katerem je zbolelo 36 (20 %) oseb od 180 izpostavljenih. Ugotovili smo, da je 34 oseb zaužilo safalado, cvrto v olju, in 33 oseb krompirjevo solato v času dopoldanske in popoldanske malice. Obe živili (krompirjeva solata in safalada), ki smo ju ocenili za rizični, sta bili glede na sanitarno-mikrobiološke preiskave ocenjeni za zdravstveno ustrezni. V obeh živilih je bil izoliran koagulazno pozitiven stafilokok, vendar je bila vsebnost stafilokoka v vzorcu (CFU/g živila) malice nizka, kar kaže, da vzorec malice ni bil dlje časa izpostavljen nevarnemu temperaturnemu območju za razmnoževanje stafilokokov, je pa v povezavi z opisanim dogodkom vsebnost stafilokoka indikativna. *S. aureus* se v onesnaženih živilih zelo hitro razmnožuje pri temperaturah med 7 in 48 °C *(3)*. Že v nekaj urah se namnoži zadostna količina bakterij, da v živilo izločijo zadostno količino enterotoksinov, ki povzročijo zastrupitev s hrano. Za zastrupitev je potrebna količina manj kot 1 µg toksina. Avtorji v literaturi navajajo, da je za zastrupitev s čokoladnim mlekom, ki jo je povzročil *S. aureus*, ki je izločal enterotoksin tipa A, zadoščalo že 0,5 ng toksina/ml mleka *(3–4)*. Enterotoksini so toplotno stabilni, zato jih z običajnimi postopki obdelave, kot so kuhanje ali pečenje, ne uničimo. Sama prisotnost bakterije in toksinov v živilu ne spremeni vonja, videza in okusa, zato ne moremo posumiti, da živilo ni ustrezno *(3–5)*.

Glede na epidemiološke podatke in laboratorijske preiskave nismo mogli natančno opredeliti, katero živilo je bilo vir zastrupitve v tem izbruhu, saj sta bili obe živili shranjeni v isti posodici, s čimer je bila omogočena navzkrižna kontaminacija. Glede na način priprave smo kot bolj rizično opredelili krompirjevo solato, ne moremo pa povsem izključiti safalade. Odvzeti brisi na snažnost s čistih delovnih površin kuhinje so pokazali, da je bilo higiensko stanje kuhinje dan po zaužitju sumljivih živil neprimerno. Ugotovili smo tudi pomanjkljivo hlajenje delovnih prostorov v kuhinji.

Domnevamo, da je bil v izbruhu vir okužbe najverjetneje klicenosec enterotoksin pozitivnega stafilokoka, ki je zaradi slabega poznavanja oz. neupoštevanja priporočil za higiensko rokovanje z živili med pripravo onesnažil živila. Po podatkih iz literature stafilokokno zastrupitev s hrano najpogosteje povzroča *S. aureus*, ki izloča enterotoksin tipa SEA samostojno ali v kombinaciji s preostalimi enterotoksini *(1, 3)*. V naši raziskavi izbruha smo v krompirjevi solati dokazali prisotnost enterotoksina tipa SEA, ki pa ga nismo dokazali ne v vzorcih blat obolelih in ne vzorcih, odvzetih zaposlenim v kuhinji. V raziskavi izbruha Grmek-Košnikove s sodelavci so v krompirjevi solati prav tako dokazali prisotnost enterotoksina tipa SEA *(8)*. V safaladi in pri štirih zaposlenih v kuhinji pa smo dokazali enterotoksine tipov SEC, SEG, SEI, SELL in SELN. Johler s sodelavci je opisal stafilokokno zastrupitev, povzročeno z ovčjim sirom, ki je vseboval enterotoksine SEG, SEI, SELM, SELN in SELO *(16)*.

Za dokazovanje stafilokoknih enterotoksinov so na voljo različne metode. Najpogosteje uporabljamo imunološke metode, npr. reverzno pasivno lateksno aglutinacijo (RPLA), encimsko-imunski test (ELISA) in druge. S temi testi dokazujemo enterotoksine tipov SEA, SEB, SEC, SED in SEE, ki so tudi najpogostejši povzročitelji zastrupitev *(1, 3)*. Molekularne metode (PCR) pa nam omogočajo dokazovanje tudi preostalih tipov enterotoksinov, ki imajo emetične lastnosti in

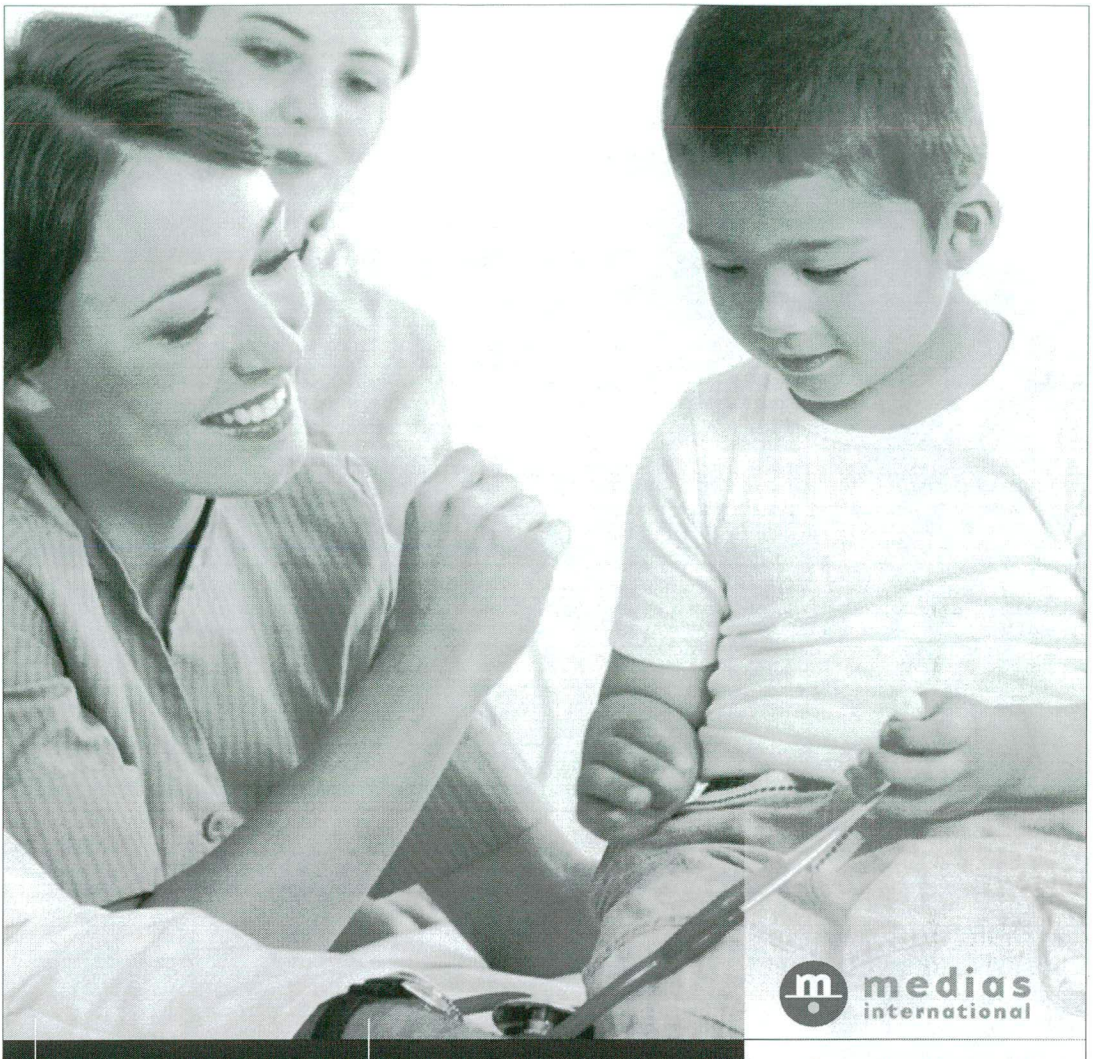
jih v zadnjem času pogosteje povezujejo kot možne povzročitelje zastrupitev s hrano *(3, 5, 16)*. Pomanjkljivost molekularnih metod je, da dokaz prisotnosti genov enterotoksinov v živilu ali humanih vzorcih ne opredeli tudi dejanskega izražanja gena in tvorbe enterotoksinov *(5)*.

