MEDICINSKI RAZGLEDI

LETNIK 55 SUPPLEMENT 4 NOVEMBER 2016

8. BANIČEVI DNEVI: OKUŽBE DIHAL

5 Epidemiologija tuberkuloze, pregledi in testiranja zdravstvenih delavcev – predstavitev smernic – *Petra Svetina, Sanja Grm Zupan*

11 Posebnosti in novosti v laboratorijski diagnostiki aktivne tuberkuloze in mikobakterioz v Sloveniji – *Manca Žolnir – Dovč, Irma Perko, Eva Sodja*

21 Laboratorijska diagnostika latentne tuberkuloze – 11-letne izkušnje s testom QuantiFERON – *Eva Sodja, Sandra Ažman, Manca Žolnir – Dovč*

31 Izzivi pri obravnavi bolnikov z netuberkuloznimi mikobakteriozami – *Petra Svetina, Sanja Grm Zupan*

35 Klinične in mikrobiološke značilnosti izoliranih nokardij v Sloveniji v letih 2004–2015 – *Katarina Osolnik, Manca Žolnir – Dovč, Viktorija Tomič*

39 Zunajbolnišnične pljučnice pri odraslih – izkušnje Klinike Golnik – *Renato Eržen, Luka Rebolj, Viktorija Tomič*

45 Respiratorne okužbe in neinvazivna mehanska ventilacija – *Irena Šarc*

53 Okužbe dihal pri bolnikih s cistično fibrozo – *Ana Kotnik Pirš*

61 Projekt EMBARC (European Multicentre Bronchiectasis Audit and Research Collaboration) in vloga inhalacijskih antibiotikov in makrolidov pri bronhiektazijah, ki niso posledica cistične fibroze – *Sabina Škrgat, Daša Naglič*

65 Mikrobiološka diagnostika bakterijskih okužb dihal – *Katja Seme, Viktorija Tomič*

73 Novosti v mikrobiološki diagnostiki atipičnih bakterij – *Darja Keše, Rok Kogoj*

79 Mikrobiološka diagnostika virusnih okužb dihal – *Miroslav Petrovec*

87 Vlaknate glive in okužbe dihal – *Rok Tomazin, Tadeja Matos*

101 Kolonizacija s *Pneumocystis jirovecii* ali pnevmocistična pljučnica – pregled diagnostičnih metod – *Andrej Glaser, Erika Robič, Petra Rogina Skvarč, Barbara Šoba Šparl, Saša Simčič, Miha Skvarč*

111 Oslovski kašelj v Sloveniji – epidemiologija in novosti v mikrobiološki diagnostiki – *Tamara Kastrin, Metka Paragi, Marta Grgič – Vitek, Irena Grmek Košnik, Tjaša Žohar Čretnik*

121 Invazivne pnevmokokne okužbe po uvedbi cepljenja s konjugiranim cepivom v nacionalni program cepljenja – *Metka Paragi, Verica Mioč, Tamara Kastrin, Alenka Kraigher, Tjaša Žohar Čretnik, Slovenska skupina za meningitise*

133 Legionele iz vzorcev okolja v povezavi z okužbami pri ljudeh – *Maja Gošnjak, Andrej Rojnik, Alenka Štorman, Darja Keše*

143 Spremljanje gripe v Sloveniji v sezonah 2000/2001 do 2015/2016 – *Katarina Prosenc Trilar, Nataša Berginc, Maja Sočan*

149 Cepljenje zdravstvenih delavcev proti gripi – miti in resnice – *Tatjana Lejko Zupanc*

157 Ukrepanje ob izbruhu gripe v zdravstveni ustanovi – *Irena Grmek Košnik, Helena Ribič, Matej Dolenc, Jana Lavtižar, Tanja Čebin Skale, Metka Velušček*

165 Akutni bronhiolitis – *Tatjana Mrvič, Uroš Krivec*

175 Okužbe z respiratornim sincicijskim virusom pri otrocih ter zaščita s palivizumabom – slovenske izkušnje – *Lilijana Kornhauser Cerar*

187 Pomen dokazovanja respiratornega sincicijskega virusa pri starostnikih – *Darja Duh, Andrej Golle, Nina Gorišek Miksić, Dušanka Vidovič*

197 Virusi parainfluence tipa 4 – povečano število zaznanih okužb pri otrocih v letu 2015 – *Darja Duh, Barbara Blažič, Andrej Golle, Vojko Berce*

205 Kako pomemben je virus parainfluence 4 pri otrocih v Sloveniji? – *Tina Uršič, Marko Kozjek, Martin Sagadin, Monika Jevšnik, Uroš Krivec, Marko Pokorn, Miroslav Petrovec*

213 Primer izbruha gripi podobne bolezni v regionalni bolnišnici – *Helena Ribič, Irena Grmek Košnik, Edita Eberl Gregorič, Matej Dolenc, Gordana Sivec, Miroslav Petrovec*

221 Diagnostika virusov, ki povzročajo okužbe dihal, s testom FilmArray (Idaho Technology): prednost ali slabost? – *Monika Jevšnik, Tina Uršič, Lara Lusa, Miroslav Petrovec*

MEDICINSKI RAZGLEDI
Letnik 55
Supplement 4
November 2016

8. BANIČEVI DNEVI: OKUŽBE DIHAL
Zbornik predavanj

ORGANIZATORJI
Sekcija za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe SZD,
Center za medicinsko mikrobiologijo Kranj, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano,
Klinika Golnik

GLAVNI UREDNIK
prof. dr. Miroslav Petrovec

ORGANIZACIJSKI IN STROKOVNI ODBOR
prof. dr. Miroslav Petrovec, prof. dr. Katja Seme, doc. dr. Irena Grmek Košnik, doc. dr. Tatjana Lejko Zupanc, Helena Ribič, doc. dr. Viktorija Tomič, mag. Edita Eberl Gregorič, mag. Mateja Ravnik

RECENZENTI
Miroslav Petrovec, Katja Seme, Manica Mueller Premru, Miha Skvarč, Tadeja Matos, Irena Grmek Košnik, Petra Svetina, Helena Ribič, Iztok Štrumbelj, Andrej Golle, Katarina Osolnik, Manca Žolnir Dovč

UREDNIŠKA EKIPA
Matej Goričar, Sara Kukman, Miha Oražem, Lana Vodnik, Nika Vrabič

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

ODGOVORNA UREDNICA
Hana Zavrtanik

TEHNIČNI UREDNIKI
Valentina Ahac, Tjaša Gortnar, Sara Kukman, Urban Neudauer

UREDNIŠKI ODBOR
Tjaša Divjak, Matej Goričar, Kristina Jevnikar, Vanesa Koračin, Nik Krajnc, Irena Krapež, Klemen Lovšin, Andraž Nendl, Jure Puc, Lana Vodnik, Nika Vrabič

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 2016
Vse pravice pridržane. Razmnoževanje ali razširjanje posameznih delov ali celotne publikacije s katerim koli sredstvom brez pisnega privoljenja založbe je prepovedano.

MEDICINSKI RAZGLEDI

LETNIK 55 SUPPLEMENT 4 NOVEMBER 2016

8. Baničevi dnevi: Okužbe dihal

5 Epidemiologija tuberkuloze, pregledi in testiranja zdravstvenih delavcev – predstavitev smernic / Epidemiology of Tuberculosis, Examinations and Testing of Health Care Workers – Presentation of Guidelines – *Petra Svetina, Sanja Grm Zupan*

11 Posebnosti in novosti v laboratorijski diagnostiki aktivne tuberkuloze in mikobakterioz v Sloveniji / Special Features and Novelties of Laboratory Diagnostics of Active Tuberculosis and Mycobacteriosis in Slovenia – *Manca Žolnir – Dovč, Irma Perko, Eva Sodja*

21 Laboratorijska diagnostika latentne tuberkuloze – 11-letne izkušnje s testom QuantiFERON / Laboratory Diagnosis of Latent Tuberculosis–11-Years' Experience with QuantiFERON Testing – *Eva Sodja, Sandra Ažman, Manca Žolnir – Dovč*

31 Izzivi pri obravnavi bolnikov z netuberkuloznimi mikobakteriozami / Challenges in Treating Patients with Nontuberculous Mycobacteriosis – *Petra Svetina, Sanja Grm Zupan*

35 Klinične in mikrobiološke značilnosti izoliranih nokardij v Sloveniji v letih 2004–2015 / Clinical and Microbiological Characteristics of Nocardia Isolates in Slovenia in 2004–2015 – *Katarina Osolnik, Manca Žolnir – Dovč, Viktorija Tomič*

39 Zunajbolnišnične pljučnice pri odraslih – izkušnje Klinike Golnik / Community-Acquired Pneumonia in Adults–Experience from Golnik Hospital – *Renato Eržen, Luka Rebolj, Viktorija Tomič*

45 Respiratorne okužbe in neinvazivna mehanska ventilacija / Pulmonary Infections and Non-invasive Mechanical Ventilation – *Irena Šarc*

53 Okužbe dihal pri bolnikih s cistično fibrozo / Respiratory Infections in Patients with Cystic Fibrosis – *Ana Kotnik Pirš*

61 Projekt EMBARC (European Multicentre Bronchiectasis Audit and Research Collaboration) in vloga inhalacijskih antibiotikov in makrolidov pri bronhiektazijah, ki niso posledica cistične fibroze / Brief Report from EMBARC (European Multicentre Bronchiectasis Audit and Research Collaboration) and the Role of Inhaled Antibiotics and Macrolides in non Cystic Fibrosis Broncіectasis – *Sabina Škrgat, Daša Naglič*

65 Mikrobiološka diagnostika bakterijskih okužb dihal / Microbiological Diagnostics of Bacterial Respiratory Tract Infections – *Katja Seme, Viktorija Tomič*

73 Novosti v mikrobiološki diagnostiki atipičnih bakterij / Recent Advances in Laboratory Diagnostics of Atypical Bacteria – *Darja Keše, Rok Kogoj*

79 Mikrobiološka diagnostika virusnih okužb dihal / Microbiological Diagnostics of Viral Respiratory Tract Infections – *Miroslav Petrovec*

87 Vlaknate glive in okužbe dihal / Filamentous Fungi and Respiratory Infections – *Rok Tomazin, Tadeja Matos*

101 Kolonizacija s *Pneumocystis jirovecii* ali pnevmocistična pljučnica – pregled diagnostičnih metod / *Pneumocystis jirovecii* – Colonisation or Pneumonia - Review of Diagnostic Methods – *Andrej Glaser, Erika Robič, Petra Rogina Skvarč, Barbara Šoba Šparl, Saša Simčič, Miha Skvarč*

111 Whooping Cough in Slovenia–Epidemiology and Updates in Microbiological Diagnostics – *Tamara Kastrin, Metka Paragi, Marta Grgič – Vitek, Irena Grmek Košnik, Tjaša Žohar Čretnik*

121 Invazivne pnevmokokne okužbe po uvedbi cepljenja s konjugiranim cepivom v nacionalni program cepljenja / Invasive Pneumococcal Diseases After the Introduction of Conjugate Vaccine in the National Immunization – *Metka Paragi, Verica Mioč, Tamara Kastrin, Alenka Kraigher, Tjaša Žohar Čretnik, Slovenska skupina za meningitise*

133 Legionele iz vzorcev okolja v povezavi z okužbami pri ljudeh / Legionella from Environmental Samples in Relation to Human Infections – *Maja Gošnjak, Andrej Rojnik, Alenka Štorman, Darja Keše*

143 Spremljanje gripe v Sloveniji v sezonah 2000/2001 do 2015/2016 / Influenza Surveillance in Slovenia Between Seasons 2000/2001 and 2015/2016 – *Katarina Prosenc Trilar, Nataša Berginc, Maja Sočan*

149 Cepljenje zdravstvenih delavcev proti gripi – miti in resnice / Influenza Vaccination of Healthcare Workers–Myths and Truths – *Tatjana Lejko Zupanc*

157 Ukrepanje ob izbruhu gripe v zdravstveni ustanovi / Managment of an Influenza Outbreak in a Health Care Institution – *Irena Grmek Košnik, Helena Ribič, Matej Dolenc, Jana Lavtižar, Tanja Čebin Skale, Metka Velušček*

165 Akutni bronhiolitis / Acute Bronchiolitis – *Tatjana Mrvič, Uroš Krivec*

175 Okužbe z respiratornim sincicijskim virusom pri otrocih ter zaščita s palivizumabom – slovenske izkušnje / Respiratory Syncytial Virus Infection in Children and Immunoprophylaxis with Palivizumab – Slovenian Experience – *Lilijana Kornhauser Cerar*

187 Pomen dokazovanja respiratornega sincicijskega virusa pri starostnikih / The Importance of Respiratory Syncytial Virus Detection in Elderly – *Darja Duh, Andrej Golle, Nina Gorišek Miksić, Dušanka Vidovič*

197 Virusi parainfluence tipa 4 – povečano število zaznanih okužb pri otrocih v letu 2015 / Parainfluenza Viruses Type 4–Increased Number of Detected Infections in Children in 2015 – *Darja Duh, Barbara Blažič, Andrej Golle, Vojko Berce*

205 Kako pomemben je virus parainfluence 4 pri otrocih v Sloveniji? / How Important is Parainfluenza Virus 4 in Slovene Children? – *Tina Uršič, Marko Kozjek, Martin Sagadin, Monika Jevšnik, Uroš Krivec, Marko Pokorn, Miroslav Petrovec*

213 Primer izbruha gripi podobne bolezni v regionalni bolnišnici / Outbreak of an Influenza-like Disease in a Regional Hospital – *Helena Ribič, Irena Grmek Košnik, Edita Eberl Gregorič, Matej Dolenc, Gordana Sivec, Miroslav Petrovec*

221 Diagnostika virusov, ki povzročajo okužbe dihal, s testom FilmArray (Idaho Technology): prednost ali slabost? / Detection of Respiratory Viruses with FilmArray (Idaho Technology): Advantage or Disadvantage? – *Monika Jevšnik, Tina Uršič, Lara Lusa, Miroslav Petrovec*

Zborniku na pot

Letos smo se zbrali na Bledu, našem gorenjskem biseru, s temo okužbe dihal. Srečanje organizirajo Sekcija za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj in Klinika Golnik. Morda se udeleženci sprašujete, zakaj smo se ponovno odločili za tematiko okužb dihal, saj smo zadnje gorenjsko strokovno srečanje, Baničeve dneve leta 2008, posvetili isti temi? Odgovor je preprost: okužbam dihal se ponovno posvečamo, ker smo v teh letih zelo napredovali tako v mikrobiološki diagnostiki kot tudi v razumevanju okužb in vodenju antibiotičnega zdravljenja. Vse okoli nas se spreminja – tako mikroorganizmi kot naše razumevanje. Kar je bilo nekdaj samoumevno, danes morda ni več.

Tuberkuloza se je tako iz pogoste bolezni spremenila v potencialno bolezen. Okužba z bacilom tuberkuloze je velikokrat latentna in se lahko aktivira ob zavori imunskega sistema. Zato predstavljamo pristope k odkrivanju in zdravljenju latentne okužbe. Pozorni pa postajamo tudi na klinično pomembne okužbe, ki jih povzročajo netuberkulozne mikobakterije.

V zadnjih letih smo priča izrednemu razvoju molekularnih tehnik dokazovanja virusnih povzročiteljev okužb. Metode so postale dostopne tudi manjšim laboratorijem, rezultati so klinikom na voljo v nekaj urah. Metode se seveda med seboj razlikujejo v občutljivosti in specifičnosti. Uporabniki metod moramo biti pri uporabi in izvedbi kritični oziroma odgovorni do tako do stroke kot do bolnika in klinika, kateremu predajamo rezultate.

O tem in o gripi, cepljenju zdravstvenih delavcev proti gripi, oslovskemu kašlju, legionelozi pa tudi o obvladovanju okužb bomo podrobneje spregovorili na letošnjem srečanju. Organizatorji si želimo, da bi tekom predavanj in razprav udeleženci izvedeli veliko novega, da bi čim več spraševali in se imeli lepo. Lepo se je srečati ter si izmenjati izkušnje s somišljeniki, ki podobno mislijo in veliko vedo. Takšna srečanja nas bogatijo in življenju dajejo pečat.

Irena Grmek Košnik

Petra Svetina[1], Sanja Grm Zupan[2]

Epidemiologija tuberkuloze, pregledi in testiranja zdravstvenih delavcev – predstavitev smernic

Epidemiology of Tuberculosis, Examinations and Testing of Health Care Workers – Presentation of Guidelines

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: tuberkuloza, zdravstveni delavci, preprečevanje prenosa okužbe

Tuberkuloza je pogosta nalezljiva bolezen, ki jo povzročajo bacili *Mycobacterium tuberculosis complex* in je še vedno svetovni zdravstveni problem. V Sloveniji je bolezen redka, zato se jo prepogosto prezre oziroma se nanjo pomisli pozno in tako se poveča verjetnost prenosa okužbe z bacili. Zdravstveni delavci so tvegana skupina za razvoj bolezni, saj so pri svojem delu lahko izpostavljeni bacilom. Z doslednim in stalnim izvajanjem ukrepov za preprečevanje prenosa okužbe, zmanjšamo pojavnost tuberkuloze pri zdravstvenih delavcih.

ABSTRACT

KEY WORDS: tuberculosis, health workers, infection prevention

Tuberculosis is a common contagious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis complex* and still represents a health care problem worldwide. In Slovenia, the disease is rare and hence too often ignored or considered too late; the likelihood of transmission of infection thus increases. Healthcare workers are at risk for development of the disease because of their exposure in their working environment. With strict and continuous implementation of measures to prevent the transmission of infection, we can reduce the incidence of tuberculosis in healthcare workers.

[1] Petra Svetina, dr. med., Pulmološki oddelek, Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik 36, 4204 Golnik; petra.svetina@klinika-golnik.si

[2] Sanja Grm Zupan, dr. med., Pulmološki oddelek, Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik 36, 4204 Golnik

EPIDEMIOLOGIJA TUBERKULOZE V SVETU

Tuberkuloza (TB) sodi med najpogostejše nalezljive bolezni v svetu in še vedno predstavlja velik zdravstveni problem, zlasti v državah v razvoju, ki imajo slab nadzor nad boleznijo zaradi slabo izdelanih ali neizvajanih Nacionalnih programov za TB, slabših ekonomskih razmer, porasta pojava odpornih oblik bolezni, porasta incidence okužb z virusom HIV in povečanja migracije.

V letu 2014 je bilo po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) v svetu na novo ugotovljenih 9,6 milijona primerov TB, od tega je bilo 5,4 milijone moških, 3,2 milijona žensk in 1 milijon otrok *(1)*. Med temi primeri je bilo 480.000 primerov bolezni, katere povzročitelj ni bil občutljiv za zdravili rifampicin in izoniazid (angl. *multi-drug resistant tuberculosis*, MDR-TB), ki sta najpomembnejši zdravili za zdravljenje TB. Sočasno je bilo 12 % vseh oseb s TB okuženih z virusom HIV. Umrlo je 1,6 milijona oseb s TB, od tega 140.000 otrok *(1)*.

EPIDEMIOLOGIJA TUBERKULOZE V SLOVENIJI

V Sloveniji pojavnost TB v zadnjih 20 letih upada. Pred dvajsetimi leti je bila incidenca bolezni nad 28 primerov/100.000 prebivalcev, v zadnjih letih je incidenca bolezni pod 10 primerov/100.000 prebivalcev, kar Slovenijo uvršča med države z nizko incidenco TB (trenutno 33 držav sveta). Incidenca TB za leto 2015 v Sloveniji znaša 6,3 primere/100.000 prebivalcev *(2, 3)*.

V zadnjem desetletju je bila bolezen nekoliko pogostejša pri moških, med katerimi je bilo največ bolnikov v starostnem obdobju od 25 do 64 let. Ženske bolnice so bile starejše, saj jih je bilo največ v starostni skupini nad 65 let. Bolezen se je v tem obdobju pri otrocih zelo redko pojavljala, večinoma v okviru mikroepidemij znotraj družin. Najpogosteje so bolniki zbolevali zaradi pljučne TB (70 % med vsemi bolniki s TB), med zunajpljučnimi oblikami sta bili najpogostejši obliki tuberkulozni plevritis in TB bezgavk. Pri bolnikih so bili najpogostejši dejavniki tveganja za razvoj TB priseljenost iz držav z višjo incidenco TB ali prekomerno uživanje alkohola. Vsako leto ugotovimo nekaj bolnikov pri pregledih kontaktov, tako da je pregledovanje in testiranje oseb, ki so bile v stiku z bolniki s TB, eden od pomembnih ukrepov za nadzor okužbe. Za razliko od drugih držav z nizko incidenco TB smo imeli v zadnjem desetletju relativno malo bolnikov, ki so bili odvisni od i.v. drog ali so bili okuženi z virusom HIV, prav tako smo imeli malo primerov TB med brezdomci, zaporniki in begunci *(3)*.