ZAKLJUČKI

Preliminarni rezultati preverjanja sorodnosti z metodo PFGE enterotoksin pozitivnih sevov *S. aureus*, izoliranih iz humanih vzorcev in vzorcev živil, ne potrjujejo sorodnosti. Na podlagi pridobljenih rezultatov laboratorijskih preiskav nismo uspeli dokazati neposredne povezave med domnevnim virom okužbe in obolelimi. Rezultati epidemiološkega poizvedovanja kažejo na nedvomno vzročno povezavo med zaužitjem malice, safalade s krompirjevo solato, in zdravstvenimi posledicami pri obolelih.

LITERATURA

1. Argudin MA, Mendoza MC, Rodicio MR. Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins. Toxins. 2010; 2: 1751–73.
2. Logar M. Bakterijske zastrupitve s hrano. In: Tomažič J, Strle F, eds. Infekcijske bolezni. Ljubljana: Združenje za infektologijo; 2014. p. 347–8.
3. Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. FEMS Microbiol Rev. 2012; 36: 815–36.
4. Pinchuck IV, Beswick EJ, Reyes VE. Staphylococcal enterotoxins. Toxins. 2010; 2: 217–97.
5. Heinnekinne JA, Ostyn A, Guillier F, et al. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? Toxins. 2010; 2: 2106–16.
6. Omoe K, Hu DL, Ono HK, et al. Emetic potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins. Infect Imun. 2013; 81 (10): 3627–31.
7. Schelin J, Wallin-Carlquist, Cohn MT, et al. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. Virulence. 2011; 2 (6): 580–92.
8. Grmek Košnik I, Krt Lah A, Dermota U, et al. Obravnava izbruha stafilokokne zastrupitve s hrano v osnovni šoli. Zdrav Var. 2014; 53: 168–78.
9. Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili 2000. Uradni list RS št. 52/2000.
10. Uredba splošnih načel in zahtevah živilske zakonodaje, ustanovitvi Evropske agencije za varnost hrane in postopkih, ki zadevajo varnost hrane 2002. Uredba evropskega parlamenta in sveta (ES) št. 178/2002.
11. Olsen SJ, MacKinnon LC, Goulding JS, et al. Surveillance for foodborne disese outbreaks – United States, 1993-1997. MMWR CDC Surveill Summ. 2000; 49 (1): 1–62.
12. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015.
13. Monday SR, Bohach GA. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. J Clin Microbiol. 1999; 37: 3411–4.
14. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, et al. Relationships between Staphylococcus aureus genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. Infect Immun. 2002; 70 (2): 631–41.
15. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995; 33: 2233–9.
16. Johler S, Giannini P, Jermini M, et al. Further evidence for staphylococcal food poisoning outbreaks caused by egc-encoded enterotoxins. Toxins. 2015; 7: 997–1004.



medias international

Z vami že od leta 1992

Medias International d.o.o.
Leskoškova cesta 9D
SI-1000 Ljubljana
Telefon: 01 52 02 300
Fax: 01 52 02 495
info@medias-int.si
www.medias-int.si

BD BIOTEHNOLOGIJA
- Pretočni citometri
- Monoklonska protitelesa
- Celične kulture
- Falcon laboratorijskaplastika
- Molekularna diagnostika

BD MIKROBIOLOŠKI SISTEMI
- Bactec sistemi za hemokulture
- Sensi diski
- Gojišča (Difco, BBL) in reagenti
- Identifikacijski sistemi Crystal, Phoenix ID/AST
- MGIT za TBC sistem

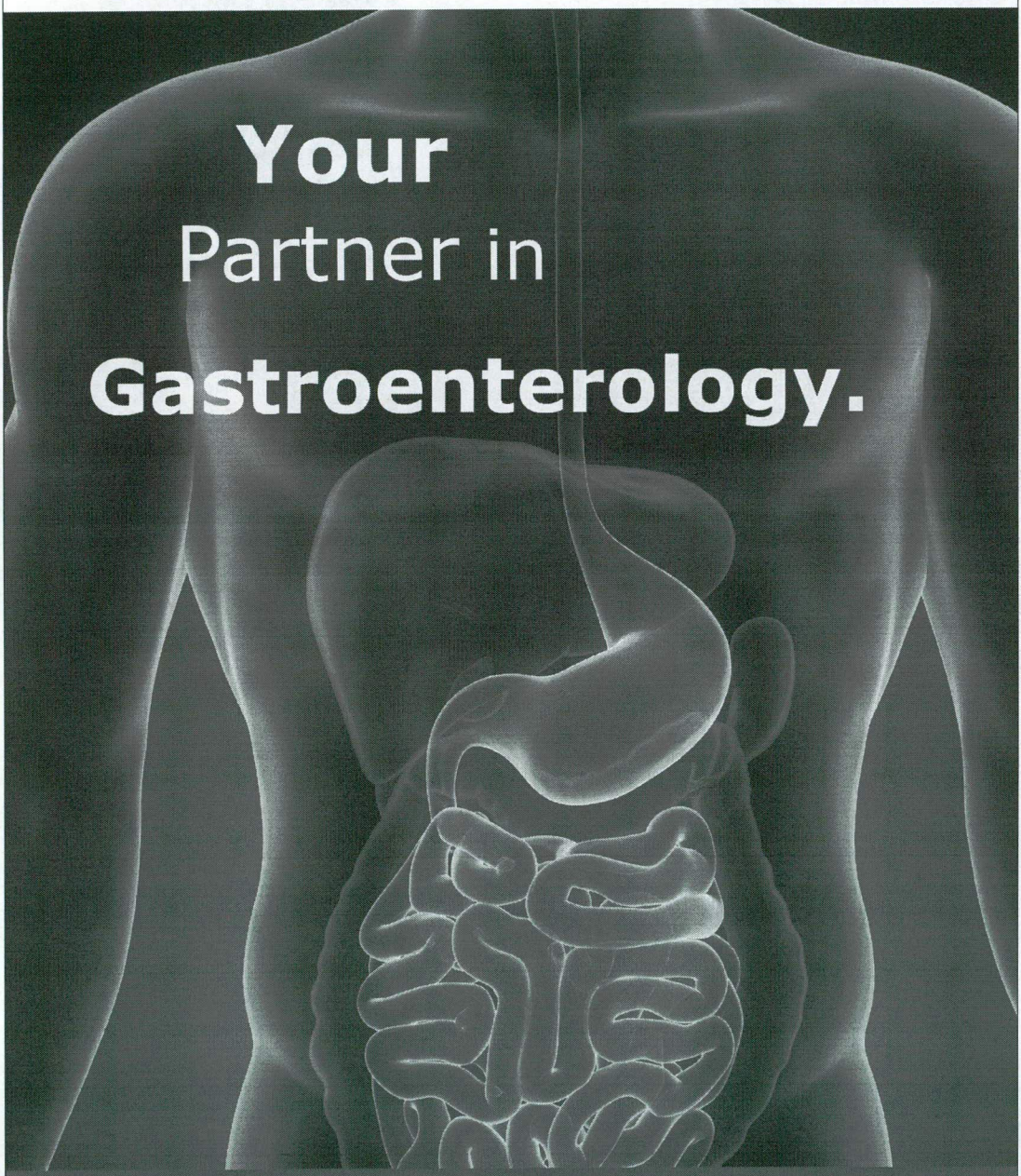
BD VACUTAINER
- Sistemi za odvzem krvi
- Urinski sistemi