Redno nadziramo pojav odpornosti proti protituberkuloznim zdravilom, poleg tega smo s stalnim nadzorom nad preskrbo s protituberkuloznimi zdravili ter izvajanjem neposredno opazovanega zdravljenja (angl. *Directly Observed Treatment*, DOT) preprečili pojavljanje sekundarne odpornosti. V zadnjih desetih letih smo obravnavali 7 bolnikov (0,3 % vseh bolnikov), okuženih z večkratno odpornimi sevi (MDR-TB), zadnjega bolnika leta 2009 *(2, 4, 5)*.

Slovenija sodi med države, ki imajo najvišji delež bakteriološko potrjene bolezni *(2, 3)*. V zadnjih letih smo ob rednem sodelovanju in izobraževanju specialistov drugih strok dosegli tudi višji delež bakteriološko potrjenih zunajpljučnih oblik TB.

Zdravljenje uspešno zaključi večina bolnikov s TB. Umrljivost bolnikov s TB je v zadnjih desetih letih znašala 14 %, večina bolnikov je preminula zaradi druge bolezni, ki je povzročila reaktivacijo TB okužbe. Najpogosteje so bolniki s TB umrli zaradi srčnožilnih obolenj, obolenj dihal ali novotvorb *(4)*.

Kljub stalnemu upadu pojava TB v državi, je potrebno nenehno in skrbno izvajanje vseh ukrepov za preprečevanje

širjenja okužbe z *M. tuberculosis*, pravočasno odkrivanje novih primerov bolezni, pravilno zdravljenje bolnikov v zato ustrezno usposobljenih in opremljenih ustanovah, kjer se izvajajo vsi ukrepi aerogene izolacije, redno prijavljanje in spremljanje širjenja bolezni in ugotavljanje ter zamejevanje mikroepidemij, nemotena preskrba s protituberkuloznimi zdravili in preprečevanje pojava odpornosti proti zdravilom ter redno izobraževanje zdravstvenih in laboratorijskih delavcev. V zadnjih desetih letih smo pričeli z aktivnim ugotavljanjem in zdravljenjem latentne tuberkulozne okužbe (LTBO) v ogroženih skupinah prebivalstva. Za izvajanje vseh teh nalog so odgovorni Nacionalni program za tuberkulozo, Nacionalni referenčni laboratorij za mikobakterije in Register za tuberkulozo ter vsi zdravstveni in laboratorijski delavci, ki sodelujejo pri obravnavi bolnikov s tuberkulozo ali skrbijo za zdravstveno stanje oseb iz ogroženih skupin prebivalstva *(5)*.

Testiranje zdravstvenih in laboratorijskih delavcev

V zdravstvenih ustanovah, kjer obravnavajo bolnike, pri katerih obstaja možnost TB, in/ali se zdravijo bolniki s TB, je možen prenos okužbe z *Mycobacterium tuberculosis complex* (MT) na druge bolnike ali na zaposlene (zdravstvene, laboratorijske in druge delavce v zdravstveni ustanovi). Zdravstveni delavci se vse redkeje srečujemo s TB, zato ostane bolezen večkrat prezrta in se diagnoza postavi pozno. Ob tem prihaja do nezaščitenih stikov zdravih oseb z bolniki s kužno obliko TB in s tem do povečane verjetnosti za prenos okužbe na izpostavljene zdravstvene delavce. Vsako leto v Sloveniji za TB zboli nekaj zdravstvenih in laboratorijskih delavcev. Zaradi zakasnele postavitve diagnoze TB pri bolnikih in posledično kasne napotitve kužnih TB-bolnikov na zdravljenje v ustrezno ustanovo, ugotavljamo v zadnjih letih porast nezaščitenih stikov zdravstvenih delavcev s kužnimi bolniki s TB.

V zdravstveni ustanovi je tveganje za prenos okužbe z MT na druge bolnike in/ali zaposlene odvisno od ustanove in oddelka, od skupine zdravstvenih in laboratorijskih delavcev, od prevalence tuberkuloze v okolici, od populacije bolnikov v zdravstveni ustanovi, od učinkovitosti in obsega ukrepov za preprečevanje prenosa okužbe, od hitrosti postavitve diagnoze tuberkuloze pri bolniku, od hitrosti začetka aerogene izolacije in od upoštevanja uporabe respiratorne zaščite *(5–8)*.

Najpomembnejši cilji učinkovitega preprečevanja prenosa okužbe z MT v zdravstvenih ustanovah so zgodnje odkrivanje bolnikov, izvajanje ukrepov osamitve, ustrezno zdravljenje kužnih bolnikov in stalen nadzor nad zdravstvenim stanjem zaposlenih.

Za dosego zgoraj naštetih ciljev so potrebni ukrepi, ki so urejeni hierarhično na treh nivojih:

- administrativni ukrepi,
- tehnični ukrepi in
- uporaba osebnih zaščitnih sredstev.

Najpomembnejši ukrepi so administrativni ukrepi, v sklop katerih sodi ocena tveganja in izdelava ustreznih pisnih protokolov na podlagi ocene tveganja, implementacija in izvedba učinkovitih delovnih navad in postopkov, izobraževanje, treningi in svetovanje zdravstvenih delavcem glede TB, pregledovanje zdravstvenih delavcev na okužbo z MT in na samo bolezen.

S tehnološkimi ukrepi, kot so lokalna ventilacija navzven, HEPA filtri, usmerjen tok zraka (angl. *directional flow*) preprečujemo širjenje kužnega aerosola ter znižujemo koncentracijo kužnih delcev v prostoru. Izvajamo jih v prostorih, kjer se nahajajo TB-bolniki ali kužnine TB-bolnikov.

Uporaba osebnih zaščitnih sredstev je zadnji ukrep v hierarhiji zaščitnih ukrepov pred okužbo z MT pri zdravstvenih in laboratorijskih delavcih. Posebne obrazne maske (zaščitni respiratorji), ki jih uporabljamo, morajo zagotavljati filtriranje 95 % vseh delcev velikosti enega mikrona in več ter morajo imeti manj kot 10 % uhajanja zračnega toka ob stiku maske z obrazom. Zdravstveni in laboratorijski delavci so dolžni uporabljati osebno respiratorno zaščito v okoliščinah, kjer lahko pride do izpostavljenosti MT (vedno ko so v stiku s kužnim TB-bolnikom ali z bolnikom s sumom na TB – izolacijske sobe, med preiskavami, pri indukciji izmečka, pri intubaciji, ob respiratorni fizioterapiji, pri spremljanju bolnikov na preiskave, pri aspiraciji dihal, pri obdukciji, pri delu z kužninami v laboratoriju) ter v prostorih, kjer se izvajajo postopki, pri katerih se tvori kužni aerosol, in v drugih izbranih okoljih glede na oceno tveganja (npr. prostori za indukcijo izmečka, prostori, kjer se zadržujejo TB-bolniki, ipd). Zaščitne respiratorje moramo pravilno uporabljati ves čas izpostavljenosti kužnemu aerosolu, nameščeni morajo biti pravilno. Na koncu izmene jih moramo zavreči. Zdravstvene in laboratorijske delavce moramo poučiti o pravilni uporabi zaščitnih respiratorjev in občasno moramo preveriti pravilnost namestitve in tesnjenja *(7–9)*.

Postopki za dosego ciljev učinkovitega preprečevanja prenosa okužbe z MT v zdravstvenih ustanovah so:

- Zgodnja detekcija in diagnostika pri sumu na TB (anamneza, klinični pregled bolnika in pravilen odvzem ustreznih kužnin).
- Pravilna ambulantna obravnava bolnikov s sumom na TB ali s kužno obliko TB.
- Pravilna hospitalna obravnava bolnikov s sumom na TB ali s kužno TB.
- Pravilna uporaba sredstev za osebno zaščitno (osebni respirator).
- Pravilna uporaba kirurške maske bolnikov s sumom na TB ali s kužno TB.
- Pravilno izvajanje preiskav pri bolnikih s sumom na TB ali s kužno TB.
- Zdravljenje bolnikov s TB (aerogena izolacija – ustrezni oddelki, kjer se izvajajo vsi administrativni in tehnološki ukrepi, uporaba osebnih zaščitnih sredstev – osebni respirator).
- Stalen nadzor nad zdravstvenim stanjem osebja.

Nadzor nad zdravstvenim stanjem osebja moramo izvajati neprestano. V zdravstvenih ustanovah, kjer obstaja možnost, da bodo zdravstveni in/ali laboratorijski delavci izpostavljeni MT, je zaželeno da ti pred zaposlitvijo opravijo testiranje na LTBO. V preteklosti se je uporabljal kožni tuberkulinski test, danes pa ga vse bolj nadomešča gamainterferonski test (QuantiFERON®-TB Gold test). Ta test je bolj specifičen in senzitiven ter zato bolj primeren za izvajanje serijskega testiranja zdravstvenih in laboratorijskih delavcev. Poleg tega naj zdravstveni in laboratorijski delavci opravijo rentgenogram prsnih organov in izpolnijo usmerjen vprašalnik glede TB.

Vsaka zdravstvena ustanova je dolžna pripraviti oceno tveganja za ambulante, bolnišnične oddelke in laboratorije ter na osnovi ocene tveganja pripraviti ustrezne pisne protokole za pregledovanje zaposlenih na okužbo z MT in na samo bolezen. Prav tako naj bi zdravstvena ustanova zagotovila preglede in testiranje bodočim zaposlenim pred začetkom dela, testiranje zaposlenih ob nezaščitenih stikih s kužnimi bolniki s TB in glede na oceno tveganja tudi serijska testiranja. Nadzor nad rednim izvajanjem testiranja zaposlenih naj vrši Komisija za preprečevanje bolnišničnih okužb oz. oseba, ki je zadolžena za nadzor nad preprečevanjem

okužb v zdravstveni ustanovi. Pregledi in testiranja naj se izvajajo pri specialistih pulmologih ali pri specialistih internistih z dodatnimi znanji iz TB. Rezultati testiranj, morebitni dejavniki tveganja za okužbo z MT in sama okuženost morajo biti zabeleženi v zdravstveni dokumentaciji vsakega zaposlenega v zdravstveni ustanovi. Kadar je ugotovljena LTBO oz. konverzija pri testiranju in kadar obstaja sum na TB, mora zaposlenega obravnavati specialist pulmolog oz. internist z dodatnim znanjem iz TB. Potrebno je izključiti aktivno TB in zaposlenemu ponuditi zdravljenje LTBO in spremljanje morebitnega pojava simptomov aktivne bolezni *(5–10)*.

ZAKLJUČEK

Tuberkuloza je pogosta nalezljiva bolezen. Letna incidenca primerov tuberkuloze v Sloveniji že nekaj let upada. Ob upadanju TB v Sloveniji se zdravstveni delavci vse redkeje srečujemo s to boleznijo, zato jo tudi večkrat prezremo in lahko pride do neželenega prenosa okužbe z MT znotraj zdravstvenih ustanov.

S hitrejšim in učinkovitejšim odkrivanjem in zdravljenjem novih primerov TB, s še doslednejšim ugotavljanjem in zdravljenjem LTBO, z rednim izobraževanjem zdravstvenih in laboratorijskih delavcev ter z upoštevanjem in izvajanjem ukrepov za preprečevanje prenosa okužb v zdravstvenih ustanovah bomo zmanjšali verjetnost tuberkuloze pri zdravstvenih delavcih.

LITERATURA

1. WHO. Global tuberculosis report 2015 [internet]. Geneva: World Health Organization; 2015 [citirano 2016 Sep 1]. Dosegljivo na: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf?ua=1
2. Klinika Golnik. Register za tuberkulozo.
3. ECDC/WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance in Europe 2015 [internet]. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2015 [citirano 2016 Sep 1]. Dosegljivo na: http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/tuberculosis-surveillance-monitoring-Europe-2015.pdf
4. Svetina P. Tuberkuloza v Sloveniji v letih od 2002 do 2013. In: Fležar M, Marčun R, Svetina P. 20. Slovenski in 1. mednarodni posvet o obravnavi in spremljanju bolnikov s tuberkulozo (TB). 2015 Mar 20; Golnik: Klinika Golnik. p. 6–9.
5. Klinika Golnik. Nacionalni program za tuberkulozo RS [internet]. 2015 [citirano 2016 Sep 1]. Dosegljivo na: http://www.klinika-golnik.si/uploads/klinika-golnik-files/program_obvladovanja_tb.pdf
6. Svetina Sorli P. Tuberkuloza med zdravstvenimi delavci. In: Fras Z, Poredoš P. Tavčarjevi dnevi. 2012 Nov 8–10; Ljubljana.
7. CDC. MMWR: Guidelines for the investigation of contacts of persons with infectious tuberculosis; Guidelines for using QuantiFERON®-TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection, United states [internet]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention. 2005 [citirano 2016 Sep 1]. Dosegljivo na: http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/rr/rr5415.pdf
8. Williams G, Alarcon E, Jittimanee S et al. Best practice for the care of patients with tuberculosis. A Guide for Low-Income Countries [internet]. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. 2007 [citirano 2016 Sep 1]. Dosegljivo na: http://www.cetl.org.uk/learning/tb/documents/best_practice_guide_en.pdf
9. Niemhaus S, Schablon A, Bacle CL, et al. Evaluation of the inetrferon-gamma release assay in healthcare workers. Int Arch Occup Environ Health. 2007; 81 (3): 295–300.
10. Priporočila za obravnavo bolnikov s TB in bolnikov s sumom na TB. In: Košnik M. 16. redni posvet o obravnavi in spremljanju bolnikov s tuberkulozo v Sloveniji. 2011 Mar 24; Golnik: Klinika Golnik.

Manca Žolnir - Dovč[1], Irma Perko[2], Eva Sodja[3]

Posebnosti in novosti v laboratorijski diagnostiki aktivne tuberkuloze in mikobakterioz v Sloveniji

Special Features and Novelties of Laboratory Diagnostics of Active Tuberculosis and Mycobacteriosis in Slovenia

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: tuberkuloza, mikobakterioza, netuberkulozne mikobakterije, laboratorijska diagnostika, limfadenitis, cistična fibroza

IZHODIŠČA. Laboratorijska diagnostika mikobakterij ima še vedno pomembno vlogo tako v diagnostiki tuberkuloze kakor tudi ostalih mikobakterioz. Sum na te bolezni je zanesljivo potrjen samo ob osamitvi mikobakterij iz kužnin bolnika z ustrezno klinično sliko. Za zdaj samo osamitev bacilov tuberkuloze na gojiščih omogoča ločevanje med živimi in mrtvimi bacili. METODE. V prispevku smo analizirali laboratorijsko diagnostiko mikobakterij v Sloveniji v obdobju 2000–2015 in prikazali novosti, ki smo jih zaznali pri vsakdanjem rutinskem delu. REZULTATI. V letu 2000 je opravljalo laboratorijsko diagnostiko tuberkuloze in ostalih mikobakterioz v Sloveniji sedem laboratorijev. Njihovo število se je postopno zmanjševalo in v letu 2016 to opravljata le še dva laboratorija. Ob upadu števila tuberkuloznih bolnikov smo opazili naraščanje bolnikov z mikobakteriozami, ki jih povzročajo netuberkulozne mikobakterije. Vzrokov za to je več – eden od njih je pojav limfadenitisov pri otrocih, mlajših od pet let, kar smo po podatkih iz literature pričakovali. Najpogosteje osamljena mikobakterija iz kužnin človeka je bila *Mycobacterium xenopi*. Mikobakterije iz sklopa *Mycobacterium avium* pa so bile največkrat klinično pomembne zadnjih 16 let v Sloveniji. ZAKLJUČKI. Klinična slika tuberkuloze in mikobakterioze, kakor tudi laboratorijska diagnostika, sta si precej podobni. Glavni razliki pa sta v pogostosti odvzema kužnin in temperaturi, na kateri rastejo nekatere netuberkulozne mikobakterije. Limfadenitisi, povzročeni z netuberkuloznimi mikobakterijami pri otrocih, ki niso bili cepljeni s cepivom proti tuberkulozi, in vse pogostejše mikobakterioze pri bolnikih s cistično fibrozo so v naši državi glavne novosti, ki jih še pred 11 leti nismo poznali.

[1] Dr. Manca Žolnir - Dovč, univ. dipl. biol., Laboratorij za mikobakterije, Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik 36, 4204 Golnik; manca.zolnir@klinika-golnik.si

[2] Irma Perko, dipl. inž. lab. biomed., Laboratorij za mikobakterije, Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik 36, 4204 Golnik

[3] Dr. Eva Sodja, univ. dipl. mikr., Laboratorij za mikobakterije, Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik 36, 4204 Golnik

ABSTRACT

KEY WORDS: tuberculosis, mycobacteriosis, nontuberculous mycobacteria, laboratory diagnostics, lymphadenitis, cystic fibrosis

BACKGROUNDS. Laboratory diagnostics of mycobacteria still play a very important role in the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacteriosis. The suspicion of these two diseases is reliably confirmed only by the isolation of mycobacteria in a patient with clinical signs of these diseases. At present, only culture-based methods distinguish between live and dead bacilli. METHODS. We analyzed the laboratory diagnosis of mycobacteria in Slovenia in the period between 2000 and 2015. We also describe the novelties which we have noticed at our daily routine work. RESULTS. In the year 2000, seven laboratories performed laboratory diagnosis of mycobacteria in Slovenia. Their number has gradually decreased; in 2016 the diagnosis is performed only by two laboratories. With the decreasing number of tuberculosis patients in recent years, we observed an increase of patients with mycobacteriosis caused by nontuberculous mycobacteria. There are many reasons for this; one of them, expected based on the reports in the literature, incidence of nontuberculous lymphadenitis in children younger than five years. *Mycobacterium xenopi* was the most frequently isolated nontuberculous mycobacteria and *Mycobacterium avium* the most common disease-causing mycobacteria in Slovenia during the last 16 years. CONCLUSIONS. Clinical features of tuberculosis and mycobacteriosis, as well as laboratory diagnostics, are quite similar. However, the main differences are in the frequency of specimen collection and in the temperature at which some of nontuberculous mycobacteria are growing. Lymphadenitis caused by nontuberculous mycobacteria in children and increasing mycobacteriosis in patients with cystic fibrosis are two novelties in Slovenia, which were unknown 11 years ago.

IZHODIŠČA

Mikobakterije (rod *Mycobacterium*) kot povzročitelji bolezni spremljajo človeštvo že tisočletja. O tem pričajo mumije iz starega Egipta, pri katerih so s sodobnimi molekularno-biološkimi metodami dokazali bacile tuberkuloze (TB). Sicer pa je bil Robert Koch prvi, ki je leta 1882 odkril povzročitelja TB, to je bacil *Mycobacterium tuberculosis* (MT). TB je bila in še vedno je najpogostejša in najbolj nevarna bolezen, ki jo povzročajo mikobakterije. Pogosta je predvsem v slabše razvitih državah sveta. V zadnjih letih pa je vendarle zaznati počasen upad bolezni, saj se od leta 2000 v svetu incidenca postopno znižuje z 18 % povprečno stopnjo upada *(1)*. Slovenija od leta 2000 spada med države z nizko incidenco bolezni, kar pomeni, da je bila v letu 2000 incidenca prvič nižja od 20, to je 19,09/100.000 (380 na novo registriranih bolnikov). V lanskem letu (2015) je bila incidenca še nižja (6,30/100.000 prebivalcev) *(2)*.

Druga, stara in še vedno endemična, mikobakterijska bolezen je lepra, ki jo povzročajo bacili *Mycobacterium leprae* in je še vedno prisotna v nekaterih toplejših delih sveta, kot je Brazilija. V zadnjih dveh desetletjih predstavljajo v svetu vedno večji zdravstveni problem preostale mikobakterije, to so t. i. netuberkulozne mikobakterije (NTM), kamor štejemo vse druge mikobakterije razen deset vrst iz sklopa *M. tuberculosis* (angl. *M. tuberculosis complex*, MTc) in vrste *M. leprae*. Vse vrste NTM so pogojno patogene, med njimi izstopa najmanj 25 vrst mikobakterij, ki so v svetu pogosteje povezane z bolez-

nimi pri ljudeh. Obolenja, ki jih povzročajo, imenujemo mikobakterioze, ki v svetu naraščajo iz različnih razlogov *(3, 4)*. Če je vir TB največkrat neodkrit in/ali nezdravljen bolnik s pljučno obliko bolezni, pa je vir okužbe z NTM v večini primerov okolje. NTM se namreč nahajajo povsod okoli nas. Najpogosteje jih najdemo v vodi, zemlji in biofilmih, kjer sodelujejo pri kroženju snovi v naravi. Iz teh virov se verjetno okuži tudi človek, ki ima v večini primerov kakšno predhodno obolenje ali okrnjeno imunost. V manjšem številu lahko zbolijo tudi povsem zdravi ljudje, brez znanih dejavnikov tveganja *(4, 5)*.

Laboratorijska diagnostika mikobakterij ima še vedno pomembno vlogo tako v diagnostiki TB kakor tudi ostalih mikobakterioz. Sum na TB ali mikobakteriozo je zanesljivo potrjen samo ob osamitvi bacilov TB/NTM iz kužnin bolnika z ustrezno klinično sliko. Trenutno samo kultivacija namreč loči med živimi in mrtvimi bacili. Molekularne metode zaradi nižje občutljivosti niso zamenjale niti kultivacije niti testov občutljivosti mikobakterij, so pa pomembno pripomogle k hitrejši diagnostiki in predvsem identifikaciji mikobakterij *(6)*.

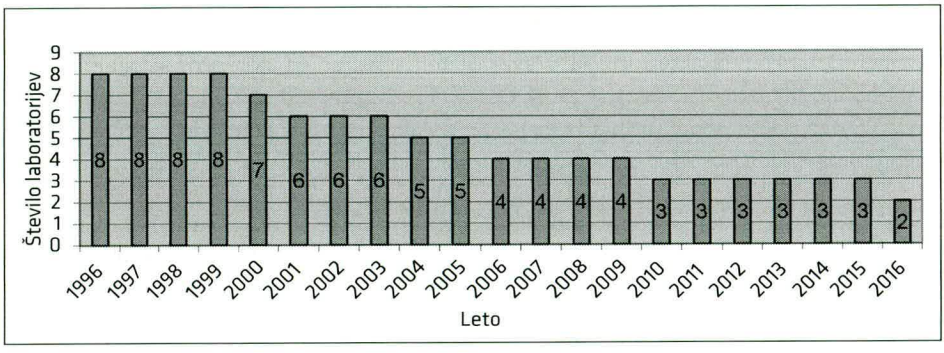
Namen našega prispevka je analizirati laboratorijsko diagnostiko mikobakterij v Sloveniji v obdobju 2000–2015, prikazati nekatere spremembe in novosti, ki so se dogodile v tem obdobju v naši državi ter opozoriti na možnosti za izboljšanje v prihodnosti.

METODE

Laboratorijsko diagnostiko TB in NTM je v Sloveniji v letu 2000 izvajalo sedem laboratorijev, ki so z leti in upadom incidence TB postopoma opustili tovrstno delo, tako da v letu 2016 to diagnostiko opravljata le še Laboratorij za mikobakterije Nacionalnega laboratorija za zdravje okolje in hrano v Mariboru in Laboratorij za mikobakterije Klinike Golnik (slika 1). Vsi laboratoriji v preteklosti in oba laboratorija, ki izvajata diagnostiko TB in NTM še danes, so oz. še vedno izvajajo mikroskopski pregled kužnin in kultivacijo (zasajanje kužnin na različna gojišča). Oba sedanja laboratorija že najmanj dve desetletji uporabljata tudi molekularne teste za čim hitrejše odkrivanje bolnikov z aktivno TB. Ves čas pa (so) laboratoriji pošiljali vse izolate mikobakterij (TB in NTM) za identifikacijo in/ali testiranje občutljivosti v Laboratorij za mikobakterije Klinike Golnik. Po mednarodnih priporočilih dela mora vsak laboratorij identificirati vsako mikobakterijo, ki poraste na gojiščih *(7)*. Na ta način smo v Laboratoriju za mikobakterije že zelo zgodaj začeli z beleženjem podatkov o bolnikih s TB v celotni državi, kakor tudi z zbiranjem vseh podatkov o NTM v Sloveniji. Register za NTM v Sloveniji ne obstaja, zato imamo v Laboratoriju za mikobakterije Golnik še največ podatkov o spremembah, ki se dogajajo na področju NTM. Vsa leta beležimo število NTM in pripravljamo letna poročila, ki so služila kot izhodišče za to analizo. Pri delu smo si pomagali tudi z vprašalniki o laboratorijski diagnostiki, ki jih vse od leta 2000 dalje pošiljamo v vse laboratorije v državi.

REZULTATI

V naši državi smo v letu 1996 prenovili Nacionalni program za TB. Sledilo je pospešeno upadanje incidence TB ter postopno zmanjševanje števila laboratorijev, ki so opravljali diagnostiko v državi (slika 1). Tako se je v zadnjih 17 letih število laboratorijev zmanjšalo z osem na dva v letošnjem letu. Oba opravljata mikroskopski pregled, teste pomnoževanja nukleinskih kislin in kultivacijo, medtem ko teste občutljivosti, identifikacijo mikobakterij in molekularno genotipizacijo bacilov TB izvaja le naš Laboratorij za mikobakterije Klinike za pljučne bolezni in alergije Golnik, ki opravlja tudi vse druge naloge nacionalnega referenčnega laboratorija v državi.



Slika 1. Zmanjševanje števila laboratorijev, ki opravljajo laboratorijsko diagnostiko tuberkuloze in ostalih mikobakterioz v Sloveniji med leti 1996 in 2016, ko smo začeli s prenovo Nacionalnega programa za tuberkulozo.

Ena izmed nalog Laboratorija za mikobakterije Golnik je tudi nadzor in letno spremljanje preiskav in vseh sprememb v laboratorijski diagnostiki mikobakterij v državi. Iz priložene tabele je razvidno (tabela 1), da se je z upadom incidence TB počasi zmanjševalo tudi število kužnin, ki smo jih dobili za laboratorijsko diagnostiko. Najnižjo točko je doseglo v letu 2008, ko je bilo za diagnostiko poslanih 11.566 kužnin. Po tem letu število ni več padalo, kar pomeni, da so zdravniki kljub upa-

Tabela 1. Laboratorijska diagnostika in osamitev mikobakterij iz kužnin bolnikov v Sloveniji v obdobju 2000–2014. MTc – mikobakterije iz sklopa *Mycobacterium tuberculosis* (angl. *M. tuberculosis complex*), NTM – netuberkulozne mikobakterije.

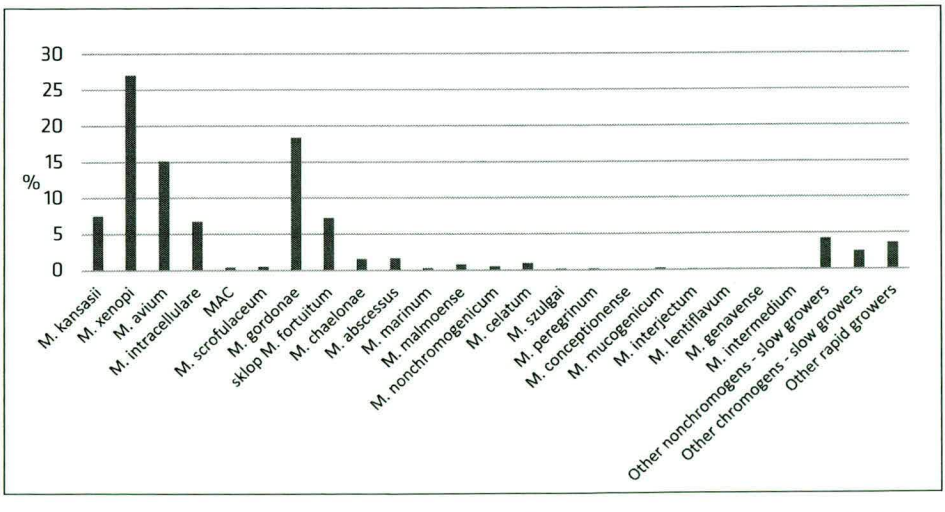
Leto	Število poslanih kužnin	Izolati MTc		Izolati NTM		Razmerje NTM/MTc
		Število	%	Število	%	
2000	17.016	1.605	9,43	180	1,28	0,11
2001	17.518	1.298	7,40	182	1,03	0,14
2002	16.062	1.178	7,45	170	1,06	0,14
2003	15.236	1.132	7,43	213	1,40	0,19
2004	12.268	1.027	8,37	136	1,11	0,13
2005	11.556	923	7,99	211	1,83	0,23
2006	11.753	852	7,20	207	1,76	0,24
2007	11.995	874	7,29	182	1,52	0,21
2008	11.566	889	7,68	178	1,54	0,20
2009	11.855	818	6,89	299	2,52	0,37
2010	11.919	772	6,48	282	2,37	0,37
2011	11.999	787	6,59	321	2,68	0,41
2012	11.388	526	4,62	316	2,04	0,44
2013	12.374	562	4,54	401	3,86	0,71
2014	12.186	507	4,16	384	3,15	0,76
Skupaj	196.691	13.750	6,99	3.662	1,86	0,27

du TB še vedno razmišljali o možnosti aktivne TB ali ostalih mikobakterioz. Med izolati mikobakterij iz MTc prevladujejo z več kot 99,9 % bacili MT (8). Število kužnin, iz katerih so porasli bacili TB, se je v 16 letih postopno zmanjšalo. Če je bil v letu 2000 MT pozitiven skoraj vsak deseti vzorec, ki smo ga dobili v laboratorij, danes porastejo bacili TB le iz približno 4 % vzorcev. Nasprotno pa se z leti počasi povečuje delež NTM-izolatov (tabela 1). Še večje razlike pa opazimo pri računanju razmerja med številom NTM in bacili iz MTc, ki se je v zadnjih 16 letih precej povečal (iz 0,11 v letu 2000 na 0,76 v letu 2014) (tabela 1).

NTM smo iz kužnin človeka izolirali relativno redko, to je v Sloveniji v manj kot 2 % (tabela 1). Po oceni in izkušnjah Laboratorija za mikobakterije Golnik se za katerokoli obliko NTM letno zdravi med 15 in 30 bolnikov.

V 16-letnem obdobju 2000–2015 smo v Sloveniji iz kužnin bolnikov največkrat osamili naslednje vrste NTM: *M. xenopi* (27,06 %), *M. gordonae* (18,36 %), *M. avium* (15,12 %), *M. kansasii* (7,52 %) in *M. intracellulare* (6,74 %). Vse ostale vrste mikobakterij smo izolirali še redkeje (slika 2).

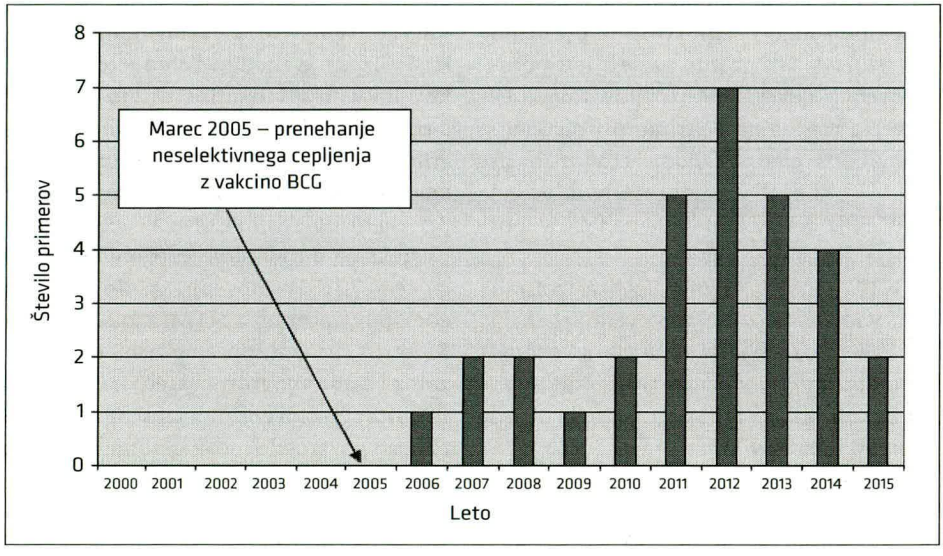
Po podatkih Laboratorija za mikobakterije Klinike Golnik v obdobju 2000–2005 v Sloveniji nismo osamili nobene NTM iz vratnih bezgavk pri otrocih (slika 3). V letu 2006 smo prvi tovrstni primer dokazali pri deklici, rojeni 6. 7. 2005 z osamitvijo bacilov *M. avium* na gojiščih (slika 3). To se je zgodilo dobro leto po tem, ko smo v državi ukinili obvezno cepljenje s cepivom BCG (lat. *Bacillus Calmette-Guerin*) proti tuberkulozi. V naslednjih letih smo bezgavčne mikobakterioze dokazali pri enem do sedmih otrocih letno (slika 3). Tako je od ukinitve cepljenja do konca leta 2015 v Sloveniji za limfadenitisom, povzročenim z NTM, zbolelo skupaj 33 otrok, pri katerih smo obolenje dokazali z osamitvijo mikobakterij na gojiščih. Pri 87,88 % slovenskih otrok so mikobakteriozo povzročile mikobakterije iz sklopa *M. avium* (v 24 primerih *M. avium* in v 5 primerih *M. intracellulare*) in samo v štirih primerih ostale NTM (slika 4). Od 33 obolelih otrok je bilo 20 deklic (60,61 %) in 13 dečkov (39,39 %).



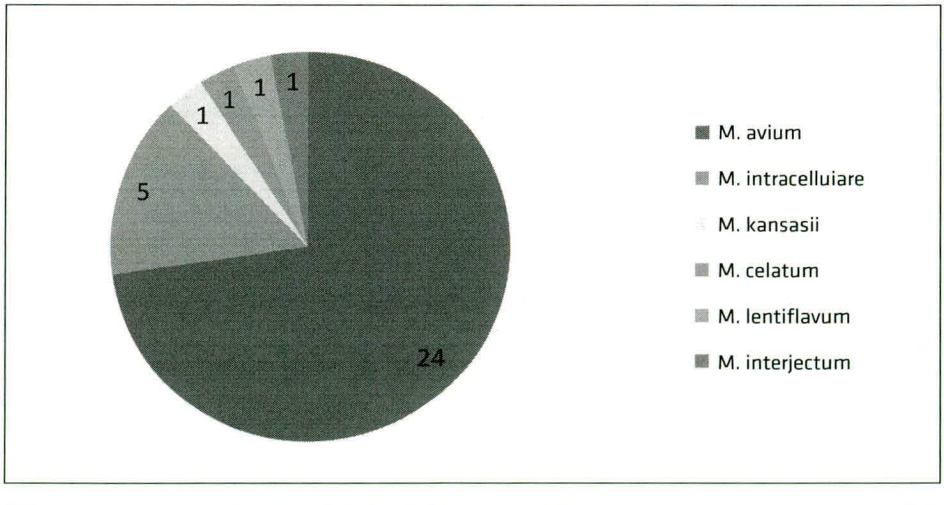
Slika 2. Deleži najpogosteje izoliranih vrst netuberkuloznih mikobakterij, izoliranih iz kužnin bolnikov v Sloveniji v obdobju 2000–2015.

RAZPRAVA

V Sloveniji smo v letu 1996 začeli s prenovo Nacionalnega programa za TB (NPTB), kar je pomenilo, da smo začeli s sistematičnim delom za znižanje pogostosti TB. Bolnišnica Golnik je postala centralna ustanova za izvajanje vseh nalog NPTB. Aktivno delo na področju TB je pripeljalo k hitrejšemu izboljšanju diagnostike in zdravljenja aktivne in latentne TB ter k pospešenemu upadu TB v Sloveniji. Vzporedno s prenovo NPTB je potekala



Slika 3. Porast bezgavčnih mikobakterioz, povzročenih z netuberkuloznimi mikobakterijami, pri otrocih v Sloveniji po ukinitvi obveznega cepljenja s cepivom BCG. (lat. *Bacillus Calmette-Guerin*).



Slika 4. Vrste netuberkuloznih mikobakterij, ki so po ukinitvi obveznega cepljenja s cepivom BCG (lat. *Bacillus Calmette-Guerin*) povzročile bezgavčno mikobakteriozo pri 33 slovenskih otrocih.

tudi prenova laboratorijske službe za potrebe diagnostike mikobakterij v Sloveniji, ki so ji sledili tudi redni letni sestanki. Med spremembami, ki smo jih takrat uvedli v laboratorijih za mikobakterije po državi, velja izpostaviti predvsem:

- velik poudarek na zadostni količini in kakovostni kužnini,
- ustrezno hranjenje in transport kužnin do laboratorija,
- hitri in čim bolj občutljivi laboratorijski testi (poleg trdih gojišč obvezno zasajanje vseh kužnin tudi na tekoča po možnosti avtomatizirana gojišča),
- obvezna identifikacija vseh mikobakterij, ki porastejo na gojiščih,
- obvezno testiranje občutljivosti pri vsakem na novo odkritem ali na novo registriranem bolniku z aktivno TB in
- vzpostavitev sistema kakovosti in obvezno poročanje laboratorijev vseh na novo odkritih bolnikov Registru za TB Golnik.

Posledica je bila povečanje deleža mikrobiološko dokazane TB v državi, kar je našo državo pripeljalo v sam vrh držav z največ bakteriološko dokazanimi primeri TB v svetu *(9)*.

Osnova vsake laboratorijske diagnostike je kakovostna kužnina. Kljub temu, da sta si laboratorijski diagnostiki TB in NTM mikobakterioz v številnih točkah podobni, pa obstajajo med njima tudi razlike. Najpomembnejša razlika je v vzorčenju, in sicer v pogostosti odvzema kužnin. Če za diagnostiko pljučne TB velja, da je potrebno dva- do trikrat odvzeti najmanj 3 ml kakovostnega izmečka v dveh do treh zaporednih dneh, pa je pri dokazovanju NTM pljučnih mikobakterioz potrebno odvzeti od dva do pet izmečkov ali tri do pet ostalih kužnin in to nikakor ne v zaporednih dnevih *(10)*. Razmik med dvema vzorcema naj bo praviloma vsaj teden dni (izjema so kužnine iz primarno sterilnih mest), saj na ta način lažje interpretiramo morebiten porast NTM-bakterij in lažje razlikujemo med kolonizacijo bolnika in klinično pomembnim izolatom. NTM so namreč le pogojno patogene bakterije, zato morajo biti izolirane iz primarno nesterilnih mest bolnika večkrat ali pa s čim večjim številom kolonij. Kadar so kužnine mikroskopsko pozitivne in/ali na gojiščih poraste veliko število kolonij NTM, je večja verjetnost za njen klinični pomen. Seveda pa mora rezultat osamitve mikobakterij interpretirati šele zdravnik, ki zdravi in pozna bolnika *(11)*.

Iz številnih držav sveta prihajajo vse pogostejša opozorila o porastu NTM, kakor tudi o porastu bolnikov s klinično pomembnimi mikobakteriozami. Podobno opažamo v Sloveniji, kjer ocenjujemo, da se v zadnjih letih za mikobakteriozo zdravi med 25 in 30 bolnikov na leto (prevalenca). Mikobakterioze, povzročene z NTM, namreč niso nalezljive, in zato za takšne bolnike nimamo registra in preglednih podatkov. Prav zato imamo v Laboratoriju za mikobakterije Golnik še najboljše podatke o teh obolenjih, saj opravljamo laboratorijsko diagnostiko mikobakterioz za celotno Slovenijo, tako za otroke kot odrasle osebe, in za zelo različne veje medicine.

Eden od razlogov za povečanje mikobakterioz v Sloveniji v zadnjih 11 letih je ukinitev obveznega cepljenja otrok s cepivom BCG. Že pred nami so podobno ukinili neselektivno BCG-vakcinacijo v številnih državah, med drugimi na Švedskem v letu 1975 in v predelu Češke leta 1986 *(12, 13)*. V obeh državah so po ukinitvi zaznali porast mikobakterioz pri majhnih otrocih in še posebno obolenje vratnih bezgavk pri otrocih, mlajših od pet let. Glede na objave v literaturi povzročajo otroške limfadenitise v svetu največkrat mikobakterije iz sklopa *M. avium*, tako kot je pokazala tudi analiza naših podatkov. V severnoevropskih državah ji pogosto sledi *M. malmoense*, ki jo v Sloveniji redko izoliramo iz kužnin človeka in je v večini prime-

rov klinično pomembna *(11)*. Zanimivo je, da pri nas najpogosteje osamljena bakterija *M. xenopi* ni povzročila niti enega primera bezgavčne mikobakterioze v 11-letnem obdobju.