BD MEDICAL
- Diabetes - insulinke in igle za peresnike
- IV terapija
- Injekcijski sistemi
- Anestezija

BD

Global Technology.
Local **Solutions.**

BIOMEDICA
BIOMEDIS



Biomedis M.B. d.o.o.
Slokanova 12 · 2000 Maribor, Slovenia · T +386 2 471 63 01
office@bmgrp.si · www.bmgrp.si



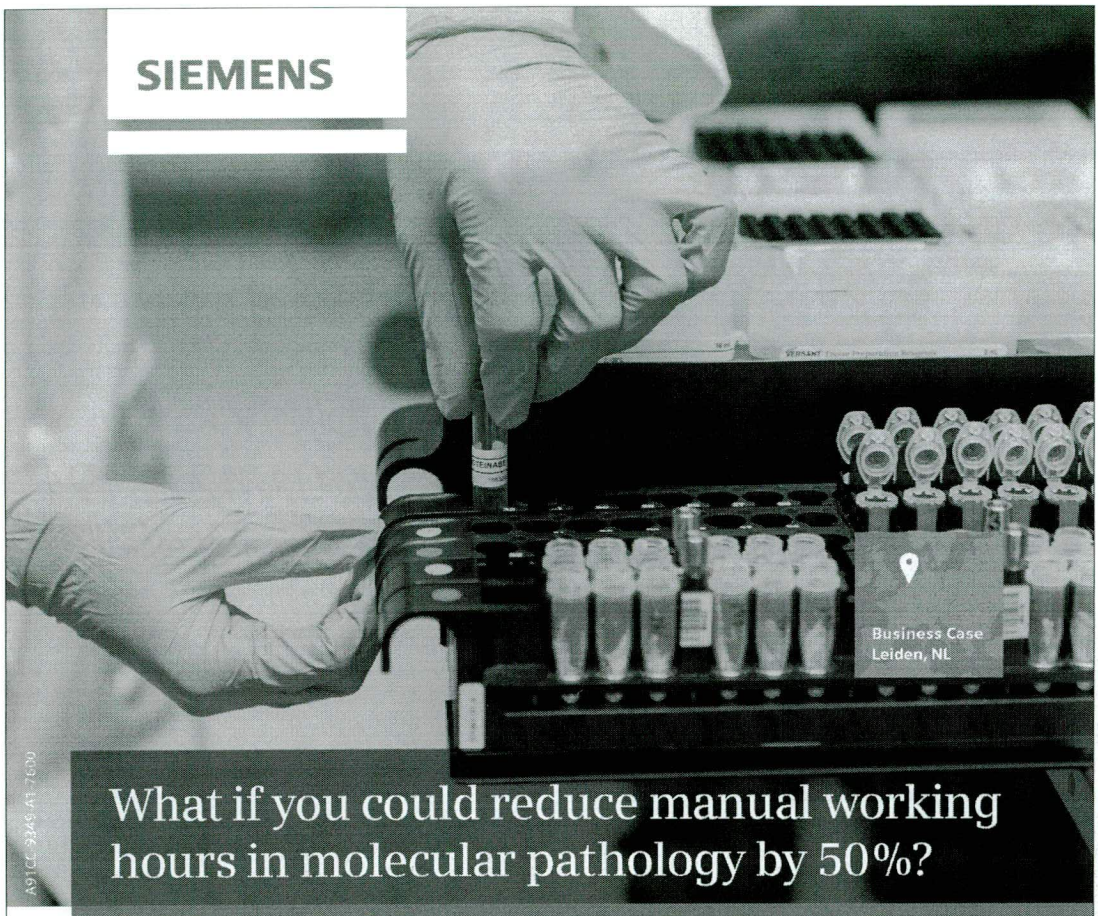
Dolinškova 8, 1000 Ljubljana
tel. 01 4273213, 4283650, fax 01 4273191
el. pošta: omega@omega.si

applied biosystems
by Thermo Fisher Scientific

gibco
by Thermo Fisher Scientific

invitrogen
by Thermo Fisher Scientific

iontorrent
by Thermo Fisher Scientific



What if you could reduce manual working hours in molecular pathology by 50%?

www.siemens.com/healthcare-leiden

For a better understanding of the pathology of cancer cells, medical researchers around the world are using biomarkers. However, before a biomarker test can be performed, the genetic information has to be extracted from the solid tissue and the nucleic acids have to be isolated as carefully as possible. This has been a critical and highly manual step, so far. At the Department of Pathology at Leiden University Medical Center, tissue samples can now be processed twice as fast thanks to a fully automated workflow. This not only saves costs, time, and source material, but most of all accelerates and improves diagnostic testing for cancer patients.

For the complete business case, visit **www.siemens.com/healthcare-leiden.**

Leiden University Medical Center

Location:	Leiden, Netherlands
Innovator:	Molecular biologists at the Department of Pathology
Specialty:	Molecular diagnostics
Technology:	Siemens Tissue Preparation Solution

The statements by Siemens' customers described herein are based on results that were achieved in the customer's unique setting. Since there is no "typical" hospital and many variables exist (e.g., hospital size, case mix, level of IT adoption) there can be no guarantee that other customers will achieve the same results.

Answers for Life.

A91CC-33645-A3-7600

REMAS

POSREDOVANJE IN ZASTOPSTVO

ReMaS d. o. o., Koseška cesta 8, 1000 Ljubljana, Slovenija;
tel. +386 1 58 19 204, fax: + 386 1 58 19 232, GSM 040 633 820, 040 427 082
www.remas.si remas@siol.net

S STROKOVNO POMOČJO IN ZUNANJO KONTROLO VAM OMOGOČAMO BOLJŠE REZULTATE

OXOID
DEDICATED TO MICROBIOLOGY

Meridian Bioscience, Inc. 30 YEARS 1977 – 2007
Inspired Science. Trusted Solutions.