Druga skupina ljudi, pri katerih v zadnjih letih opažamo porast NTM-mikobakterioz so bolniki s cistično fibrozo (CF) *(14, 15)*. Za te bolnike so nekatere vrste NTM zelo nevarne in rastejo samo na nižji temperaturi kot pri ostalih bolnikih. Prav zato je na napotnici bolnikov s CF potrebno označiti diagnozo bolnika kot CF, da njihove kužnine inkubiramo tako na 30 °C, kot tudi običajni 37 °C. Tudi med slovenskimi CF-bolniki smo v zadnjih letih osamili različne vrst NTM, med njimi najbolj znano in odporno bakterijo *M. abscessus* subsp. *abscessus*. Omenjena mikobakterija je bila v preteklosti relativno redko izolirana v naši državi, vendar je po podatkih Laboratorija za mikobakterije Golnik v večini primerov klinično pomembna. Do sedaj smo jo izolirali tudi pri treh bolnikih s CF (pri dveh otrocih iz Slovenije in pri 22-letnem fantu iz tujine). Vsem bolnikom, še posebno pa bolnikom s CF, močno poslabša kakovost življenja in je zanje lahko tudi usodna. Je precej odporna proti številnim zdravilom in prav zato uporabljamo tudi molekularne teste za določanje njene odpornosti proti makrolidom in aminoglikozidom. Ker se v svetu bolezni, povzročene z NTM, precej dlje in težje zdravijo kot TB, število protimikrobnih sredstev pa je omejeno, znanstveniki zadnja leta veliko proučujejo mehanizme sinergizma med zdravili, kar je novo upanje tudi za bolnike z mikobakteriozami *(16)*.

ZAKLJUČEK

V zadnjem desetletju se je laboratorijska diagnostika bolezni, ki jih povzročajo mikobakterije, precej izboljšala. Razlogov za to je več, po naši oceni pa najbolj izstopa eden. To je precej boljša kakovost kužnin, ki jih dobimo v laboratorij danes, kot tistih, ki smo jih dobili pred desetimi leti. V veliki meri je to posledica doslednega označevanja kužnin slabše kakovosti na izvidu, pa tudi stalnega izobraževanja zdravstvenih delavcev in boljšega sodelovanja med njimi in laboratorijskimi delavci. Dodatne možnosti za izboljšanje mikrobiološke diagnostike bolezni še obstajajo. Ena od njih je zelo enostavna, to je dodajanje diagnoze CF na napotnico, da bodo vse kužnine bolnikov s cistično fibrozo inkubirane na dveh različnih temperaturah.

LITERATURA

1. WHO. Global tuberculosis report, 2015 [internet]. Geneva: World Health Organization; 2015 [citirano 2016 Oct 10]. Dosegljivo na: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf
2. Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik. Register za tuberkulozo [internet]. Golnik: Klinika Golnik; 2015 [citirano 2016 Oct 10]. Dosegljivo na: http://www.klinika-golnik.si/dejavnost-bolnisnice/klinicna-dejavnost/tuberkuloza/register-za-tuberkulozo/datoteke/002_graf.pdf
3. Ryu YJ, Koh WJ, Daley CL. Diagnosis and Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease: Clinicians' Perspectives. Tuberc Respir Dis (Seoul). 2016; 79 (2): 74–84.
4. Van Ingen J. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. Semin Respir Crit Care Med. 2013; 34 (1): 103–9.
5. Lake MA, Ambrose LR, Lipman MCI, et al. "Why me, why now?" Using clinical immunology and epidemiology to explain who gets nontuberculous mycobacterial infection. BMC Med. 2016; 14: 54.
6. Žolnir-Dovč M, Bidovec U. Laboratorijska diagnostika in molekularna epidemiologija tuberkuloze. In: Beović B, Strle F, Tomažič J, eds. Okužbe pri starostnikih: novosti. Ljubljana: Sekcija za protimikrobno zdravljenje SZD; 2010. p. 197–203.
7. ECDC. Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union [internet]. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2016 [citirano 2016 Oct 10]. Dosegljivo na: http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/tuberculosis-laboratory-diagnostic-methods-eu.pdf
8. Pate M, Žolnir-Dovč M, Ocepek M. Tuberkuloza kot zoonoza: pomen in diagnostika. In: Petrovec M, ed. 4. Baničevi dnevi: Zoonoze; 2012 Nov 23–24; Radenci. Ljubljana: Medicinski razgledi. 2012, 51 Suppl 6: 119–25.
9. ECDC. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2016 [internet]. Stockholm: European Centre for Disease prevention and Control; 2016 [citirano 2016 Oct 10]. Dosegljivo na: http://ecdc.europa.eu/en/publications/_layouts/forms/Publication_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=1452
10. Žolnir-Dovč M. Navodila o odvzemu in pošiljanju kužnin za mikrobiološko diagnostiko pljučne in zunajpljučne tuberkuloze in ostalih mikobakterioz. In: 10. redni letni posvet o obravnavi in spremljanju bolnikov s tuberkulozo (TB) – zbornik prispevkov; 2005 Mar 18; Ljubljana. Ljubljana: Klinika Golnik. 2005; 1–4.
11. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med. 2007; 175 (7): 744–5.
12. Romanus V, Hallander HO, Wåhlén P, et al. Atypical mycobacteria in extrapulmonary disease among children. Incidence in Sweden from 1969 to 1990, related to changing BCG-vaccination coverage. Tuber Lung Dis. 1995; 76 (4): 300–10.
13. Trnka L, Danková D, Svandova E. Six years' experience with the discontinuation of BCG vaccination. 4. Protective effect of BCG vaccination against the Mycobacterium avium intracellulare complex. Tuber Lung Dis. 1994; 75 (5): 348–52.
14. Martiniano SL, Nick JA, Daley CL. Nontuberculous Mycobacterial Infections in Cystic Fibrosis. Clin Chest Med. 2016; 37 (1): 83–96.
15. Lee MR, Sheng WH, Hung CC, et al. Mycobacterium abscessus Complex Infections in Humans. Emerg Infect Dis. 2015; 21 (9): 1638–46.
16. Van Ingen J, Totten SE, Helstrom NK, et al. In vitro synergy between clofazimine and amikacin in treatment of nontuberculous mycobacterial disease. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56 (12): 6324–7.
17. Ferro BE, Meletiadis J, Wattenberg M, et al. Clofazimine Prevents the regrowth of Mycobacterium abscessus and Mycobacterium avium type strains exposed to amikacin and clarithromycin. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 60 (2): 1097–105.

Eva Sodja[1], Sandra Ažman[2], Manca Žolnir – Dovč[3]

Laboratorijska diagnostika latentne tuberkuloze – 11-letne izkušnje s testom QuantiFERON

Laboratory Diagnosis of Latent Tuberculosis–11-Years' Experience with QuantiFERON Testing

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: tuberkuloza, QuantiFERON, latentna tuberkuloza, diagnostika latentne tuberkuloze

Prepoznavanje posameznikov z latentno tuberkulozo je pomembno za nadzor tuberkuloze in preprečevanje njenega širjenja. Čeprav ti posamezniki ne kažejo znakov bolezni, pa pri njih obstaja možnost za izbruh bolezni zlasti v prvih nekaj letih po okužbi. V Laboratoriju za mikobakterije Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik za diagnostiko latentne tuberkuloze že več kot deset let uporabljamo test QuantiFERON (QFT). V prispevku predvsem poudarjamo pomen našega laboratorija, ki je s posrednim vplivom na številne predanalitske dejavnike (odvzem, shranjevanje in transport krvi) že močno znižal pojav nejasnih rezultatov. V zadnjem obdobju sicer opažamo porast nejasnih rezultatov, kar pa si lahko razložimo z drugačno strukturo bolnikov, v kateri prevladujejo imunsko oslabljeni posamezniki. V zadnjem letu smo v našem laboratoriju uvedli tudi najnovejšo različico QFT-Plus, ki je nadgradnja starega testa QFT-Gold In Tube in vključuje dve antigenski epruveti (TB1 in TB2). Pomembna prednost nove različice testa je, glede na naše izkušnje, predvsem odkrivanje primerov latentne tuberkuloze, ki jih sicer s staro različico testa ne bi odkrili. Kljub temu v prihodnjih nekaj letih zgoraj našteti testi za tuberkulozo (angl. *interferon-γ release assays*, IGRA) še ne bodo in ne smejo služiti kot zamenjava za mikrobiološko in histološko diagnostiko v primeru suma na aktivno tuberkulozo.

[1] Dr. Eva Sodja, univ. dipl. mikrobiolog., Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik 36, 4204 Golnik; eva.sodja@klinika-golnik.si

[2] Sandra Ažman, dipl. inž. lab. biomed., Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik 36, 4204 Golnik; sandra.azman@klinika-golnik.si

[3] Dr. Manca Žolnir – Dovč, univ. dipl. biolog., Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik 36, 4204 Golnik; manca.zolnir@klinika-golnik.si

ABSTRACT

KEY WORDS: tuberculosis, QuantiFERON, latent tuberculosis, diagnosis of latent tuberculosis

Identification of latent tuberculosis cases is important in tuberculosis control and preventing its transmission. Although such individuals do not show signs of the disease, they are at higher risk of disease reactivation especially in the first few years after infection. In the Laboratory for Mycobacteria at the University Clinic of Pulmonary and Allergic Diseases Golnik, the QuantiFERON test (QFT) has been used for latent tuberculosis diagnosis for over 10 years. In this article, we highlight the importance of our laboratory in reducing indeterminate results by indirectly influencing many pre-analytical factors (collection, storage and transport of blood samples). Recently, an increase in the number of indeterminate results was observed; this is probably due to a change in the patient structure with now predominantly immunocompromised patients. In the last year, our laboratory introduced the latest version of the QFT (QFT-Plus), which is an upgrade of the older test QFT-Gold In Tube, and includes two antigen test tubes (TB1 and TB2). An important advantage of the new QFT version, according to our experience, is mainly detection of latent tuberculosis cases, which would not be discovered with the older version of the test. Nevertheless, in the next few years, these so-called IGRA (interferon-γ release assays) tests cannot be used as a replacement for microbiological and histological diagnosis in the cases of suspected active tuberculosis.

UVOD

V današnjem času tuberkuloza še vedno predstavlja svetovni zdravstveni problem. Je resna kronična, nalezljiva bolezen, ki jo povzročajo bakterije iz sklopa *Mycobacterium tuberculosis* (angl. *M. tuberculosis complex*). Pljučna tuberkuloza prizadene pljuča, bolezen pa se lahko razvije v kateremkoli organu človeškega telesa (bezgavkah, plevri, kosteh, ledvicah, koži itd.). V tem primeru govorimo o izven pljučni obliki tuberkuloze. Tuberkuloza se prenaša med ljudmi s kužnim aerosolom, ki nastaja pri kašljanju, kihanju, govorjenju, smejanju ali petju bolnikov s pljučno ali žrelno (laringealno) tuberkulozo. Po okužbi z bacili tuberkuloze, bacili mirujejo v organizmu. Taki obliki tuberkuloze pravimo latentna oblika tuberkuloze oz. okužba z bacili tuberkuloze. Latentni (speči) bacili ostanejo mirujoči zelo dolgo časa, običajno celo življenje, saj kar 90 % vseh okuženih oseb nikoli ne zboli za aktivno tuberkulozo. V ostalih 10 % primerov okužba napreduje do aktivne bolezni. Aktivna tuberkuloza se lahko razvije nekaj mesecev pri imunsko oslabljenih bolnikih in otrocih oz. nekaj let po okužbi (približno dve leti po okužbi) pri imunsko kompetentnih posameznikih, v polovici primerov pa šele po več desetletjih ob kakšni drugi bolezni, ki oslabi delovanje imunskega sistema (npr. aids, rak), ali pri posameznikih, ki prejemajo imunosupresivna zdravila *(1–3)*.

Če tuberkulozo pravočasno odkrijemo in pravilno zdravimo, je v večini primerov povsem ozdravljiva bolezen. Kljub temu, da je število tuberkuloznih bolnikov v Sloveniji vsako leto nižje, Register za tuberkulozo Klinike Golnik še vedno vodi epidemiološki nadzor nad boleznijo. V Sloveniji je bilo leta 1954, ko je bil Register za tuberkulozo ustanovljen, število registriranih bolnikov s tuberkulozo 230 na 100.000 prebivalcev. Število je začelo po letu 2000 znatno padati in je leta 2015 znašalo le še 6,3 primerov tuberkuloze na 100.000 prebivalcev *(4)*.

Ključnega pomena pri nadzoru in preprečevanju širjenja tuberkuloze so pravočasno odkrivanje, čim hitrejše diagnosticiranje in dosledno pregledovanje kontaktov ter izobraževanje bolnikov, njihovih sorodnikov in nenazadnje širše slovenske javnosti. Pri preprečevanju širjenja bolezni je zelo pomembno odkrivanje in zdravljenje posameznikov z latentno obliko tuberkuloze. Danes velja ocena, da je kar ena tretjina svetovne populacije latentno okužena z bacili tuberkuloze *(1, 2, 4)*. Čeprav taki posamezniki ne kažejo znakov bolezni, lahko pri njih bolezen izbruhne zlasti v prvih nekaj letih po okužbi *(1, 2, 3)*. Preventivo zdravljenje omenjenih posameznikov močno zniža razvoj aktivne tuberkuloze *(5)*.

PREPOZNAVANJE LATENTNE OKUŽBE Z BACILI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Za diagnostiko latentne tuberkuloze se uporabljajo tuberkulinski kožni (Mantoux) test in testi IGRA (angl. *interferon-γ* release assay), ki temeljijo na sproščanju interferona-γ (IFN-γ). Uporaba tuberkulinskega kožnega testa je precej omejena, saj ima slabo specifičnost; rezultati so pogosto lažno pozitivni zaradi senzibilizacije imunskega odziva posameznikov z okoljskimi mikobakterijami in/ali cepivom BCG (bacil Calmette-Guerin) *(6, 7)*. Prav zato so za povečanje specifičnosti diagnostike latentne tuberkuloze razvili teste IGRA, ki temeljijo na merjenju koncentracije IFN-γ v celokupni krvi po *in vitro* stimulaciji s peptidi iz regije RD-1, ki se nahaja v genomu *M. tuberculosis (8, 9)*. Testi IGRA so zelo dober pokazatelj izpostavljenosti bacilom *M. tuberculosis*, saj je njihova specifičnost zelo visoka (~ 97 %) *(10)*. Na drugi strani imajo testi IGRA nekaj pomanjkljivosti: njihova občutljivost je pri imunsko oslabljenih posameznikih in otrocih še vedno nizka, prepoznavajo tako preteklo kot nedavno okužbo z bacili tuberkuloze in imajo nizko napovedno vrednost za prepoznavanje posameznikov z latentno tuberkulozo z višjim tveganjem za razvoj aktivne tuberkuloze (npr. bolniki z aids-om) *(11–16)*. Trenutno sta na tržišču komercialno dostopna dva testa IGRA, QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus; Qiagen, Hilden, Nemčija) in T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Abingdon, Velika Britanija).

V Laboratoriju za mikobakterije Klinike Golnik že od leta 2004 uporabljamo test QuantiFERON (QFT); od junija 2015 uporabljamo najnovejšo različico QFT-Plus, ki je nadgradnja starejše verzije QFT-Gold in Tube in z razliko od slednje vključuje kar dve antigenski epruveti, TB1 in TB2 *(17)*. Obe antigenski epruveti vsebujeta peptidne antigene, ki so povezani s sklopom *M. tuberculosis* in sodijo v dve skupini peptidov, ESAT-6 (angl. *6 kDa early secretory antigenic target*) in CFP-10 (angl. *10 kDa culture filtrate protein*). Epruveta TB1 vsebuje peptide ESAT-6 in CFP-10, ki v človeškem telesu sprožijo celično posredovan imunski odziv T-limfocitov CD4+ (celice pomagalke). Epruveta TB2 vsebuje dodatne peptide, ki stimulirajo imunski odziv in posledično sproščanje INF-γ, ki ga tvorijo tako T-limfociti CD4+ kot CD8+ (citotoksični limfociti ali celice ubijalke) *(18, 19)*. Pri poteku okužbe z bacili *M. tuberculosis* celice CD4+ odigrajo ključno vlogo pri nadzoru bolezni preko sproščanja INF-γ. Vse več dokazov pa podpira tudi pomembno vlogo celic CD8+, ki sodelujejo pri imunskem odzivu in obrambi gostitelja pred bacili tuberkuloze tako, da proizvajajo INF-γ in druge topne dejavnike. Le-ti aktivirajo makrofage za zaviranje bacilov tuberkuloze, ubijanje okuženih celic ali neposredno razgradnjo znotrajceličnih bacilov. Za okužbo z bacili *M. tuberculosis* značilne celice CD8+ so zaznali pri posameznikih z latentno tuberkulozo, še pogosteje pa pri bolnikih z aktivno tuber-

kulozo, prisotnost celic pa so povezali z nedavno izpostavljenostjo bacilom tuberkuloze *(20, 21)*.

Na rezultat testa QFT vpliva precej dejavnikov. Namen prispevka je poudariti pomembno vlogo, ki jo ima laboratorij v diagnostiki latentne tuberkuloze, opozoriti na dejavnike, ki vplivajo na rezultat testa QFT, in predstaviti večletne izkušnje Laboratorija za mikobakterije Klinike Golnik z uporabo testa QFT.

DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA REZULTAT TESTA QUANTIFERON

Ključni dejavniki, ki močno vplivajo na rezultat QFT, so t. i. predanalitski dejavniki, med katere prištevamo odvzem, shranjevanje in transport (čas in temperatura) vzorca krvi do laboratorija. Laboratorij nanje nima neposrednega vpliva, lahko pa posredno vpliva z ustreznim poučevanjem končnih uporabnikov svojih storitev, ki so kakorkoli vpleteni v odvzem, shranjevanje in transport krvi, in z ustreznim in doslednim nadzorovanjem le-teh *(17, 19, 22, 23)*.

Proizvajalec testa QFT priporoča dosledno upoštevanje navodil. Za test QFT-Plus moramo odvzeti štiri določene epruvete krvi, ki morajo biti pred odvzemom krvi obvezno segrete na sobno temperaturo. Mesto odvzema ustrezno razkužimo in kri odvzamemo v naslednje epruvete *(19)*:

- epruveto s sivim pokrovčkom, ki predstavlja ničelno kontrolo (Nil Tube),
- epruveto z zelenim pokrovčkom, ki vsebuje antigene, specifične za TB (TB1 Tube),
- epruveto z rumenim pokrovčkom, ki prav tako vsebuje antigene, specifične za TB (TB2 Tube) in
- epruveto z vijoličnim pokrovčkom, ki služi kot pozitivna kontrola oz. kontrola imunskega statusa bolnika kot tudi kontrola ustreznega ravnanja s krvjo (epruveta mitogena; Mitogen Tube).

Pred odvzemom krvi označimo vse štiri epruvete s podatki o bolniku in o času odvzema krvi (datum in ura odvzema). V vsako od štirih epruvet odvzamemo 1 ml krvi neposredno iz vene bolnika (do črne oznake na epruveti, dovoljeno odstopanje je ± 0,2 ml). Takoj po odvzemu vsako epruveto premešamo z obračanjem, da preprečimo spontano koagulacijo krvi. Ko bolniku odstranimo iglo, ponovno premešamo vse štiri epruvete hkrati, tako da jih 8–10-krat (približno 5 s) nesunkovito zavrtimo okoli daljše osi epruvete, da kri prelije celotno notranjo površino epruvete in tako spere s stene epruvet antigene *(19)*.

Transport epruvet v laboratorij mora biti čim krajši. Do transporta in med samim transportom mora biti kri na sobni temperaturi. Ne smemo je postaviti v hladilnik ali celo v zamrzovalnik. Transport ne sme trajati dlje od 16 ur, naše večletne izkušnje in dosegljivi članki v objavljeni literaturi kažejo, da je rezultat preiskave najboljši, če kri čim hitreje prispe v laboratorij (vsaj v 4 urah) *(17, 22)*.

SLOVENSKE IZKUŠNJE S TESTOM QUANTIFERON

Test QFT smo najprej skoraj leto dni testirali na zaposlenih zdravstvenih delavcih. Kot preiskavo za zunanje naročnike smo ga ponudili januarja 2006. Do leta 2007 smo uporabljali različico, ki je imela le dve epruveti (ničelno in antigensko), od leta 2007 smo postopoma uvajali naslednjo generacijo QFT s tremi epruvetami (dodana mitogenska epruveta), z junijem 2015 pa smo prešli na različico s štirimi epruvetami (dve antigenski epruveti) *(17)*.

V analizo rezultatov smo zajeli vzorce krvi, ki so bili napoteni v naš laboratorij od januarja 2007 do konca julija 2016, vključili pa smo le vzorce krvi, ki so bili zbrani v sete treh ali štirih epruvet QFT. Rezultati analize so povzeti v tabeli 1. V tem obdobju smo prejeli 18.087 vzorcev krvi, manjše število le-teh (223;

1,23 %) smo zaradi različnih nepravilnosti (predolg transport, kri odvzeta v napačne epruvete, shranjevanje krvi v hladilniku itd.) zavrnili. Negativnih je bilo 14.286 (78,99 %) vzorcev, 2.673 (14,78 %) vzorcev je bilo pozitivnih. V tem obdobju je bilo 856 (4,73 %) vzorcev nejasnih. Delež nejasnih rezultatov je bil najvišji leta 2008, ko je znašal 11,18 %, kar je verjetno povezano z neustreznim shranjevanjem in transportom krvi v laboratorij, na kar nas je opozorila šele dodatna mitogenska epruveta v letu 2007. S stalnim nadzorom, obveščanjem uporabnikov diagnostike o zgoraj omenjenih nepravilnostih, doslednim beleženjem datuma in ure odvzema krvi, z dodatnim izobraževanjem zdravstvenih delavcev, ki so odgovorni za odvzem in transport, ter z natančnim pregledovanjem epruvet smo uspeli delež nejasnih rezultatov znižati na 2,38 % v letu 2011. Delež nejasnih rezultatov je nato ponovno naraščal in za nekaj več kot polletno obdobje v letu 2016 znaša že 7,46 % (tabela 1, tabela 2, slika 1). Eden od vzrokov naraščanja je verjetno drugačna struktura bolnikov, od katerih prejmemo kri za test QFT. V zadnjih letih predvsem prevladujejo bolniki iz gastroenterooloških, revmatoloških in infekcijskih oddelkov ter pulmoloških ambulant, katerih kri pogosto pošljejo na testiranje pred uvedbo specifičnega biološkega zdravljenja. Večina od teh bolnikov je pred odvzemom krvi prejemala različna imunosupresivna zdravila (kortikosteroidi), ki močno zavirajo imunski odziv bolnika in so zato lahko vzrok nejasnim rezultatom. Verjetno pa lahko manjši delež nejasnih rezultatov še vedno pripišemo napakam, ki se lahko zgodijo tekom odvzema, shranjevanja in transporta krvi in jih kljub doslednemu nadzoru ne uspemo odkriti.

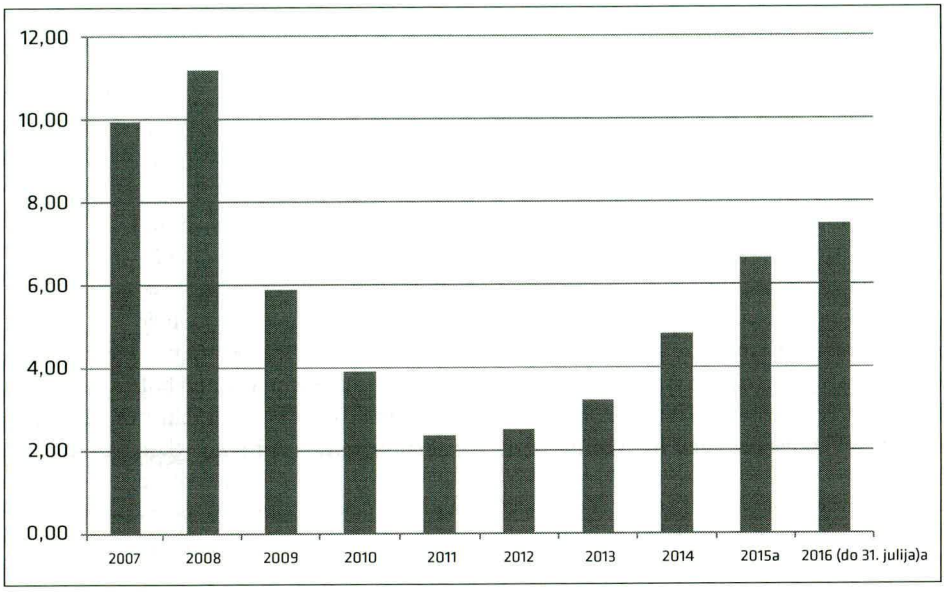
Tabela 1. Število (delež) vseh napotenih vzorcev krvi za preiskavo QuantiFERON (QFT), število (delež) negativnih, pozitivnih in nejasnih rezultatov ter zavrnjenih vzorcev krvi v letih 2007 do 2016 v Laboratoriju za mikobakterije Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik.

Rezultat QFT	Število vzorcev krvi (delež, %)										Skupaj
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015[a]	2016[a] (do 31. julija)	
Negativen	115 (71,43)	556 (66,83)	1.054 (75,66)	1.662 (80,29)	1.823 (79,78)	1.996 (80,71)	2.104 (82,41)	1.933 (78,10)	1.916 (79,47)	1.127 (78,59)	14.286 (78,99)
Pozitiven	30 (18,63)	173 (20,79)	230 (16,51)	306 (14,78)	380 (16,63)	373 (15,08)	334 (13,08)	374 (15,10)	295 (12,24)	178 (12,41)	2.673 (14,78)
Nejasen	16 (9,94)	93 (11,18)	82 (5,89)	81 (3,91)	54 (2,38)	62 (2,51)	82 (3,21)	119 (4,81)	160 (6,64)	107 (7,46)	856 (4,73)
Kri zavrnjena	0 (0,00)	10 (1,20)	27 (1,94)	21 (1,01)	27 (1,18)	30 (1,21)	19 (0,74)	39 (1,58)	31 (1,29)	19 (1,32)	223 (1,23)
Mejna vrednost[b]	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,00)	3 (0,12)	2 (0,08)	1 (0,04)	5 (0,21)	0 (0,00)	12 (0,07)
Ostalo[c]	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	9 (0,36)	12 (0,47)	9 (0,36)	4 (0,17)	3 (0,21)	37 (0,20)
Skupaj	161	832	1.393	2.070	2.285	2.473	2.553	2.475	2.411	1.434	18.087

[a] Od junija 2015 izvajamo test QFT s setom štirih epruvet.

[b] Vrednost, ko zaradi spremenljivosti biološkega testa z gotovostjo ne moremo trditi, ali je test QFT pozitiven oz. negativen. Na izvidu je zato vedno opomba, naj naročnik pošlje nov vzorec krvi za testiranje.

[c] Napačno sprejeti vzorci, preklic naročila s strani naročnika, izvid ni izdan ipd.



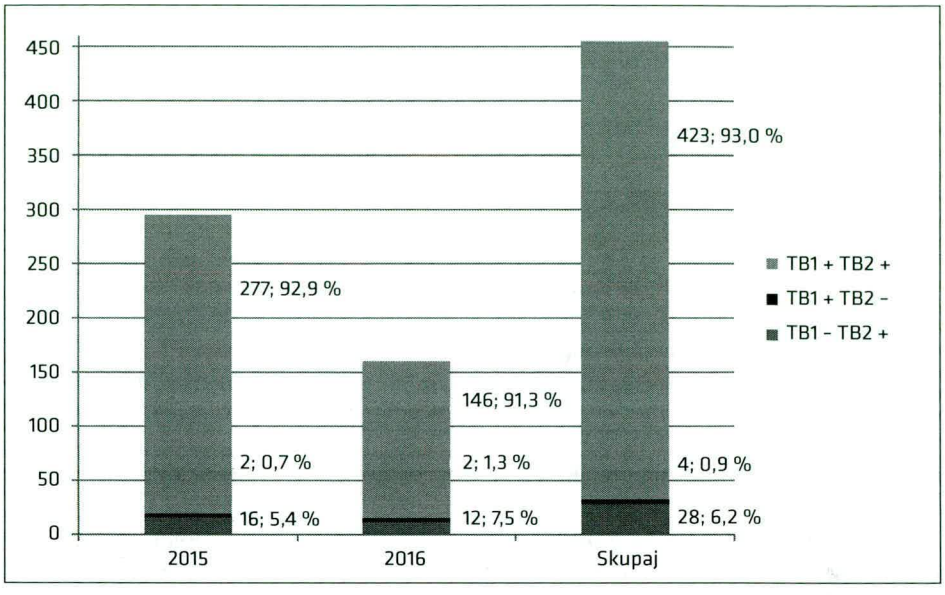
Slika 1. Odstotek nejasnih rezultatov testa QuantiFERON (QFT) po letih v Laboratoriju za mikobakterije Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik. Od junija 2015 izvajamo test QFT s setom štirih epruvet.

Tabela 2. Število (delež) vseh napotenih vzorcev krvi za preiskavo QuantiFERON (QFT), število (delež) negativnih, pozitivnih in nejasnih rezultatov ter zavrnjenih vzorcev krvi v letih 2015 do 2016 glede na različico QFT v Laboratoriju za mikobakterije Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik. NP – ni podatka, 0 – ničelna kontrola, A, TB1 in TB2 – antigenske epruvete, M – pozitivna kontrola.

Rezultat QFT	2015			2016 (do 31. julija)		
	Število vzorcev krvi (delež, %)					
	QFT-Gold (0, A, M)	QFT-Plus (0, TB1, TB2, M)	Skupaj	QFT-Gold (0, A, M)	QFT-Plus (0, TB1, TB2, M)	Skupaj
Negativen	1.339 (80,91)	577 (79,59)	1.916 (79,47)	90 (78,26)	1.037 (78,62)	1.127 (78,59)
Pozitiven	202 (12,21)	93 (12,83)	295 (12,24)	18 (15,65)	160 (12,13)	178 (12,41)
Nejasen	107 (6,47)	53 (7,31)	160 (6,64)	7 (6,09)	100 (7,58)	107 (7,46)
Kri zavrnjena	NP	NP	31 (1,29)	0 (0,00)	19 (1,44)	19 (1,32)
Mejna vrednost[a]	3 (0,18)	2 (0,08)	5 (0,21)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Ostalo[b]	4 (0,24)	0 (0,00)	4 (0,17)	0 (0,00)	3 (0,23)	3 (0,21)
Skupaj	1.655	725	2.411	115	1.319	1.434

[a] Vrednost, ko zaradi spremenljivosti biološkega testa ne moremo z gotovostjo trditi, ali je test QFT pozitiven oz. negativen. Na izvidu je zato vedno opomba, naj naročnik pošlje nov vzorec krvi za testiranje.

[b] Napačno sprejeti vzorci, preklic naročila s strani naročnika, izvid ni izdan ipd.



Slika 2. Število in delež pozitivnih rezultatov testa QuantiFERON Plus glede na antigenski epruveti TB1 in TB2 v letih 2015 in 2016 v Laboratoriju za mikobakterije Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik.

Slika 2 se nanaša na najnovejšo različico QFT-Plus in prikazuje število in odstotek rezultatov QFT glede na antigensko epruveto. V preko 90 % pozitivnih primerov sta bili pozitivni obe epruveti, v manj kot 1 % primerov le antigenska epruveta TB1 in v 6,2 % primerov le antigenska epruveta TB2. Slednji primeri so primeri latentne okužbe z bacili tuberkuloze, ki jih s prejšnjo različico testa ne bi odkrili.

ZAKLJUČEK

V Sloveniji test QFT priporočamo predvsem za pregledovanje oseb, ki so bile v stiku z bolniki z aktivno tuberkulozo (t. i. kontakti), pri odkrivanju latentne okužbe z bacili *M. tuberculosis* pred začetkom zdravljenja z biološkimi zdravili, pred presaditvijo organov, pri pregledovanju zdravstvenih delavcev in tudi pri otrocih s sumom na aktivno tuberkulozo. Za potrjevanje ali izključevanje aktivne tuberkuloze je še vedno potrebno obvezno vzporedno pošiljanje kužnin za mikrobiološko in histološko diagnostiko tuberkuloze, saj je pozitivna kultura bacilov *M. tuberculosis* še vedno edini pravi dokaz aktivne tuberkuloze, ki hkrati omogoča testiranje občutljivosti za antituberkulotike *(17)*.

Različici testa QFT, ki imata dodano mitogensko epruveto, sta pomembno izboljšali kakovost testiranja, saj je ta epruveta istočasni pokazatelj imunskega statusa bolnika in pokazatelj ustreznosti odvzema, shranjevanja in transporta krvi do laboratorija. Prav ti predanalitski dejavniki so ključnega pomena, saj pomembno vplivajo na rezultat testiranja. Natančna navodila o odvzemu in transportu krvi, izobraževanje zdravstvenih (so)delavcev, ki skrbijo za odvzem, hranjenje in transport krvi do laboratorija, pomoč pri organizaciji transporta krvi iz oddaljenih krajev, natančno pregledovanje prispelih epruvet v laboratoriju, nadzor nad beleženjem datuma in ure odvzema, natančno testiranje, ter sprotno

analiziranje rezultatov testiranja, so samo nekateri kazalniki pomembne vloge laboratorija pri diagnostiki latentne tuberkuloze.

V juniju 2015 smo v Laboratoriju za mikobakterije Klinike Golnik začeli uporabljati že četrto generacijo testa QFT (QFT-Plus), ki ima dodano še eno antigensko epruveto z dodatnimi antigeni. Prav zato naj bi imela najnovejša različica QFT višjo občutljivost in boljšo učinkovitost predvsem pri imunsko kompromitiranih osebah. Ob primerjavi rezultatov s prejšnjo generacijo QFT pa lahko opazimo, da je delež nejasnih rezultatov (ki jih lahko vsaj delno pripišemo tudi vse večjemu številu imunsko oslabljenih bolnikov) primerljiv oz. celo malenkost višji pri najnovejši različici QFT (tabela 2). Prednost nove različice QFT je predvsem odkrivanje primerov latentne tuberkuloze, ki jih s prejšnjo različico QFT ne bi zaznali; to nam omogoča dodatna antigenska epruveta TB2. Na drugi strani pa je še vedno vprašljivo razlikovanje med aktivno in latentno TB, saj proizvajalec testa QFT ne poda jasnih mejnih vrednosti za razlikovanje med obema oblikama tuberkuloze. V dosegljivi literaturi smo našli raziskavo, ki je pokazala, da razlika med epruvetama TB2 in TB1 verjetno nakazuje na nedavno okužbo z bacili tuberkuloze, vendar je potrebno omenjeno najdbo potrditi z dodatnimi raziskavami *(1)*. V prihodnjih nekaj letih testi IGRA še ne bodo in ne smejo služiti kot zamenjava za mikrobiološko in histološko diagnostiko v primeru suma na aktivno tuberkulozo.

LITERATURA

1. Barcellini L, Borroni E, Brown J, et al. First evaluation of QuantiFERON-TB Gold Plus performance in contact screening. Eur Respir J. V tisku 2016.
2. Dye C, Scheele S, Dolin P, et al. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA. 1999; 282 (7): 677–86.
3. Fogel N. Tuberculosis: a disease without boundaries. Tuberculosis (Edinb). 2015; 95 (5): 527–31.
4. Klinika Golnik: Register za tuberkulozo [internet]. Golnik: Klinika Golnik; c2006–2008 [citirano 2016 Oct 14]. Dosegljivo na: http://www.klinika-golnik.si/dejavnost-bolnisnice/klinicna-dejavnost/tuberkuloza/register-za-tuberkulozo/
5. Stagg HR, Zenner D, Harris RJ, et al. Treatment of latent tuberculosis infection: a network meta-analysis. Ann Intern Med. 2014; 161 (6): 419–28.
6. Farhat M, Greenaway C, Pai M, et al. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? Int J Tuberc Lung Dis. 2006; 10 (11): 1192–204.
7. Cobelens FG, Menzies D, Farhat M. False-positive tuberculin reactions due to non-tuberculous mycobacterial infections. Int J Tuberc Lung Dis. 2007; 11 (8): 934–5.
8. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, et al. Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. Am J Respir Crit Care Med. 2004; 170 (1): 59–64.
9. Pai M, Minion J, Sohn H, et al. Novel and improved technologies for tuberculosis diagnosis: progress and challenges. Clin Chest Med. 2009; 30 (4): 701–16.
10. Sester M, Sotgiu G, Lange C, et al. Interferon-γ release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. Eur Respir J. 2011; 37 (1): 100–11.
11. Santin M, Muñoz L, Rigau D. Interferon-γ release assays for the diagnosis of tuberculosis and tuberculosis infection in HIV-infected adults: a systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2012; 7 (3): e32482.
12. Mandalakas AM, Detjen AK, Hesseling AC, et al. Interferon-gamma release assays and childhood tuberculosis: systematic review and meta-analysis. Int J Tuberc Lung Dis. 2011; 15 (8): 1018–32.

13. Hesseling AC, Mandalakas AM. Interferon-gamma release assays for childhood tuberculosis: what does the future hold? Int J Tuberc Lung Dis. 2011; 15 (11): 1423–4.
14. Dewan PK, Grinsdale J, Kawamura LM. Low sensitivity of a whole-blood interferon-gamma release assay for detection of active tuberculosis. Clin Infect Dis. 2007; 44 (1): 69–73.
15. Rangaka MX, Wilkinson KA, Glynn JR, et al. Predictive value of interferon-γ release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2012; 12 (1): 45–55.
16. Jonnalagadda SR, Brown E, Lohman-Payne B, et al. Predictive value of interferon-gamma release assays for postpartum active tuberculosis in HIV-1-infected women. Int J Tuberc Lung Dis. 2013; 17 (12): 1552–7.
17. Žolnir - Dovč M. Testi IGRA in vloga laboratorija v diagnostiki latentne tuberkoloze. In: Fležar M, Marčun R, Svetina-Šorli P, eds. Zbornik sestanka: 20. redni posvet o obravnavi in spremljanju bolnikov s tuberkulozo (TB) v Sloveniji; 2015 Mar 20; Golnik: Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik; 2015. p. 20–23.
18. Sreejit G, Ahmed A, Parveen N, et al. The ESAT-6 protein of Mycobacterium tuberculosis interacts with beta--2-microglobulin (β2M) affecting antigen presentation function of macrophage. PLoS Pathog. 2014; 10 (10): e1004446.
19. QIAGEN. QuantiFERON-TB Gold Plus ELISA Package Insert [internet]. 2015 [citirano 2016 Oct 14]. Dosegljivo na: http://www.quantiferon.com/irm/content/PI/QFT/PLUS/2PK-Elisa/UK.pdf
20. Nikolova M, Markova R, Drenska R, et al. Antigen-specific CD4- and CD8-positive signatures in different phases of Mycobacterium tuberculosis infection. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013; 75 (3): 277–81.
21. Rozot V, Vigano S, Mazza-Stalder J, et al. Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. Eur J Immunol. 2013; 43 (6): 1568–77.
22. Herrera V, Yeh E, Murphy K, et al. Immediate incubation reduces indeterminate results for QuantiFERON-TB Gold in-tube assay. J Clin Microbiol. 2010; 48 (8): 2672–6.
23. Gaur RL, Banaei N. Inoculation of QuantiFERON-TB tubes with skin microbiota causes false-positive results. Am J Respir Crit Care Med. 2014; 190 (7): 834–7.

Petra Svetina[1], Sanja Grm Zupan[2]

Izzivi pri obravnavi bolnikov z netuberkuloznimi mikobakteriozami

Challenges in Treating Patients with Nontuberculous Mycobacteriosis

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: netuberkulozne mikobakterije, klinične manifestacije mikobakterioz, protimikrobno zdravljenje

Netuberkulozne mikobakterije oz. atipične mikobakterije so mikroorganizmi, ki so prisotni v vodi in zemlji. Nekateri med njimi so patogeni za človeka in živali, lahko povzročijo asimptomatsko okužbo ali klinično pomembno bolezen – mikobakteriozo. Mikobakterioze so pogostejše pri osebah s predhodno pljučno boleznijo ali pri imunsko oslabelih osebah. Klinično se mikobakterioze kažejo s prizadetostjo pljuč, bezgavk, mehkih tkiv, kože ali kot razširjena oblika bolezni. Pred začetkom zdravljenja je pomembna natančna identifikacija netuberkulozne mikobakterije, saj so različno občutljive na določena protimikrobna zdravila. Zdravljenje mikobakterioz je dolgotrajno, s kombinacijo več protimikrobnih zdravil hkrati. V prihodnosti pričakujemo porast števila klinično pomembnih mikobakterioz.

ABSTRACT

KEY WORDS: nontuberculous mycobacteria, clinical manifestation of micobacteriosis, antimicrobal therapy

Nontuberculous or atypical mycobacteria are ubiquitous in soil and water. Some of them are low-grade pathogens in humans and animals. They can cause asymptomatic infection or disease—mycobacteriosis. The disease can more often be seen in patients with pre-existing lung disease or states of immunodeficiency. Many sites of infection have been reported, including pulmonary disease, lymphadenitis, soft tissue, skin infection and disseminated disease. Before starting treatment, isolation and identification of mycobacteria species is crucial because mycobacteria are susceptible only to certain drugs. The treatment is prolonged with combination of antimicrobal drugs. In the future, an increase of diseases caused by nontuberculous mycobacteria is expected.