IDEXX LABORATORIES

Human

HEINZ HERENZ HAMBURG-GERMANY

virion\serion

NOVATEC IMMUNDIAGNOSTICA GMBH

PALL Pall Corporation

MicroBioLogics®

BOLTY

SENTINEL DIAGNOSTICS

EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG

eppendorf



Impress Yourself

Novi potrošni material za celične kulture Eppendorf

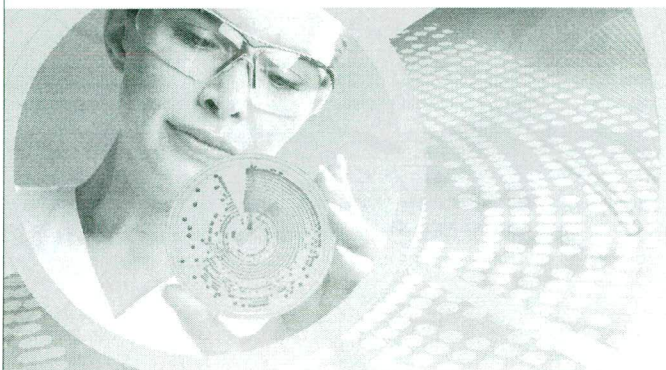
Popolnoma novi potrošni material za celične kulture Eppendorf bo zares navdušil vaše celice. Izjemen dizajn, zanesljivost in čistost izhajajo iz naših 50-letnih izkušenj. Potrošni material za celične kulture Eppendorf so ustvarili strokovnjaki za tiste, ki stremijo k popolnosti!

> Neprekosljiva kakovost, čistost in sterilnost zagotavljajo zanesljive pogoje za gojenje celičnih kultur
> Bistveno izboljšan dizajn za več varnosti in skladnosti
> Maksimalna varnost in zaupanje med shranjevanjem in transportom

www.eppendorf.com/ccc

Eppendorf® and the Eppendorf logo are registered trademarks of Eppendorf AG, Germany.
U.S. Design Patents are listed on www.eppendorf.com/ip - All rights reserved, including graphics and images - Copyright © 2015 by Eppendorf AG.

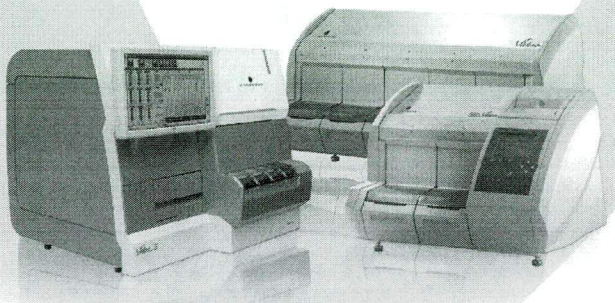
Vse kar potrebujete za diagnostiko okužb s C. difficile.



BIOMÉRIEUX

chromID™ by bioMérieux C. difficile

PRVO kromogeno gojišče
za **HITRO** izolacijo in identifikacijo *Clostridium difficile*



Vidas

Detekcija toksina A & B / GDH detekcija

Vidas C. difficilie panel vključuje **dva testa** kot pomoč pri postavitvi diagnoze, infekcije s C. difficile.

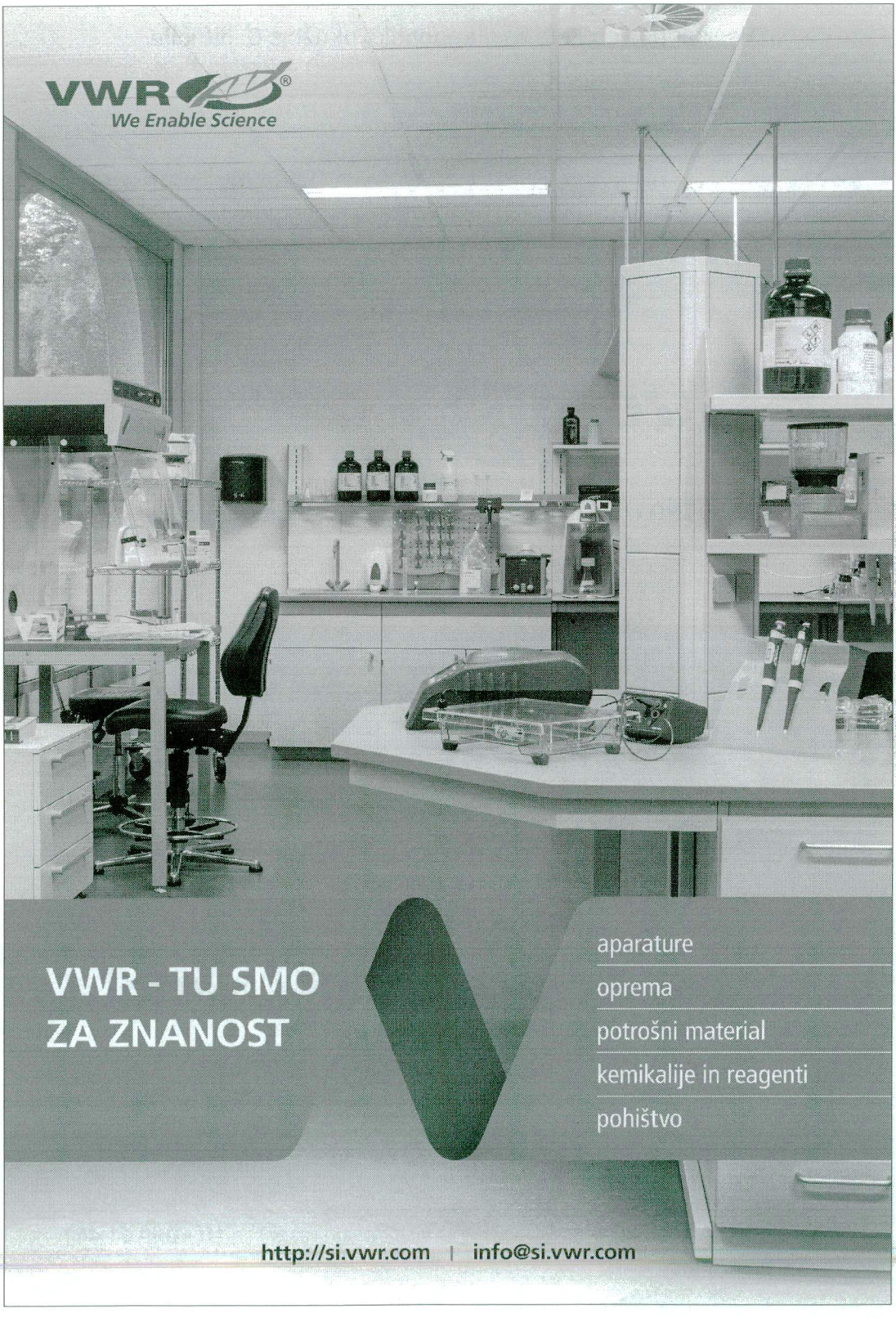
Avtomatska in enostavna uporaba, hitri rezultati, **fleksibilna rešitev** prilagojena majhnim in velikim laboratorijem.

Pomaga vam izločiti negativne vzorce v samo **50 minutah** (VIDAS GDH).

mikro+polo
vaš partner za laboratorij

Zagrebška cesta 22 | 2000 Maribor
T 02 614 33 00 | **M** 030 61 40 00 | **F** 02 614 33 20
E info@mikro-polo.si | **W** www.mikro-polo.si

MODRA ŠTEVILKA
080 61 40
podpora@mikro-polo.si


VWR
We Enable Science
VWR - TU SMO
ZA ZNANOST
aparature
oprema
potrošni material
kemikalije in reagenti
pohištvo
http://si.vwr.com | info@si.vwr.com

4titude,
Bimos – Interstuhl Büromöbel,
Bio-Rad Medical Diagnostics,
Biolin Scientific,
Bioquell,
Biotage,
Biotest,
Delta T,
Ditabis,
EKF Diagnostic,
Eppendorf,
Eurofins GeneScan,
Eurofins Genomics,
Focus Diagnostics,
Hain Lifescience,
Heipha,
Hoefer,
IDEXX Laboratories,
Liofilchem,
Mart Microbiology,
Medical Wire (MWE),
Molecular Devices (Genetix),
Qiagen,
R-Biopharm,
Rosco Diagnostica,
SalvisLab,
Sarstedt,
Sifin,
Tecan,
Thermo Fisher Scientific (Revco),
Ultra Violet Products (UVP)

mediline



· laboratorijska oprema
· potrošni materiali
· reagenti

Mediline mešana trgovska družba, d.o.o.
Perovo 30 | p.p. 5 | SI-1241 Kamnik | Slovenija
T +386 (0)1 830 80 40 | F +386 (0)1 830 80 70 / 63
E info@mediline.si | I www.mediline.si

Zinforo™
fosamilceftarolin



Učinkovita in varna empirična monoterapija zapletenih okužb kože in mehkih tkiv[1]

Zinforo 600 mg prašek za koncentrat za raztopino za infundiranje

▼Za to zdravilo se izvaja dodatno spremljanje varnosti. Tako bodo hitreje na voljo nove informacije o njegovi varnosti. Zdravstvene delavce naprošamo, da poročajo o katerem koli domnevnem neželenem učinku zdravila

Skrajšan povzetek glavnih značilnosti zdravila

Sestava: Ena viala vsebuje 600 mg fosamilceftarolina v obliki fosamilceftarolinijevega monoacetata monohidrata.
Indikacije: Zdravilo Zinforo je indicirano pri odraslih za zdravljenje zapletenih okužb kože in mehkih tkiv ter zunajbolnišnične pljučnice.
Odmerjanje in način uporabe: Priporočeni odmerek za bolnike, stare 18 let ali več, je 600 mg na 12 ur v 60-minutni intravenski infuziji in velja za vse infuzijske volumne (50 ml, 100 ml ali 250 ml). Priporočeno trajanje zdravljenja zapletenih okužb kože in mehkih tkiv je od 5 do 14 dni, priporočeno trajanje zdravljenja zunajbolnišnične pljučnice pa 5 do 7 dni. Odmerek je treba prilagoditi bolnikom z zmerno do hudo okvaro ledvic (očistek kreatinina ≥ 15 do ≤ 50 ml/min) in končno odpovedjo ledvic, vključno z bolniki na hemodializi in sicer če je očistek kreatinina > 30 in ≤ 50 (400 mg intravensko (v 60 minutah) na 12 ur), ≥ 15 in ≤ 30 (300 mg intravensko (v 60 minutah) na 12 ur), končna odpoved ledvic (ESRD – end-stage renal disease), vključno s hemodializo (200 mg intravensko (v 60 minutah) na 12 ur). Starejšim osebam (≥65 let) z očistkom kreatinina > 50 ml/min odmerka ni treba prilagoditi. Bolnikom z okvaro jeter odmerka ni treba prilagoditi. Varnost in učinkovitost zdravila Zinforo pri otrocih od rojstva do < 18 let starosti še nista ugotovljeni.
Kontraindikacije: preobčutljivost za zdravilno učinkovino ali katerokoli pomožno snov, preobčutljivost za cefalosporinska zdravila za zdravljenje bakterijskih okužb,
takojšnja in huda preobčutljivost (npr. anafilaktična reakcija) na katerokoli drugo vrsto betalaktamskih zdravil za zdravljenje bakterijskih okužb (npr. na penicilline ali karbapeneme)
Opozorila in previdnostni ukrepi: Možne so resne preobčutljivostne reakcije, občasno s smrtnim izidom. Če se med zdravljenjem z zdravilom Zinforo pojavi huda alergijska reakcija, je treba uporabo zdravila prekiniti in ustrezno ukrepati. Med uporabo fosamilceftarolina sta bila opisana z zdravili za zdravljenje bakterijskih okužb povezani kolitis in psevdomembranski kolitis; segata lahko od blagega do smrtno nevarnega. Zato je na to diagnozo treba pomisliti pri vseh bolnikih, ki se jim med uporabo fosamilceftarolina ali po njej pojavi driska. V takšnih okoliščinah pride v poštev prenehanje zdravljenja s fosamilceftarolinom in uporaba podpornih ukrepov, obenem z uporabo specifičnega zdravljenja proti Clostridium difficile. Med zdravljenjem z zdravilom Zinforo ali po njem se lahko pojavi superinfekcija. Zdravilo Zinforo je treba uporabljati previdno pri bolnikih s konvulzivno motnjo. Odmerek je treba prilagoditi bolnikom z zmerno do hudo okvaro ledvic (očistek kreatinina ≥ 15 do ≤ 50 ml/min) in končno odpovedjo ledvic, vključno z bolniki na hemodializi. Med zdravljenje s cefalosporini se lahko pojavi pozitiven izvid direktnega antiglobulinskega testa (DAGT - direct antiglobulin test). Bolnike, pri katerih se med zdravljenjem z zdravilom Zinforo ali po njem pojavi anemija, je treba pregledati glede možnosti pojava hemolitične anemije.
Nosečnost in dojenje: Zaradi previdnosti se je zdravilu Zinforo med nosečnostjo bolje izogniti, razen če klinično stanje ženske zahteva zdravljenje z antibiotikom, ki ima takšen protibakterijski profil kot zdravilo Zinforo. Ni znano, ali se fosamilceftarolin ali ceftarolin pri človeku izloča v materino mleko. Odločiti se je treba bodisi za prenehanje dojenja bodisi za prekinitev/prenehanje zdravljenja z zdravilom Zinforo, upoštevaje koristi zdravljenja za žensko.
Medsebojno delovanje zdravil: Študije medsebojnega delovanja zdravil s fosamilceftarolinom niso bile izvedene. Možnost za medsebojno delovanje ceftarolina ali fosamilceftarolina z zdravili, ki se presnavljajo z encimi P450, je predvidoma majhna, ker in vitro niti ne zavirata niti ne inducirata encimov P450. Ceftarolin ali fosamilceftarolin se in vitro ne presnavljata z encimi P450, zato ni verjetno, da bi njuna sočasna uporaba z induktorji ali zaviralci P450 vplivala na farmakokinetiko ceftarolina. Ceftarolin in vitro ni ne substrat ne zaviralec ledvičnih privzemnih prenašalcev (OCT2, OAT1 in OAT3). Zato ni pričakovati medsebojnih delovanj ceftarolina z zdravili, ki so substrati ali zaviralci (npr. probenecid) teh prenašalcev.
Neželeni učinki: Najpogostejši neželeni učinki, ki so se pojavili pri ≥ 3 % bolnikov, zdravljenih z zdravilom Zinforo, so bili driska, glavobol, navzea in srbenje. Na splošno so bili blagi ali zmerni.
Poročanje o domnevnih neželenih učinkih zdravila po izdaji dovoljenja za promet je pomembno. Omogoča namreč stalno spremljanje razmerja med koristmi in tveganji zdravila. Od zdravstvenih delavcev se zahteva, da poročajo o katerem koli domnevnem neželenem učinku zdravila na
Univerzitetni klinični center Ljubljana, Interna klinika, Center za zastrupitve, Zaloška cesta 2, SI-1000 Ljubljana, Faks: + 386 (0)1 434 76 46, e-pošta: farmakovigilanca@kclj.si.
Vrsta in vsebina ovojnine: 20-ml steklena viala (iz stekla tipa 1), zaprta z gumijastim (halobutilnim) zamaškom, aluminijsko zaporo in odstranljivim pokrovčkom; zdravilo je pakirano v pakiranje z 10 vialami.
Datum priprave besedila: oktober 2014
Imetnik dovoljenja za promet: AstraZeneca AB, S-151 85, Södertälje, Švedska.
Dodatne informacije so na voljo pri: AstraZeneca UK Limited, Podružnica v Sloveniji, Verovškova 55, 1000 Ljubljana, telefon: 01/51 35 600.
Pred predpisovanjem, prosimo, preberite celoten povzetek glavnih značilnosti zdravila.
Samo za strokovno javnost. Informacija pripravljena: maj 2015.