[1] Petra Svetina, dr. med., Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik 36, 4204 Golnik; petra.svetina@klinika-golnik.si

[2] Sanja Grm Zupan, dr. med., Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik 36, 4204 Golnik; sanja.grm@klinika-golnik.si

UVOD

Netuberkulozne mikobakterije (NTM) ali atipične mikobakterije sodijo v isto družino kot *Mycobacterium tuberculosis complex* in *Mycobacterium leprae*. NTM so mikroorganizmi, ki so navzoči povsod v naravi, najpogosteje jih najdemo v vodi in v zemlji, zato jih imenujejo okoljske mikobakterije. Lahko se nahajajo tudi v vodnih sistemih v bolnišnicah, hemodializnih centrih in zobozdravstvenih ustanovah. Zaradi svoje zgradbe so odporne na številna razkužila in antibiotike.

V zadnjih desetletjih je bilo prepoznanih mnogo NTM, tako da je trenutno znanih že več kot 150 vrst. Polovica od teh lahko povzroči oportunistične okužbe pri živalih in ljudeh. NTM so nizko patogene za človeka in povzročajo bolezni praviloma pri osebah s predhodnimi boleznimi pljuč ali pri osebah, ki imajo izraženo imunsko oslabelost. NTM tako pogosteje povzročajo klinično pomembne bolezni pri bolnikih s kronično obstruktivno pljučno boleznijo, z bronhiektazijami, s cistično fibrozo, s pnevmokoniozami in pri bolnikih, ki so se v preteklosti zdravili zaradi tuberkuloze. V zadnjem času NTM pogosto povzročajo klinično pomembne bolezni pri bolnikih, okuženih z virusom HIV, ali pri bolnikih, ki so na imunosupresivni terapiji po predhodni transplantaciji organa ali kostnega mozga.

Natančen način prenosa še ni poznan, vendar se predvideva, da NTM vstopajo v telo z vdihovanjem onesnaženih zračnih in vodnih kapljic, s pitjem onesnažene vode in z neposrednim stikom z NTM skozi poškodovano ali odmrlo kožo. NTM lahko vstopajo v telo tudi s kontaminiranimi medicinskimi pripomočki (npr. s kontaminirani katetri, z endoskopi).

Prenos s človeka na človeka ali z živali na človeka je mogoč, vendar je izredno redek.

Pogostost mikobakterioz, ki jih povzročajo NTM, je v različnih predelih sveta različna. Poleg tega se različni predeli sveta razlikujejo v pojavnosti posameznih vrst NTM, ki povzročajo klinično pomembne manifestacije. V zadnjih letih opažamo porast NTM mikobakterioz v industrijskih državah, kjer je incidenca teh bolezni ocenjena na 1–1,8 primerov/100.000 prebivalcev *(1–4)*.

KLINIČNE MANIFESTACIJE

NTM lahko povzročajo asimptomatske okužbe ali klinično pomembne bolezni, ki jih poimenujemo mikobakterioze. Klinično pomembne manifestacije lahko prizadenejo pljuča, bezgavke, kožo in mehka tkiva, lahko pa so izražene kot razširjena bolezen s prizadetostjo več organskih sistemov. Pri posameznikih lahko nekatere NTM okužbe postanejo kronične in potrebujejo stalno zdravljenje ter tako pomembno vplivajo na kakovost življenja.

Pljučna mikobakterioza se lahko kaže kot kavernozna oblika bolezni ali kot nodularna oblika bolezni, redko kot preobčutljivostni pnevmonitis. Najpogostejši povzročitelji pljučne mikobakterioze so *Mycobacterium kansasii, Mycobacterium avium intracellulare complex* (MAC), *Mycobacterium malmoense* in *Mycobacterium xenopi*.

Kavernozna pljučna mikobakterioza se pogosteje pojavlja pri starejših moških s pljučnim obolenjem (z emfizemom, bronhiektazijami, s pnevmokoniozo ali kroničnim bronhitisom). Bolezen lahko poteka akutno ali subakutno s produktivnim kašljem, težkim dihanjem, z utrujenostjo, izgubo telesne teže, s povišano telesno temperaturo, lahko tudi z izkašljevanjem krvavega izmečka. Na rentgenogramu prsnih organov so spremembe vidne predvsem v zgornjih pljučnih režnjih, pri 60–70 % so prisotne kaverne.

Nodularna pljučna mikobakterioza je pogostejša pri asteničnih, starejših ženskah, brez predhodne pljučne bolezni in pri ženskah z deformiranim prsnim ko-

šem (npr. z izraženim *pectus excavatusom*, s skoliozo hrbtenice). Pomemben simptom je produktiven kašelj. Na rentgenogramu prsnih organov so vidne spremembe v srednjem pljučnem režnju in linguli.

Preobčutljivostni pnevmonitis se lahko pojavi pri osebah, ki so izpostavljene MAC. Izboljšanje se pojavi po koncu izpostavljenosti. Zdravljenje s steroidi in protimikrobnimi zdravili večinoma ni potrebno.

Bezgavčna mikobakterioza najpogosteje prizadene otroke v starosti do pet let, pri odraslih se pojavlja redko, nanjo moramo biti pozorni pri odraslih osebah, okuženih z virusom HIV. Praviloma je prizadeta le ena bezgavka, ki je povečana, vneta in je lahko boleča. Sistemski znaki so praviloma odsotni. Bezgavčno mikobakteriozo ponavadi povzročajo NTM iz vrst *Mycobacterium malmoense* in MAC. Ponavadi je terapevtsko uspešna odstranitev prizadete bezgavke.

Razsejana oblika mikobakterioze najpogosteje prizadene osebe, ki so okužene z virusom HIV. Kaže se s slabim počutjem, z znojenjem, vročino, s hujšanjem, z drisko, limfadenopatijo, na koži se lahko pojavijo razjede, prisotna je hepatosplenomegalija. Na rentgenogramu prsnih organov so vidni mediastinalna limfadenopatija in noduli. Najpogostejši povzročitelj razsejane mikobakterioze je MAC.

V sklopu prizadetosti kože in mehkih tkiv najdemo abscese in fistule v koži in podkožju, kar lahko sledi okužbi pooperativne rane ali kroničnih ran. Povzročitelji so najpogosteje *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium ulcerans* in *Mycobacterium marinum* (angl. *swiming pool granuloma*) *(1,2,4)*.

DIAGNOZA

Na bolezen posumimo na osnovi anamneze, klinične slike in slikovne diagnostike. Bolezen potrdimo z dokazom mikobakterij v odvzetih kužninah.

Diagnostika pljučne oblike bolezni temelji na kliničnih in mikrobioloških kriterijih. Klinični kriteriji so:

- pljučni simptomi, nodularne ali kavitalne spremembe, vidne na rentgenogramu prsnih organov ali bronhiektazije s številnimi malimi noduli, vidne na visokoresolucijski računalniški tomografiji in
- izključena druga bolezen.

Mikrobiološki kriteriji so:

- pozitivne kulture vsaj dveh različnih izmečkov ali
- pozitivna kultura vsaj enega izpirka bronha ali bronhoalveolarne lavaže ali
- bronhoskopska pljučna biopsija ali bronhialna biopsija s histološkimi kriteriji (granulomatozno vnetje) in/ali prisoten acido rezistentni bacil in pozitivna kultura biopsije *(2)*.

PROTIMIKROBNO ZDRAVLJENJE MIKOBAKTERIOZ

Zdravljenje NTM mikobakterioz se razlikuje od zdravljenja tuberkuloze, saj NTM niso občutljive na pirazinamid, večina med njimi tudi ne na izonazid. Poleg tega so posamezne NTM različno občutljive na ostala protimikrobna zdravila, ki jih uporabljamo pri zdravljenju. Pred začetkom zdravljenja je zato nujna natančna identifikacija vrste NTM. Praviloma zdravimo z več protimikrobnimi zdravili hkrati, ki imajo pogosto stranske učinke, kar otežuje zdravljenje. NTM mikobakterioze se pogosteje pojavljajo pri starejših osebah, ki imajo sočasno pridružene bolezni in prejemajo druga zdravila, le-ta pa prihajajo v interakcije s protimikrobnimi zdravili. Zdravljenje je dolgotrajno (tudi več kot leto dni), zato je sodelovanje bolnika pri zdravljenju pogosto slabo.

Zaradi vseh zgoraj omenjenih razlogov je pred začetkom predvidenega zdravljenja nujno oceniti korist za bolnika *(2–5)*.

ZAKLJUČEK

NTM in okužbe, ki jih povzročajo, bodo v prihodnje predstavljale pomemben zdravstveni problem zaradi naraščanja incidence okužb, staranja prebivalstva, pogostejše pojavnosti pridruženih bolezni bolnikov, naraščanja incidence okužb z virusom HIV, pojavljanja odpornih oblik NTM, naraščanja kirurških in ostalih medicinskih posegov ter naraščanja števila bolnikov s predhodnimi boleznimi pljuč. Zaradi omenjenih razlogov in zaradi težavnega zdravljenja, lahko v državah z nizko incidenco tuberkuloze (kamor sodi tudi Slovenija) pričakujemo, da bodo mikobakterioze postale pogostejše in težje obvladljive od tuberkuloze.

LITERATURA

1. Johnson MM, Odell JA. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. J Thorac Dis. 2014; 6 (3): 209–20.
2. Griffith DE, Askamit T, Brown-Elliot BA, et al. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. Am J of Respir Crit Care Medicine. 2007; 175 (4): 367–416.
3. Nontuberculous mycobacteria. University of California San Francisco medical center website [internet]. [Citirano 2015 Dec 14]. Dosegljivo na: http://www.ucsfhealth.org/conditions/nontuberculous_mycobacteria/
4. Nontuberculous mycobacteria overview. National Jewish health website. [internet]. [Citirano 2015 Dec 14]. Dosegljivo na: http://www.nationaljewish.org/healthinfo/conditions/ntm
5. van Ingen J. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. Semin Respir Crit Care Med. 2013; 34 (1): 103–9.

Katarina Osolnik[1], Manca Žolnir - Dovč[2] in Viktorija Tomič[3]

Klinične in mikrobiološke značilnosti izoliranih nokardij v Sloveniji v letih 2004–2015

Clinical and Microbiological Characteristics of Nocardia Isolates in Slovenia in 2004–2015

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Nocardia* spp., okužba, kolonizacija

IZHODIŠČA. *Nocardia* spp. je redek patogen, ki lahko prizadene imunsko kompetentne bolnike in bolnike z okvarjeno imunostjo. Nokardioza je redka bolezen, ki se razvije večinoma pri bolnikih s pomanjkljivo celično imunostjo, bolnikih s kroničnimi boleznimi, ki zmanjšujejo njihovo imunost, ali bolnikih z imunskimi pomanjkljivostmi drugih vzrokov. *Nocardia* spp. je lahko vzrok okužbam kože, pljuč ali diseminiranih infekcij. METODE. Predstavljamo epidemiološke značilnosti sevov *Nocardia* spp., izoliranih v Sloveniji, in na podlagi retrospektivne raziskave razpravljamo o rizičnih dejavnikih, klinični sliki, diagnostiki in zdravljenju bolezni. Pregledali smo laboratorijske izvide Laboratorija za mikobakterije in Laboratorija za respiratorno mikrobiologijo na Univerzitetni kliniki za pljučne bolezni in alergijo na Golniku od januarja 2004 do decembra 2015 in popise bolezni v isti bolnišnici zdravljenih bolnikov. REZULTATI. Večina bolnikov, ki je imela nokardijo izolirano iz izmečka, je imela pridruženo pljučno bolezen in je v veliki večini prejemala glukokortikoide, v inhalacijski ali peroralni obliki. ZAKLJUČKI. Prepoznava okužbe z nokardijo je pomembna zaradi izbora ustrezne antibiotične terapije. Zaradi njene netipične klinične slike, še posebej pri bolnikih z okvarjeno imunostjo, jo je mogoče kaj hitro spregledati.

ABSTRACT

KEY WORDS: *Nocardia* spp., colonization, infection

BACKGROUNDS. *Nocardia* spp. is an uncommon pathogen that affects both immunosuppressed and immunocompetent patients. Nocardiosis is a rare disease that affects mainly patients with deficient cell-mediated immunity, patients with underlying chronic debilitating disease or immunodeficiency. *Nocardia* spp. is responsible for cutaneous, pulmonary and disseminated human infections. METHODS. We report the epidemio-

[1] Katarina Osolnik, dr. med., Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik 36, 4204 Golnik, katarina.osolnik@klinika-golnik.si

[2] Dr. Manca Žolnir - Dovč, univ. dipl. biol., Laboratorij za mikobakterije, Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik 36, 4204 Golnik

[3] Doc. dr. Viktorija Tomič, dr. med., Laboratorij za respiratorno mikrobiologijo, Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik 36, 4204 Golnik

logic characteristics of *Nocardia* spp. observed in Slovenia and discuss the risk factors, clinical features, diagnosis, and management of the disease. We retrospectively reviewed the laboratory records of identifying patients with nocardiosis at the laboratories of the University Clinic of Respiratory and Allergic Diseases Golnik in Slovenia from January 2004 to December 2015. We reviewed the clinical records of all patients with *Nocardia* spp. isolated from clinical specimens. RESULTS. Most patients with *Nocardia* spp. isolated from sputum had pre-existing pulmonary disease and a substantial part of them was treated with corticosteroids. Fatigue, fever, cough, dyspnoea, and loss of weight were the main symptoms in patients with nocardia infection who were treated successfully with trimetoprim-sulphametoxasol. CONCLUSIONS. Most patients with *Nocardia* spp. isolated from sputum had pre-existing pulmonary disease and a substantial part of them was treated with corticosteroids. Recognition of nocardia infection is important for the choice of appropriate antibiotic treatment. Due to its non-typical clinical manifestations, especially in immunocompromised patients, it can easily be missed.

IZHODIŠČA

Nokardioza je redka bakterijska okužba z zelo raznoliko klinično sliko pri bolnikih z ohranjeno imunostjo in bolnikih z okrnjeno imunostjo. V literaturi se pojavlja vedno več poročil o kliničnih primerih; v Sloveniji nimamo podatkov o incidenci, za ZDA pa je ocenjena na 500 do 1.000 primerov letno *(1)*. Vzrok vedno več poročanim primerom je verjetno v večjem številu bolnikov z okvarjeno imunostjo, zaradi zdravljenja drugih bolezni in natančnejši laboratorijski diagnostiki *(2)*. Za večino bolnikov z okužbo z *Nocardio* spp. in tistih, za katere je klinično ocenjeno, da gre samo za kolonizacijo, je znano, da imajo od spremljajočih bolezni bodisi rakavo bolezen, so po presaditvi katerega od organov ali imajo pridružene bolezni kot npr. sladkorno bolezen, jetrno cirozo ali bolezni zaradi katerih prejemajo glukokortikoide *(3)*.

METODE

Restrospektivno smo pregledali laboratorijske izolate nokardij v Laboratoriju za mikobakterije Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergijo (UKPA) Golnik v času od januarja 2004 do decembra 2015.

REZULTATI

V obdobju od januarja 2004 do decembra 2015 je bila v 89 vzorcih pri 79 bolnikih izolirana *Nocardia* spp. V veliki večini primerov, 84-krat (89 %), je bila izolirana iz izmečka, trikrat (3 %) iz aspirata spodnjih dihal, en izolat pa je bil iz plevralnega punktata in fecesa.

Povprečna starost 79 bolnikov (42 moških, 37 žensk) je bila 70,5 let. Za 11 od zgoraj navedenih bolnikov je bilo iz klinične dokumentacije mogoče zaključiti, da so bili obravnavani kot okužba – nokardioza, vsi ostali kot kolonizirani.

V laboratoriju določene vrste nokardij so bile: *N. asteroides* pri 34 (43 %) bolnikih, *N. nova* pri 29 (36 %) bolnikih, *N. brasiliensis* pri desetih (12 %) bolnikih, *N. brevicatena* pri devetih (11 %) bolnikih, *N. pseudobrasiliensis* pri štirih (5 %) bolnikih in *Nocardia* spp. pri treh (3 %) bolnikih.

Pregledali smo dostopno klinično dokumentacijo 40 bolnikov, ki so bili obravnavani v UKPA Golnik. Med njimi je bilo 23 moških in 17 žensk. Njihova povprečna starost je bila 70,8 let.

V laboratoriju določene vrste nokardij so bile: *N. asteroides* pri 27 (67 %) bolnikih, *N. nova* pri 16 (40 %) bolnikih, *N. brasiliensis* pri sedmih (17 %) bolnikih, *N. brevicate-*

na pri štirih (10 %) bolnikih, *Nocardia* spp. pri treh (7,5 %) bolnikih in *N. pseudobrasiliensis* pri enem (2,5 %) bolniku.

Ob pregledu klinične dokumentacije smo ugotovili, da je bila od spremljajočih bolezni pri bolnikih obravnavanih v UKPA Golnik največkrat prisotna kronična obstruktivna pljučna bolezen (KOPB), in sicer pri 52 %, bronhiektazije pri 22,5 % bolnikov, sledila je sladkorna bolezen pri 20 % bolnikov, post tuberkulozne spremembe pljuč pri 15 % bolnikov, rak pljuč pri 15 % bolnikov in presajena ledvica pri 5 % bolnikov.

Ob pregledu predpisane terapije pred izolacijo nokardij smo ugotovili, da je 52 % bolnikov prejemalo glukokortikoide. Med njimi je bilo 76 % zdravljenih z inhalacijskimi glukokortikoidi, 24 % je prejemalo sistemske glukokortikoide. Bolniki s presajenimi organi so poleg sistemskih glukokortikoidov prejemali tudi druga, po presaditvi organov indicirana imunosupresivna zdravila.

Ob začetku klinične obravnave, kateri je sledila izolacija nokardij, je bil glaven simptom, prisoten praktično pri vseh bolnikih, kašelj. Pri bolnikih, ki so bili obravnavani in spremljani samo kot kolonizirani z nokardijo, je bil kašelj kot simptom pripisan spremljajočim boleznim (KOPB, bronhiektazije).

Pri 11 bolnikih, ki so bili zdravljeni zaradi okužbe z bakterijo *Nocardia* spp., med njimi pet moških in šest žensk, so bili prisotni tudi sistemski znaki bolezni: utrujenost, vročina, dispneja in hujšanje. Na rentgenogramu prsnih organov in/ali visokoločljivostni računalniški tomografiji pljuč so bile spremembe opisane kot konsolidacije, infiltrati ali nodularne lezije.

Vseh 11 bolnikov je bilo uspešno zdravljenih od tri do 12 mesecev, in sicer devet bolnikov s trimetoprim-sulfametoksazolom, dva bolnika pa z amoksicilinom s klavulansko kislino.

RAZPRAVA

Večina bolnikov je bila moških, kar je v skladu z več drugimi poročili v literaturi, kjer to razlagajo z vplivom hormonskega statusa na virulenco ali rast nokardij *(4)*.

Velika večina bolnikov, ki so bili obravnavani v UKPA Golnik, je imela ob izolaciji nokardije pridruženo tudi eno ali več drugih pljučnih bolezni, med njimi največ KOPB, kar je skladno s poročili v literaturi *(5)*. To je tudi glavni vzrok velikega deleža pred izolacijo nokardij predpisane glukokortikoidne terapije. V veliki večini so bolniki prejemali inhalacijske glukokortikoide, predvsem v skupini tistih bolnikov, pri katerih je bila izolacija pripisana kolonizaciji. Ti bolniki so bili kasneje spremljani, ponovljeni so bili tudi odvzemi izmečka za pregled na prisotnost nokardij. V večini primerov ob kontrolnih odvzemih nokardija ni bila več izolirana.

Bolniki, zdravljeni zaradi okužbe, so predpisano terapijo večinoma dobro prenašali. Pri enem bolniku se je pojavila alergija za trimetoprim-sulfametoksazol, zato je nadaljeval zdravljenje z amoksicilinom s klavulansko kislino; pri drugem bolniku pa je bila alergija za trimetoprim-sulfometoksazol poznana že od prej, zato je bilo zdravljenje že začeto z amoksicilinom s klavulansko kislino.

Izvenpljučne prizadetosti v naši skupini bolnikov nismo ugotavljali.

Pri enem bolniku s pljučnim rakom je izolacija nokardije iz izmečka, oddanega ob sprejemu v bolnišnico, zaradi napredovale osnovne bolezni prišla šele po smrti. Po oceni lečečega zdravnika izolacija nokardije ni bila v povezavi s slabšanjem osnovne bolezni.

Dva bolnika z nokardijo, izolirano iz izmečka, sta bila zdravljena zaradi atipične mikobakterioze, izolacija nokardij pa je bila smatrana za kolonizacijo.