1. Corey GR et al. Clin Inf Dis 2010; 5: 641-50.

AstraZeneca

MAT043/15

www.kemomed.si

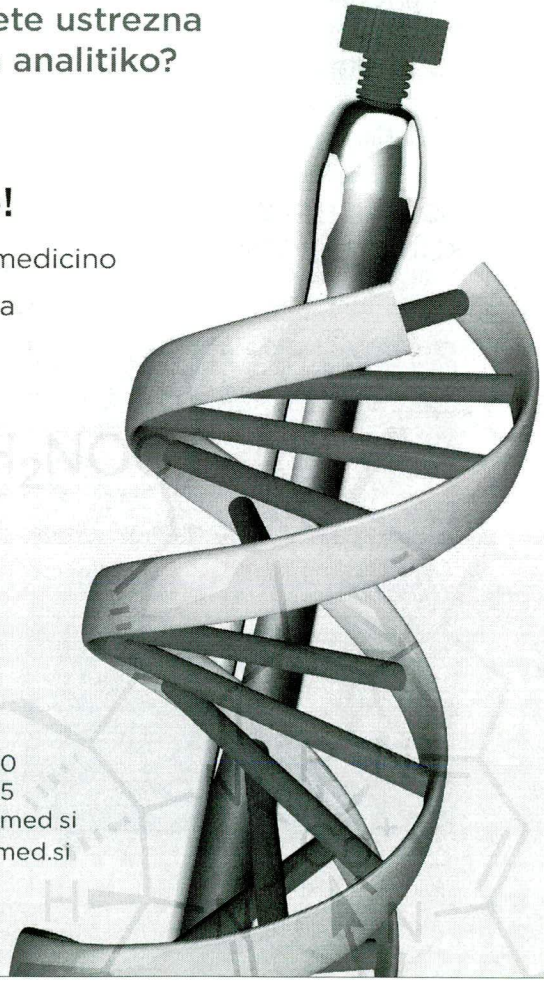
KEMOMED
PRINAŠAMO REŠITVE

? Iščete rešitve na področju znanosti o življenju?

? Potrebujete ustrezna orodja za analitiko?

Mi vam jih ponujamo!

- Reagenti za diagnostiko in biomedicino
- Instrumenti in tehnična podpora
- Potrošni material
- Aplikativna pomoč
- Pipetni program in akreditirane kalibracije
- Plastika



Kemomed

Svetovanje, trgovina in trženje d.o.o

Kališka 9
PE: Stritarjeva 5
4000 Kranj
Slovenija

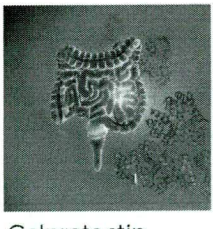
T 04 2015 050
F 04 2015 055
E info@kemomed si
W www.kemomed.si

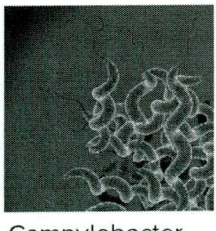


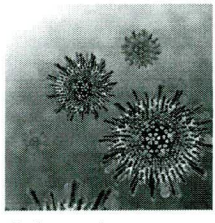
Diagnostika v blatu

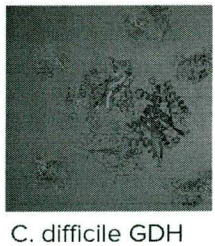
Podjetje DiaSorin ponuja širok nabor popolnoma avtomatiziranih preiskav v vzorcu blata.
Spoznajte vse prednosti, ki jih ponuja imunodiagnostika v blatu. DiaSorin Liaison XL avtomatiziran sistem omogoča hitre rezultate, fleksibilnost pri delu, boljšo učinkovitost in sledljivost.

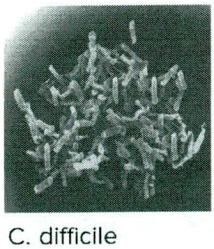
ODKRIJTE REŠITVE, KI JIH NUDI PODJETJE DIASORIN ZA VSE KLINIČNE POTREBE.

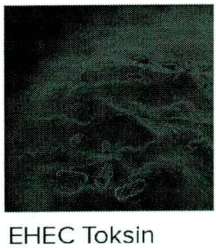

Calprotectin

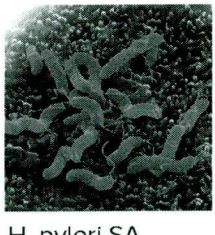

Campylobacter

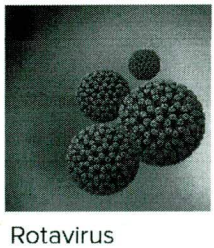

Adenovirus


C. difficile GDH


C. difficile
Toksina A&B


EHEC Toksin


H. pylori SA


Rotavirus

www.genos.si

INVIGENIUS

stratec molecular

popolnoma avtomatizirana priprava vzorcev
DNA in RNA v diagnostičnih laboratorijih

INVIMAG
UNIVERSAL KIT
Edinstvena značilnost



GLAVNE ZNAČILNOSTI:

- ekstrakcija DNA in RNA do 12 vzorcev naenkrat
- standardizirani protokoli za pripravo vzorcev
- kemija reagentov z magnetnimi delci
- skladnost s CE in IVD direktivo
- primeren za ekstrakcijo iz različnih kliničnih vzorcev:
  polna kri, plazma, serum, urin, raztopine vzorcev iz brisov, blato, sputum

Univerzalni protokol se uporablja za ekstrakcijo genomske, bakterijske, virusne DNA in virusne RNA iz različnih kliničnih vzorcev. Volumen vzorcev do 200 µl.

Sanolabor

www.sanolabor.si

Maritim

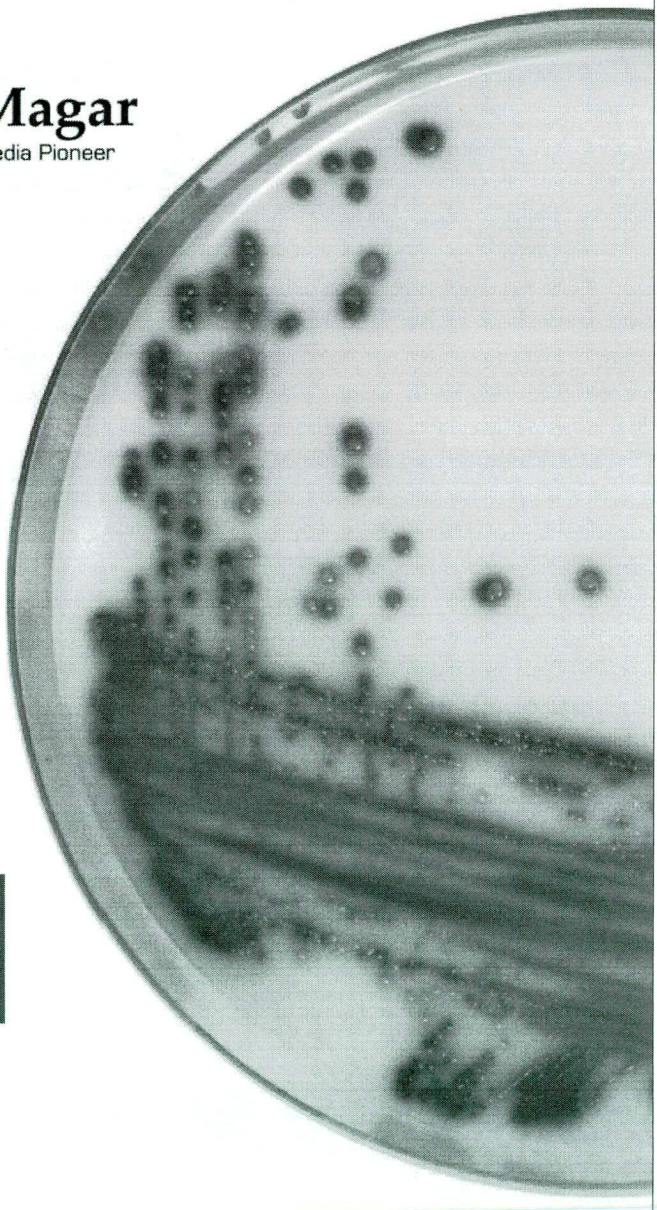
Smo podjetje, kjer kontinuirano spremljamo najnovejše pristope v omejevanju in obravnavi mikrobnih in virusnih okužb. Nudimo vam zanesljive in tehnološko dovršene proizvode za uporabo v mikrobiologiji priznanih svetovnih proizvajalcev.

CHROMagar
The Chromogenic Media Pioneer

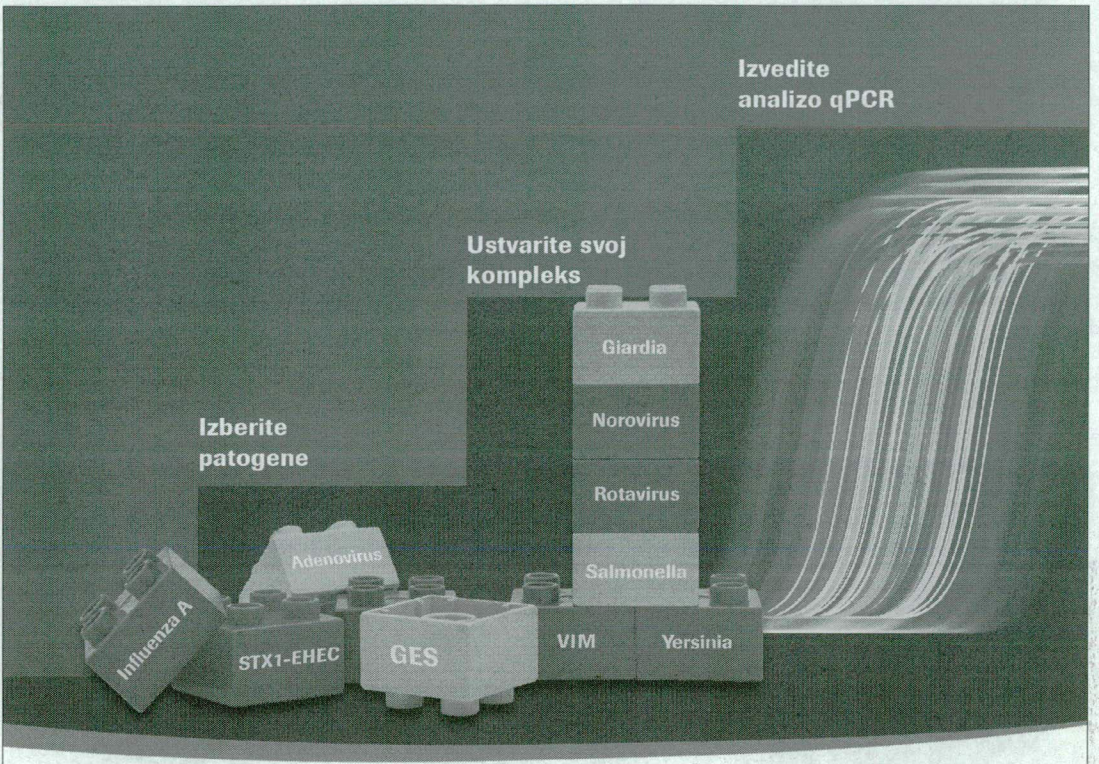
Alere™

GEN•MICA

STATENS SERUM INSTITUT



Maritim, d.o.o., Tacenska 20, 1210 LjubljanaTel.: 01 512 83 20 ; Fax: 01 512 83 25; www.maritim.si



Trije koraki do zanesljive detekcije patogenov

Bodite prilagodljivi. Ostanite učinkoviti. Ohranite nadzor.

Paleta reagentov za odkrivanje črevesnih patogenov (RUO)

Paraziti	Bakterije	Virusi
Entamoeba	Yersinia	Norovirus GG1
Entamoeba histolytica		Sapovirus
Giardia	Campylobacter	Norovirus GG1
		Norovirus GG2
Dientamoeba	Shigella/EIEC	Rotavirus
Cryptosporidium	Salmonella	Adenovirus F
Blastocystis	Plesiomonas	Enterovirus
	Aeromonas	Astrovirus

Dx-0052-2015

TIB MOLIBOL

Roche farmacevtska družba d.o.o., Divizija za diagnostiko
Vodovodna cesta 109, 1000 Ljubljana, T: 01/56 80 260
F: 01/56 80 273, www.roche.si

Roche

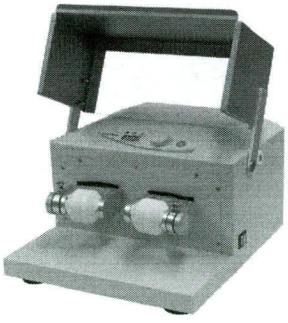
DOMEL, d.o.o., Otoki 21, 4228 Železniki
PE Laboratorijski sistemi, Na Plavžu 79, 4228 Železniki
Phone: +386 4 5117 500, Fax: +386 4 5117 501
WEB: **http://www.tehtnica.si** E-mail: **info@tehtnica.si**

DOMEL®

Tehtnica

Domel, PE Laboratorijskisi sistemi smo naslednik podjetja Tehtnica Železniki.

Proizvajamo vrhunske laboratorijske instrumente namenjene laboratorijski uporabi. Visoko kakovostna pripravljenih vzorcev omogočamo z instrumenti kot so blender, krogličnі mlin in centrifuge. Vzorce ohranjamo s podpornimi instrumenti kot so stresalni inkubator, grelni, hladilni inkubator ter stresalniki (orbitalni, recipročni, 3D, nazibni).