ZAKLJUČKI

Prepoznavanje okužbe z *Nocardio* spp. je z vidika uspeha zdravljenja in pravočasno predpisane ustrezne terapije zelo pomembno. Pravočasno postavitev diagnoze otežuje netipična klinična, laboratorijska in radiološka predstavitev.

Zaradi netipične klinične slike, ki je zaradi že predhodno predpisane terapije pogosto še dodatno zabrisana, je lahko prepoznavanje nokardioze v skupini bolnikov, ki imajo iz katerega koli vzroka okvaro imunskega sistema, še posebej problematično.

LITERATURA

1. Beaman BL, Burnside J, Edwards B, et al. Nocardial infections in the United States 1972-1974. J Infect Dis. 1976; 134 (3): 286–9.
2. Wilson JW. Nocardiosis: Updates and clinical overview. Mayo Clin Proc. 2012; 87 (4): 403–7.
3. Muñoz J, Mirelis B, Aragón LM, et al. Clinical and microbiological features of nocardiosis 1997-2003. J Med Microbiol. 2007; 56 (Pt 4): 545–50.
4. Matulionyte R, Rohner P, Uçkay I, et al. Secular trends of Nocardia infection over 15 years in a tertiary care hospital. J Clin Pathol. 2004; 57 (8): 807–12.
5. Garcia-Bellmunt L, Sibila O, Solanes I, et al. Pulmonary nocardiosis in patients with COPD: Characteristics and prognostic factors. Arch Bronconeumol. 2012; 48 (8): 280–5.

Renato Eržen[1], Luka Rebolj[2], Viktorija Tomič[3]

Zunajbolnišnične pljučnice pri odraslih – izkušnje Klinike Golnik

Community-Acquired Pneumonia in Adults–Experience from Golnik Hospital

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: zunajbolnišnična pljučnica, odrasli, Klinika Golnik

IZHODIŠČA. Zunajbolnišnična pljučnica je pogosta bolezen. Incidenca zunajbolnišnične pljučnice (ZBP) v zadnjih letih narašča. Z raziskavo smo želeli opredeliti klinične in mikrobiološke značilnosti ter kakovost obravnave bolnikov z ZBP na Kliniki Golnik. METODE. Raziskava je retrospektivna. Vanjo smo vključili 100 bolnikov, ki so bili v letu 2015 na Kliniki Golnik obravnavani zaradi ZBP. Podatke smo zbrali iz bolniške dokumentacije in bolnišničnega informacijskega sistema. REZULTATI. Devetinpetdeset odstotkov bolnikov je bilo moških, povprečna starost je 73,5 let. Vsaj dve pridruženi kronični bolezni je imelo 61 % bolnikov. Težko klinično sliko ZBP je imelo ob sprejemu 71 % bolnikov. Iz kužnin smo najpogosteje izolirali *Streptococcus pneumoniae*, ki je bil občutljiv na testirane antibiotike. Povprečno trajanje intravenskega antibiotičnega zdravljenja je bilo pet dni. Povprečna ležalna doba je znašala 11,9 dni. Umrlo je 6 % bolnikov. ZAKLJUČKI. V bolnišnici smo obravnavali bolnike s težko klinično sliko ZBP. Obravnava bolnikov je kakovostna v skladu z veljavnimi priporočili. Občutljivost povzročiteljev na antibiotike je dobra.

ABSTRACT

KEY WORDS: community-acquired pneumonia, adults, Hospital Golnik

BACKGROUNDS. Community-acquired pneumonia (CAP) is a frequent disease. The incidence of CAP is increasing. In our analysis, we wanted to evaluate clinical and microbiological properties of CAP patients and the quality of CAP treatment in Golnik Hospital. METHODS. In this retrospective study we analyzed data from 100 patients who were hospitalized in Golnik Hospital in 2015 due to CAP. The data were collected from patients' files and in-hospital information system. RESULTS. Fifty-nine percent of patients were men; the average age was 73.5 years. Sixty-one percent of patients had at least two chronic diseases, 71 % of patients had a severe form of CAP at admittance. *Streptococcus pneumoniae* was the most frequently isolated causative agent with good sensitivity to antibiotics. Average duration of intravenous antibiotic treatment was 5 days. The average hospital stay was 11.9 days. Six percent of patients died. CONCLUSIONS. Patients with severe form of CAP were mostly treated in hospital. Patients were treated according to the recommended guidelines. Causative agents showed good sensitivity to the tested antibiotics.

[1] Doc. dr. Renato Eržen, dr. med., Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik 36, 4204 Golnik; renato.erzen@klinika-golnik.si

[2] Luka Rebolj, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

[3] Doc. dr. Viktorija Tomič, dr. med., Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik 36, 4204 Golnik

UVOD

Okužbe spodnjih dihal so na petem mestu med vzroki smrtnosti v svetovnem merilu. V Evropi je pljučnica na prvem mestu med infektivnimi vzroki smrtnosti in predstavlja veliko ekonomsko breme *(1)*. Incidenca pljučnice je odvisna od spola, starosti in pridruženih kroničnih bolezni. Pogostejša je pri moških, starostnikih in bolnikih s pridruženimi boleznimi ter znaša v različnih skupinah od 0,8 do 10 zbolelih na 1.000 prebivalcev na leto *(2)*. Ob trendu staranja populacije lahko pričakujemo, da se bosta incidenca pljučnice in z njo povezano ekonomsko breme v prihodnjih letih še povečevala.

Pljučnice razdelimo na zunajbolnišnične pljučnice (ZBP), bolnišnične pljučnice in pljučnice pri zmanjšani imunski zmožnosti *(3)*. Razdelitev omogoča hitro oceno ogroženosti bolnika, pomaga pri usmeritvi v ustrezne diagnostične preiskave in izbiri izkustvenega antibiotičnega zdravljenja. Kategoriji pljučnica pri bolnikih iz domov za ostarele in z zdravstveno oskrbo povezana pljučnica sodita med zunajbolnišnične pljučnice. Nekatere evropske raziskave so namreč dokazale, da je pogostnost na antibiotike odpornih povzročiteljev v teh dveh skupinah tako majhna, da tako kot zunajbolnišnične pljučnice ne zahteva prilagoditve antibiotičnega zdravljenja.

Kljub tradicionalni mikrobiološki diagnostiki in novejšim molekularnim diagnostičnim metodam ostaja etiologija ZBP neprepoznana v približno 50 %. Najpogostejši povzročitelj ostaja *S. pneumoniae*, po pogostosti mu sledijo atipične bakterije in respiratorni virusi. Pri bolnikih s kronično obstruktivno pljučno boleznijo (KOPB) in starejših bolnikih s pridruženimi boleznimi pogosto izoliramo *Haemophilus influenzae* in *Moraxella catarrhalis*. Okužbo z bakterijami iz družine *Enterobacteriaceae* in s *Pseudomonas aeruginosa* najdemo pri bolnikih s hudo strukturno okvaro pljuč in/ali z napredovalo obliko KOPB.

Klinična slika ZBP je lahko različno težka. Pri oceni intenzivnosti klinične slike nam pomagajo različni točkovni sistemi (CURB-65, PORT) *(4)*. Na osnovi intenzivnosti klinične slike ZBP se odločamo o mestu in načinu zdravljenja, o vrsti podpornega zdravljenja in predvsem o izkustveni izbiri antibiotika.

Z raziskavo smo želeli opredeliti klinične in mikrobiološke značilnosti ter kakovost obravnave bolnikov z ZBP na Kliniki Golnik.

METODE

Raziskava je retrospektivna. Vanjo smo vključili 100 bolnikov, ki so izpolnjevali vključitvene kriterije:

- hospitalizacija na Kliniki Golnik v letu 2015,
- delovna diagnoza zunajbolnišnične pljučnice,
- odpustna diagnoza pljučnica (MKB J12 do J18.9).

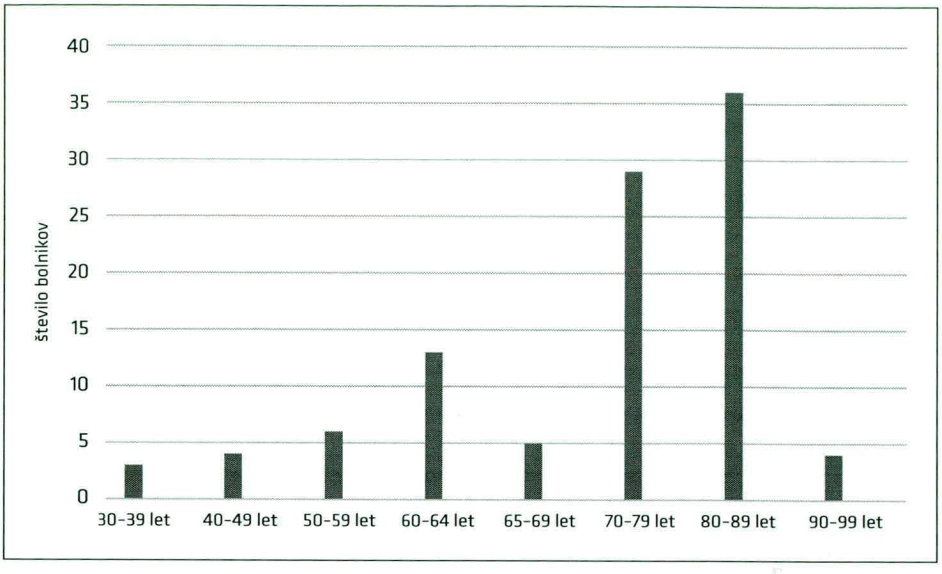
Podatke smo pridobili iz informacijskega sistema BIRPIS in bolniške dokumentacije. Zbrali smo podatke o starosti in spolu bolnikov, anamnestične podatke, podatke o klinični sliki z oceno intenzivnosti, rentgenološke, laboratorijske in mikrobiološke podatke, podatke o vrsti in trajanju antibiotičnega zdravljenja, ležalni dobi in umrljivosti.

Ker smo v raziskavo vključili 100 bolnikov, število primerov istočasno predstavlja odstotek.

REZULTATI

V letu 2015 je bilo zaradi ZBP na Kliniki Golnik hospitaliziranih 1.057 bolnikov. Iz skupine smo naključno izbrali vzorec 100 bolnikov in jih vključili v raziskavo.

V vzorcu je bilo 59 moških in 41 žensk. Bolniki so bili stari od 30 do 98 let, povprečna starost je bila 73,5 let. 74 bolnikov je bilo starejših od 65 let. Starostne kategorije bolnikov z ZBP prikazuje slika 1.



Slika 1. Starostne kategorije bolnikov z zunajbolnišnično pljučnico.

Brez pridruženih kroničnih bolezni je bilo 19 bolnikov, 20 bolnikov se je zdravilo zaradi ene pridružene kronične bolezni, 61 bolnikov je imelo najmanj dve pridruženi kronični bolezni. Najpogostejša pridružena kronična bolezen je bila arterijska hipertenzija pri 58 bolnikih, sladkorno bolezen je imelo 25 bolnikov, zaradi KOPB se je istočasno zdravilo 24 bolnikov.

Oceno intenzivnosti ZBP smo izvedli s pomočjo točkovnega sistema PORT. Lahko obliko ZBP je imelo šest bolnikov, srednje težko 23 bolnikov in težko obliko 71 bolnikov.

Med 100 bolniki z ZBP je bilo deset varovancev domov za ostarele.

V klinični sliki ob sprejemu smo največkrat zabeležili povišano telesno temperaturo (pri 69 bolnikih) in povišano frekvenco dihanja (pri 59 bolnikih). Kašelj je navajalo 70 bolnikov, gnojno izkašljevanje pa le 26 bolnikov. Hemoptizo je imelo 6 bolnikov. Zmedenost kot simptom smo opazili pri 17 bolnikih.

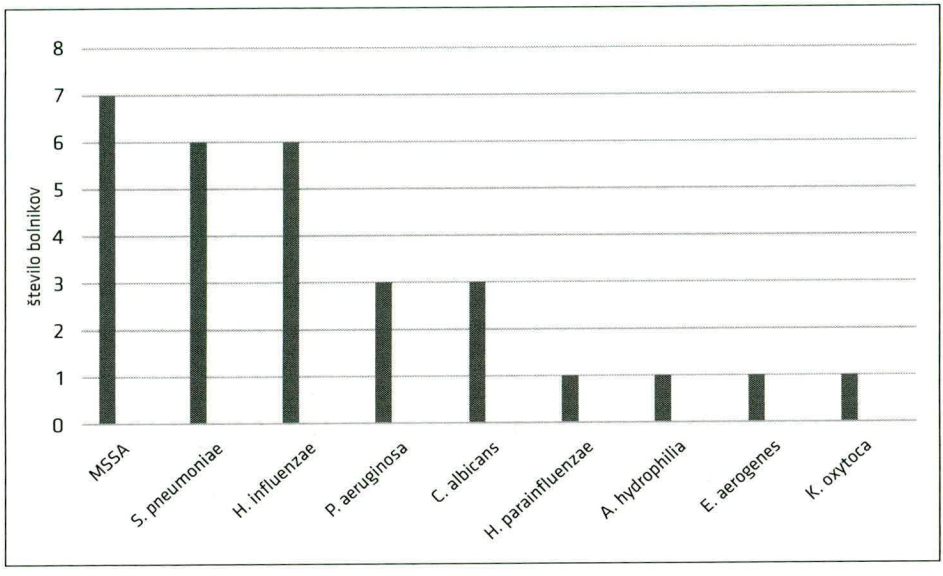
Na rentgenogramu prsnih organov je bil viden vnetni infiltrat v enem pljučnem režnju pri 73 bolnikih, v dveh pljučnih režnjih pri 22 bolnikih in v treh ali več pljučnih režnjih pri petih bolnikih. Plevralni izliv smo opisovali pri 25 bolnikih.

Med laboratorijskimi izvidi smo zabeležili:

- povečano koncentracijo C-reaktivnega proteina nad 100 mg/l pri 55 bolnikih,
- levkocitozo pri 59 bolnikih,
- elektrolitske motnje pri 33 bolnikih,
- zmanjšano ledvično funkcijo pri 31 bolnikih in
- patološke teste jetrne funkcije pri 37 bolnikih.

Povzročitelja smo uspeli identificirati pri 32 bolnikih: pri 23 bolnikih iz izmečka, pri petih bolnikih iz hemokultur, trije bolniki so imeli pozitiven Legionella antigen v urinu in en bolnik pozitivne serološke teste na respiratorne viruse. Pri štirih bolnikih se je ZBP razvila ob prebolevanju gripe.

Izmeček za mikrobiološke preiskave je oddalo 66 bolnikov. V 23 vzorcih (35 %) smo izolirali povzročitelja: na



Slika 2. Izolati iz izmečka pri bolnikih z zunajbolnišnično pljučnico. MSSA – na meticilin občutljiv *Staphylococcus aureus* (angl. *methicillin sensitive Staphylococcus aureus*)

meticilin občutljiv *Staphylococcus aureus* (angl. *methicillin sensitive S. aureus*, MSSA) pri sedmih bolnikih, *S. pneumoniae* pri šestih bolnikih, *H. influenzae* pri šestih bolnikih, *P. aeruginosa* pri treh bolnikih, *Candida albicans* pri treh bolnikih, po en izolat je bil pozitiven za *Haemophilus parainfluenzae*, *Aeromonas hydrophilia*, *Enterobacter aerogenes* in *Klebsiella oxytoca*. Iz sedmih vzorcev izmečka smo izolirali več kot enega povzročitelja. Izolate iz izmečka pri bolnikih z ZBP prikazuje slika 2.

Hemokulture smo odvzeli pri 45 bolnikih. V sedmih vzorcih (16 %) smo izolirali povzročitelja: *S. pneumoniae* pri šestih bolnikih in *Escherichia coli* pri enem bolniku. Vsi sevi *S. pneumoniae* so bili občutljivi na testirane antibiotike.

Bolniki so intravensko antibiotično terapijo prejemali povprečno pet dni, antibiotično zdravljenje v celoti pa je povprečno trajalo deset dni. Amoksicilin s klavulansko kislino je kot začetno antibiotično zdravljenje prejemalo 48 bolnikov, kombinacijo amoksicilina s klavulansko kislino in makrolida 16 bolnikov, moksifloksacin 19 bolnikov, makrolide pet bolnikov, cefalosporine pet bolnikov, piperacilin – tazobaktam pa sedem bolnikov.

Ležalna doba je znašala dva do 49 dni, povprečno 11,9 dni. Dva bolnika sta bila hospitalizirana dlje kot 30 dni. Umrlo je šest bolnikov.

RAZPRAVA

Pogostost ZBP v zadnjih letih narašča. Glede na podatke predhodno opravljenih raziskav se je število hospitaliziranih bolnikov z ZBP na Kliniki Golnik vsako leto povečevalo. Leta 2002 smo zaradi ZBP obravnavali 367 bolnikov, leta 2006 866 bolnikov, lani pa 1.057 bolnikov. Vzroke je iskati predvsem v staranju populacije. ZBP je pogostejša v starejši populaciji s pridruženimi kroničnimi boleznimi. Tudi v naši skupini bolnikov gre za visok odstotek starejših od 65 let s številnimi pridruženimi kroničnimi boleznimi. Pridružene kronične bolezni so verjetno

najpomembnejši dejavnik, ki napovedujejo ogroženost bolnika, prispevajo k težji klinični sliki, pa tudi k manjši možnosti uspešnega izida zdravljenja.

Visoka starost in pridruženost kroničnih bolezni sta tudi dejavnika, ki ju v oceni intenzivnosti klinične slike ZBP upoštevajo točkovni sistemi in pomembno prispevata k težji klinični sliki. Visok odstotek srednje težke in težke klinične slike ZBP je v naši skupini pričakovan in je tudi v skladu s priporočili, da težke oblike ZBP obravnavamo v bolnišnici.

V klinični sliki nekoliko preseneča nizek odstotek bolnikov z gnojnim izkašljevanjem, ki velja za enega glavnih simptomov ZBP. Pri starejših je zaradi oslabelosti in morebitnih pridruženih nevroloških obolenj izkašljevanje oteženo. Pri starejših bolnikih se je včasih kot edini simptom ZBP nenadno pojavila zmedenost.

Med laboratorijskimi izvidi je razen povišanih vnetnih parametrov potrebno usmeriti pozornost na morebitne elektrolitske motnje in zmanjšano delovanje ledvic in jeter, ki so v naši skupini prisotni pri tretjini bolnikov, ter izvidom prilagoditi podporno zdravljenje in ustrezno znižati odmerek antibiotika.

Identifikacija povzročitelja je bila uspešna v sorazmerno nizkem odstotku. Pri starejših bolnikih je odvzem izmečka za mikrobiološke preiskave zaradi oslabelosti otežen, možnost kontaminacije z mikroorganizmi iz ustnega žrela pa velika. Izolirane bakterije so v skladu s pričakovanji in so podobne povzročiteljem v prejšnjih raziskavah. Razveseljuje dejstvo, da so vsi sevi izoliranega *S. pneumoniae* občutljivi na penicilin. *P. aeruginosa* in druge na antibiotike odporne mikroorganizme smo izolirali pri bolnikih z bronhektazijami in napredovalimi oblikami KOPB. Preredko se odločamo za odvzem hemokultur, saj je predvsem pri starostniku izolacija povzročitelja ZBP iz hemokultur najbolj zanesljiva.

Povprečno trajanje intravenske uvedbe antibiotika je glede na priporočila nekoliko predolgo *(6)*. Tudi to bi lahko razložili s starostjo in s pridruženimi boleznimi bolnikov v izbranem vzorcu, ki lahko povzročata težave pri hranjenju oziroma peroralni aplikaciji zdravil. Dolžina antibiotičnega zdravljenja v celoti je primerna in v skladu s priporočili. Tudi izbor izkustvenega antibiotičnega zdravljenja je glede na klinične značilnosti bolnikov primeren, v skladu s priporočili in približno enak kot v predhodnih raziskavah. Najpogosteje se odločamo za amoksicilin s klavulansko kislino in respiratorne kinolone.

Povprečna ležalna doba je dolga, v primerjavi s predhodnimi analizami se je še podaljšala (leta 2006 je znašala 11,2 dni). Podaljšanje ležalne dobe najverjetneje ni posledica zdravljenja ZBP, pač pa zdravljenja pridruženih kroničnih bolezni, ki so se zaradi ZBP poslabšale.

Smrtnost je v izbranem vzorcu 6 %, kar je pri taki starostni strukturi bolnikov in težki klinični sliki ZBP relativno nizek odstotek in kaže na kakovostno zdravljenje tako ZBP kot pridruženih kroničnih bolezni.