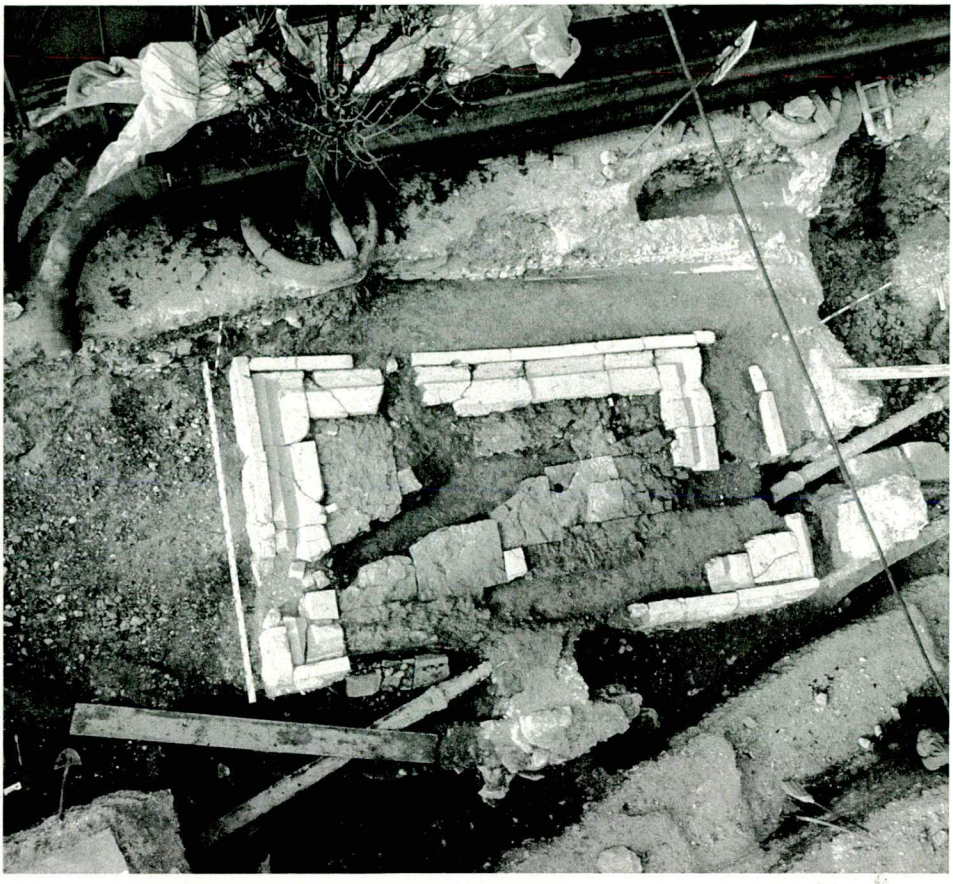







DOMEL®

http://labs-sl.domel.com
Nova spletna stran



Javna latrina v severovzhodnem vogalu emonske insule XVII. Konec 4. stoletja/začetek 5. stoletja n. št. (Muzej in galerije mesta Ljubljane; fotografija: Vinko Šribar, MGMl)



7. BANIČEVI DNEVI: OKUŽBE PREBAVIL

5 Surveillance of Foodborne and Waterborne Diseases – *Eva Grilc, Maja Sočan*

11 Environment and Food as a Source of Infection – *Stanka Vadnjal, Urška Henigman, Andrej Kirbiš, Majda Biasizzo*

21 Molecular Epidemiology of the Intestinal Parasitoses – *Barbara Šoba, Miha Skvarč*

29 Enteric Infections Vaccines – A Review of Vaccines Currently in Use and in Development – *Zoran Simonović, Alenka Trop Skaza*

37 The Immune Response and the Development of Vaccines against *Helicobacter pylori* – *Alojz Ihan*

45 The Effect of Microbiome on Human Health – *Gorazd Avguštin*

53 Gastrointestinal Tract as a Source of Infection in Immunocompromised Patients – *Enver Melkić, Samo Zver*

61 Small Intestinal Bacterial Overgrowth Syndrome – *Samo Plut, Mateja Pirš*

67 Different Approaches to Studies of Gut Microbiota and *Clostridium difficile* Interactions – *Sandra Janežič, Aleksander Mahnič, Maja Rupnik*

73 Problems of Diarrheagenic *Escherichia coli* Detection – *Marija Trkov, Tjaša Žohar Čretnik, Mateja Pirš, Ingrid Berce, Mateja Ravnik, Metka Paragi*

83 New Approaches in Detection of Classical Bacterial Diarrheal Pathogens – *Mateja Pirš, Tjaša Cerar Kišek, Jernej Guzej, Barbara Stalowsky Poglajen, Tina Plankar Srovin, Tatjana Lejko Zupanc*

93 Novelties in Gastrointestinal Viral Infections – *Andrej Steyer, Tina Naglič, Marko Kolenc, Martin Sagadin, Mateja Poljšak-Prijatelj*

103 Gastrointestinal Infections in Small Children – *Monika Jevšnik, Andrej Steyer, Miroslav Petrovec*

111 Syndromic Approach in Diagnostics of Enteric Infections – *Mateja Pirš, Tjaša Cerar Kišek, Barbara Šoba, Miha Skvarč, Andrej Steyer, Marko Kolenc, Mateja Poljšak-Prijatelj*

121 Cytomegalovirus Colitis – *Nina Zidar, Ivan Ferkolj, Miroslav Petrovec*

127 The Microbiological Diagnostics of Infection with *Helicobacter pylori* – Do We Know How to Use it Correctly? – *Samo Jeverica, Samo Plut, Borut Štabuc*

135 Staphylocccocal Food Poisoning – Guidelines for Investigation in Case of an Outbreak or a Possible Outbreak and for Basic Hygienic Preventive Measures – *Eva Grilc, Nataša Šimac, Majda Pohar, Zoran Simonovič, Tatjana Frelih, Simona Uršič*

147 Gastrointestinal Infections in Returned Travelers from the Tropics – *Peter Kordiš, Veronika Grilj, Rok Grilj, Tadeja Kotar*

155 Diarrhea in Immunocompromised Patients – *Janez Tomažič, Mateja Pirš, Miha Skvarč*

167 Nosocomial Gastrointestinal Infections – *Tatjana Lejko Zupanc, Mateja Logar*

173 Control of Viral Enteric Infections in Hospitals and Long-Term Care Facilities – *Tatjana Mrvič, Tatjana Lejko Zupanc*

179 Management of *Clostridium difficile* Infections in Hospitals – *Helena Ribič*

187 In Anticipation of the New Infectious Diseases Society of America Guidelines for the Management of Infectious Diarrhea – *Mateja Logar*

195 Infections With Multiple Resistant Campylobacter in Slovenia – *Irena Grmek Košnik, Ingrid Berce, Marija Trkov, Mateja Ravnik, Matejka Bremec, Zdenka Horvat Šardi, Alenka Štorman, Tatjana Harlander, Živa Petrovič, Mateja Pirš*

203 *Campylobacter concisus* – An Emerging Pathogen: Cases of Enteric Infections in Children from the Gorica Region – *Ingrid Berce, Tanja Milanič Koron, Mateja Pirš, Romina Kofol*

213 Cystic Lesion in the Liver Caused by *Echinococcus* spp. – *Jasna Dragičević, Tadeja Kotar, Janez Tomažič, Barbara Šoba, Ana Kovač, Nina Starašinič, Miha Skvarč*

221 Increased Number of Diarrhea Cases in Children due to Infection with Protozoan *Cryptosporidium* spp. – *Matej Kokalj, Barbara Šoba, Eva Grilc, Jana Svetičič Marinko, Miha Skvarč*

229 Detecting Staphylococcal Enterotoxins in Food Poisoning: A Case Study of an Outbreak in the Lower Carniola region – *Urška Dermota, Marta Košir, Bonia Miljavac, Irena Grmek Košnik*