ZAKLJUČEK

Pogostost ZBP v zadnjih letih narašča. Hospitalizirani so predvsem starejši bolniki s številnimi pridruženimi kroničnimi boleznimi in težko klinično sliko ZBP, kar se odraža v težavah pri izolaciji povzročitelja in podaljšanju ležalne dobe. Občutljivost izoliranih povzročiteljev na antibiotike je dobra. Izkustvena izbira antibiotičnega zdravljenja je v skladu z veljavnimi priporočili. Celostna obravnava bolnikov z ZBP, ki zajema podporno zdravljenje in zdravljenje sočasnih kroničnih bolezni, je kakovostna in ima za posledico nizko umrljivost.

LITERATURA

1. Torres A, Peetermans WE, Viegi G, et al. Risk factors for community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. Thorax. 2013; 68 (11): 1057–65.
2. Almirall J, Bolibar I, Vidal J, et al. Epidemiology of community-acquired pneumonia in adults: a population-based study. Eur Respir J. 2000; 15 (4): 757–63.
3. Ewig S. The pneumonia triad. Eur Respir Monogr. 2014; 63: 13–24.
4. ERS Task Force Report. Guidelines for management of adult community-acquired lower respiratory tract infections. European Respiratory Society. Eur Respir J. 1998; 11 (4): 986–91.
5. Eržen R, Mušič E, Košnik M. Clinical pathway as a tool of improving quality of care in patients with CAP. Eur Respir J. 2007; 30 Suppl 51: [P3932].
6. Mušič E, Osolnik K, Tomič V, et al. Priporočila za obravnavo zunajbolnišnične pljučnice odraslih (prenovljena in dopolnjena izdaja). Zdrav Vestn. 2010; 79 (3): 245–164.

Irena Šarc[1]

Respiratorne okužbe in neinvazivna mehanska ventilacija

Pulmonary Infections and Non-invasive Mechanical Ventilation

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: neinvazivna mehanska ventilacija, kronična obstruktivna pljučna bolezen, z ventilatorjem povezana pljučnica, virusne okužbe, preprečevanje širjenja okužb

Z uporabo neinvazivne mehanske ventilacije se pri izbrani skupini bolnikov z respiratornimi okužbami lahko izognemo potrebi po intubaciji, skrajšamo trajanje bolnišnične obravnave in zmanjšamo umrljivost. Uporaba neinvazivne mehanske ventilacije pri bolnikih z nalezljivimi virusnimi okužbami je povezana s povečanim tveganjem prenosa okužbe na sobolnike in zdravstveno osebje, zato je potrebno upoštevanje dodatnih ukrepov.

ABSTRACT

KEY WORDS: non-invasive mechanical ventilation, chronic obstructive pulmonary disease, ventilator-associated pneumonia, viral infections, infection prevention

Non-invasive mechanical ventilation in a selected group of patients with acute pulmonary infections can reduce endotracheal intubation, shorten the length of hospital stay and reduce mortality. The use of non-invasive mechanical ventilation in patients with viral infections is associated with increased risk of disease transmission to other patients and healthcare workers, requiring strict infection control measures.

[1] Asist. mag. Irena Šarc, dr. med., Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik 36, 4204 Golnik; irena.sarc@klinika-golnik.si

UVOD

Neinvazivna mehanska ventilacija (NIMV) je ventilatorna podpora dihanju pri dihalni odpovedi brez uporabe invazivne umetne dihalne poti. Namesto endotrahealnega tubusa pri NIMV uporabljamo različne maske (nosne, ustne-nosne, obrazne) ali čelado (angl. *helmet*). Uporaba NIMV je dobro učinkovita pri akutni hiperkapnični respiratorni odpovedi, posebej pri kronični obstruktivni pljučni bolezni (KOPB) in hipoventilaciji zaradi debelosti (angl. *obesity hypoventilation syndrom*, OHS). Manj jasna je njena vloga v primeru akutne hipoksemične respiratorne odpovedi, ki se pogosto razvije ob hujšem poteku respiratornih okužb.

Prednost zgodnje uporabe NIMV, če je uporabljena v izbrani skupini bolnikov in učinkovita, je manjša stopnja zapletov, vezanih na intubacijo in invazivno mehansko ventilacijo (IMV), posebej zmanjšanje pogostosti bolnišničnih okužb. Pogostost bolnišnične pljučnice pri uporabi NIMV je relativno nizka, 3,1 % v eni od raziskav, v primerjavi s pogostostjo z ventilatorjem povezane pljučnice, ki se pojavi pri 8 do 28 % bolnikov na IMV *(1, 2)*.

NEINVAZIVNA MEHANSKA VENTILACIJA PRI AKUTNEM POSLABŠANJU KRONIČNE OBSTRUKTIVNE PLJUČNE BOLEZNI

Akutna poslabšanja KOPB najpogosteje povzročajo respiratorne okužbe, bodisi bakterijske ali virusne, ozadje 20 do 30 % poslabšanj pa ostaja neopredeljeno. Najpogostejši bakterijski povzročitelji so *Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae* in *Moraxella catarrhalis*. Virusne okužbe sprožijo 50 % poslabšanj (najpogosteje rinovirusi, picornavirusi, respiratorni sincicijski virus in virusi gripe), četrtino poslabšanj pa povzročajo mešane bakterijske in virusne okužbe *(3)*. Raziskave so pokazale, da ima od 15 do 20 % hospitaliziranih bolnikov s poslabšanjem KOPB ob sprejemu akutno respiratorno acidozo, ki je indikacija za zdravljenje z NIMV *(4–6)*. Uporaba NIMV dokazano izboljša akutno respiratorno acidozo, zniža frekvenco dihanja, zmanjša dihalno delo, dušenje, zmanjša pogostost zapletov, kot je z ventilatorjem povezana pljučnica, in dolžino zdravljenja v bolnišnici (stopnja dokaza A). Prav tako je dokazano, da uporaba NIMV znižuje potrebo po intubaciji in umrljivost teh bolnikov (stopnja dokaza A) *(6)*.

Uspešnost NIMV v različnih raziskavah je bila 80 do 85 %. V zadnjih dveh desetletjih je ta metoda dihalne podpore vse bolj uporabljena in zmanjšuje potrebo po uporabi IMV. Potrebna je previdnost pri bolnikih, ki se ne odzivajo na NIMV in se kljub njeni uporabi ne izboljšujejo oz. se njihovo stanje slabša; take bolnike je potrebno prepoznati zgodaj in brez odlašanja preiti na IMV.

NEINVAZIVNA MEHANSKA VENTILACIJA IN RESPIRATORNE OKUŽBE PRI DEBELIH

Debeli posamezniki imajo povečano tveganje za hospitalizacije zaradi respiratornih vzrokov med sezono gripe, neodvisno od pridruženih bolezni *(7)*. V obdobju pandemije gripe A (pH1N1) v sezoni 2009–2010 je bila debelost dejavnik tveganja za težji potek bolezni. Bolezensko debeli imajo pogosto pridružena srčno-žilna, presnovna in pulmološka obolenja, zaradi katerih je potek respiratornih okužb lahko težji. Pogosto se razvije respiratorna odpoved, ki je ponavadi hiperkapnična. Uporaba NIMV je pri akutni hiperkapnični respiratorni odpovedi pri bolezensko debelih podobno kot pri KOPB zelo učinkovita *(8)*. Lemyze in sodelavci so v nedavni raziskavi ugotovili, da sta dejavnika tveganja za neuspeh NIMV pljučnica, ki je bila prisotna pri 28 %, in večorganska odpoved *(9)*.

NEINVAZIVNA MEHANSKA VENTILACIJA PRI BAKTERIJSKIH PLJUČNICAH

Pljučnica in akutna pljučna poškodba, ki povzroči akutno respiratorno odpoved, je najpogostejši resen zaplet respiratornih patogenov. Prisotnost pljučnice je dejavnik tveganja za neuspeh NIMV v primeru akutne respiracijske odpovedi, v nekaj raziskavah je bil neuspeh NIMV povezan s slabšim preživetjem bolnikov z NIMV v primerjavi z bolniki, ki so bili zdravljeni z IMV *(10)*. Ena od starejših raziskav je sicer pokazala, da je pri težki zunajbolnišnični pljučnici uporaba NIMV v primerjavi s standardno terapijo zniža potrebo po intubaciji (21 % proti 50 %) ter dolžino zdravljenja na intenzivni enoti, vendar je bila ta razlika pretežno na račun KOPB-bolnikov s pljučnico *(11)*. Na podlagi metaanaliz so raziskovalci zaključili, da je uporaba NIMV smiselna izbira za izbrane bolnike s pljučnico, posebej bolnike s KOPB, vsekakor pa uporaba NIMV ne sme zakasniti intubacije in IMV pri bolnikih, ki se naglo slabšajo oz. se ne odzivajo na začetno zdravljenje. V primeru obsežnih konsolidacij ali bilateralnih sprememb po pljučih in sindroma dihalne stiske pri odraslem (angl. *acute respiratory distress syndrome*, ARDS), hude hipoksemije in večorganske odpovedi je verjetnost uspeha uporabe NIMV zelo majhna oz. je NIMV celo škodljiva, zato se njena uporaba odsvetuje *(12)*. Nova oblika podpornega zdravljenja bolnikov s hipoksemično respiratorno odpovedjo pri pljučnici je visokopretočna kisikova nosna kanila, ki se v zadnjih letih vse bolj uveljavlja kot dobra alternativa NIMV z ugodnimi rezultati zdravljenja v nekaterih raziskavah *(13)*.

NEINVAZIVNA MEHANSKA VENTILACIJA IN VIRUSNE OKUŽBE

Uporaba NIMV je zanimiva izbira zdravljenja v primeru virusnih (tudi pandemičnih) nalezljivih bolezni, ki povzročajo akutno respiratorno odpoved, saj v tem primeru število obolelih lahko preobremeni omejene zmogljivosti intenzivnih enot, ki omogočajo zdravljenje z IMV, hkrati pa s potencialnim zmanjšanjem potrebe po intubaciji zmanjša s tem povezane zaplete in neugodne izhode zdravljenja.

Hudi akutni respiratorni sindrom (angl. *severe acute respiratory syndrome*, SARS) povzroča nov koronavirus (SARS-CoV), ki se je prvič pojavil na jugu Kitajske konec leta 2002. Virus se v glavnem prenaša kapljično, redkeje prek kontaminiranih površin ali po zraku. Povzročitelj SARSa povzroča težko pljučnico, ki v 10–20 % zahteva zdravljenje na intenzivnem oddelku in uporabo NIMV/IMV in se v 15 % konča s smrtjo *(14)*. Podatke o uporabi NIMV ob izbruhu SARS v obdobju 2002–2003 podajajo predvsem retrospektivne raziskave iz Kitajske, Hong Konga in Kanade *(12, 15)*. Jasni zaključki za bodočo klinično prakso so zaradi retrospektivne narave večine teh raziskav nemogoči, vendarle pa so nekatere od njih pokazale, da je zgodnja uporaba NIMV znižala potrebo po intubaciji in umrljivost bolnikov *(15)*.

Druga pomembna značilnost SARSa je, da je bolezen zelo kužna in da je bila okoli polovica obolelih zdravstvenih delavcev. V večini primerov okužb zdravstvenih delavcev je do prenosa okužbe prišlo v bolnišnici, potek pri teh bolnikih pa je bil težji, domneva se, da zaradi visokega virusnega bremena ob tesnem stiku z močno kužnimi bolniki *(14)*. V zvezi s tem je pomembno, da je uporabo NIMV svetovna zdravstvena organizacija (SZO) uvrstila med postopke, ki potencialno ustvarjajo aerosol in lahko predstavljajo tveganje za prenos patogenov na zdravstveno osebje *(16)*.

V pandemiji gripe A (pH1N1) v sezoni 2009–2010 je do 30 % hospitaliziranih bolnikov potrebovalo obravnavo na inten-

zivnem oddelku, celokupna umljivost za kritično bolne bolnike je bila visoka, do 17 % *(16)*. Značilnost hujšega poteka bolezni je nenadno in hitro napredujoča dihalna odpoved z vztrajajočo refraktarno hipoksemijo in bilateralnimi pljučnimi infiltrati v smislu ARDS. Pri teh bolnikih je ustrezno zdravljenje IMV in oblike zaščitnih strategij ventilacije, NIMV pa pri njihovem zdravljenju nima vloge. Več kot 20 raziskav je poročalo o poskusih z zgodnjo uporabo NIMV pri blažjih oblikah akutne respiratorne odpovedi pri okužbi s pH1N1. V nedavno objavljenem pregledu in povzetku teh raziskav Esquinas in soavtorji zaključujejo, da ima uporaba NIMV vlogo pri zgodnji akutni respiratorni odpovedi pri okužbi s pH1N1, ko lahko izboljša izhode zdravljenja bolnikov, vendar le v nadzorovanem okolju s strogim nadzorom in ukrepi za preprečevanje širjenja okužbe *(16)*.

NEINVAZIVNA MEHANSKA VENTILACIJA IN RESPIRATORNE OKUŽBE PRI IMUNOKOMPROMITIRANIH BOLNIKIH

Okužbe so najpogostejši zaplet pri imunokompromitiranih bolnikih z visoko smrtnostjo (od 30 do 90 %), še posebej v primeru akutne respiratorne odpovedi *(17)*. Potreba po intubaciji in IMV pomeni še dodaten neugoden prognostični dejavnik, zato so v tej populaciji napori preprečiti intubacijo in dodatne zaplete, zlasti z ventilatorjem povezano pljučnico, še posebej intenzivni *(18)*. Nekatere starejše raziskave so pokazale ugodne rezultate zgodnje uporabe NIMV pri akutni respiratorni odpovedi pri imunokompromitiranih bolnikih, saj so pokazale zmanjšanje potrebe po intubaciji in zmanjšanje umrljivosti *(19, 20)*. Na podlagi teh rezultatov so nekatere mednarodne smernice, med drugimi kanadske in nemške, priporočile uporabo NIMV kot prvo izbiro pri akutni dihalni odpovedi v tej populaciji bolnikov *(21, 22)*. V nedavni večji raziskavi pri imunokompromitiranih bolnikih s hipoksemično respiratorno odpovedjo, ki je primerjala zgodnjo NIMV in zdravljenje s kisikom, niso ugotovili razlik v umrljivosti v prvih 28 dneh *(23)*. Natančnejša opredelitev vloge NIMV pri zdravljenju akutne respiratorne odpovedi v tej skupini bolnikov bo nedvomno predmet nadaljnjih raziskav.

TVEGANJE NEINVAZIVNE MEHANSKE VENTILACIJE ZA USTVARJANJE AEROSOLA IN ŠIRJENJE NALEZLJIVIH OKUŽB

Kašljanje in kihanje ustvarja sorazmerno velike delce (> 10 µm) izločkov dihal, ki zaradi svoje teže dosežejo krajše razdalje in kontaminirajo okolje bolniške postelje in ožjega okolja okrog bolnika (do 1 metra), čeprav lahko manjši delci izločkov dosežejo tudi razdalje do 9 m *(16)*.

Manjši delci ali aerosol (delci < 5 µm) ostanejo razpršeni v zraku dalj časa in se razpršijo čez večje razdalje. SZO je uvrstila NIMV med postopke, ki potencialno ustvarjajo aerosol in zato v primeru nalezljivih nevarnih okužb zahtevajo posebne varnostne ukrepe za preprečitev širjenja okužbe.

V nedavni raziskavi Hui in sodelavcev na simuliranih bolnikih so raziskovalci preizkusili razpršitev dima v izdihanem zraku med NIMV s čelado in obrazno masko. Raziskava je pokazala, da je dolžina razpršitve dima v izdihanem zraku odvisna od učinkovitega tesnenja maske oz. čelade ter od višine uporabljenih inspiratornih pritiskov; najmanjšo razpršitev so dosegli z uporabo čelade z dobrim tesnenjem na vratu, z uporabo dvocevnega sistema, z uporabo ustreznih filtrov in z uporabo srednjih inspiratornih pritiskov (radialna razpršitev 2,70 m). Največjo razpršitev so izmerili pri uporabi obrazne maske in enocevnega sistema (9 m) *(24)*. Nekateri dvomijo, da raziskovanje razpr-

ševanja na simuliranih bolnikih in z uporabo dima kot nadomestila za respiratorne izločke natančno predstavlja razmere na živih bolnikih.

Simmondsova in sodelavci so v raziskavi bolnikov z gripo ugotovili, da NIMV in postopki respiratorne fizioterapije ustvarjajo velike delce oz. kapljice pri okuženih bolnikih, vendar omenjena postopka ne ustvarjata aerosola. Delce so zaznali v bližini NIMV maske, vendar pa je njihova gostota pomembno upadla v oddaljenosti 1 metra od postelje, kar dodatno kaže, da gre za večje in težje delce. Raziskava je tudi ugotovila, da so bili protivirusni in bakterijski filtri v valvuli za izdih dobro učinkoviti pri odstranjevanju delcev izločkov iz izdihanega zraka *(25)*.

Zaradi preprečevanja širjenja okužb je več vodilnih avtorjev s področja nedavno objavilo priporočila glede uporabe NIMV pri zdravljenju bolnikov s nalezljivimi boleznimi, kjer svetujejo *(12, 16)*:

- uporabo dvocevnih sistemov (cev za vdih in cev za izdih),
- maske brez odprtin za izdih (angl. *nonvented mask*) oz. še bolje dobro tesneče čelade,
- uporabo visokoučinkovitih protivirusnih in protibakterijskih filtrov, ki filtrirajo delce velikosti 0,3 µm,
- uporabo najnižjih učinkovitih inspiratornih pritiskov, ki so povezani z manjšim puščanjem in tako manjšim razprševanjem delcev v okolico,
- med prekinitvijo ventilacije naj se najprej ugasne ventilator in šele nato odstrani masko in
- v primeru uporabe maske izbira obraznih mask, odsvetuje se uporaba nosne maske zaradi puščanja čez usta.

Na podlagi dosedaj opravljenih raziskav se zdi smiselno izvajanje ukrepov ob nevarnosti kapljičnega prenosa (zaščita dihal z zaščitnimi maskami ob približanju bolniku na manj kot 1 meter, namestitev bolnika v enopostelјno sobo ali kohortna izolacija bolnikov), obenem pa tudi preprečevanje kontaktnega prenosa preko kontaminiranih površin v bližini bolnika, posebej dekontaminacija površin, higena rok, uporaba zaščitnih rokavic in ostalih standardnih ukrepov.

ZAKLJUČEK

Učinkovitost NIMV pri zdravljenju akutne respiratorne odpovedi je odvisna od vrste osnovne bolezni in respiratorne okužbe. Korist je nesporno dokazana pri poslabšanjih KOPB in debelih z akutno hiperkapnično respiratorno odpovedjo. Manj jasno je mesto uporabe NIMV pri hipoksemični respiratorni odpovedi pri bakterijskih pljučnicah in respiratornih okužbah imunokompromitiranih bolnikov. Uporaba NIMV je zgodnja možnost zdravljenja pri izbranih bolnikih z nalezljivimi virusnimi okužbami v zgodnjih fazah akutne respiratorne odpovedi, saj lahko prepreči potrebo po intubaciji in zato zmanjša zaplete, povezane z IMV, če je NIMV uporabljena v enotah z dobro usposobljenim osebjem. Uporaba NIMV je neučinkovita in potencialno škodljiva pri hitro napredujoči dihalni odpovedi z vztrajajočo refraktarno hipoksemijo, z razvojem ARDS in večorganske odpovedi pri bakterijskih pljučnicah in respiratornih virusnih okužbah.

Uporaba NIMV ustvarja kapljice oz. večje delce respiratornih izločkov, ki predstavljajo tveganje za prenos okužbe na sobolnike in zdravstveno osebje. Virusne okužbe, vključno z gripo, so pogoste pri poslabšanjih KOPB in debelih z akutno respiratorno odpovedjo, pri katerih je NIMV pomemben del zdravljenja. Potrebna je skrb za zgodnjo identifikacijo kužnih bolnikov in izvedba ustreznih ukrepov za preprečitev širjenja okužbe.

LITERATURA

1. Zhang Z, Duan J. Nosocomial pneumonia in non-invasive ventilation patients: incidence, characteristics, and outcomes. J Hosp Infect. 2015; 91 (2): 153–7.
2. Friedman C, Newsom W, eds. IFIC Basic Concepts of Infection Control. United Kingdom: International Federation of Infection Control; 2011. p. 81–108.
3. *Škrgat Kristan* S, Šifrer F, Kopčavar Guček N, et al. Stališče do obravnave akutnega poslabšanja kronične obstruktivne pljučne bolezni (apKOPB). Zdrav Vestn. 2009; 78: 19–32.
4. Plant PK, Owen JL, Elliott MW. One year period prevalence study of respiratory acidosis in acute exacerbations of COPD: implications for the provision of non-invasive ventilation and oxygen administration. Thorax. 2000; 55 (7): 550–4.
5. Lun CT, Tsui MS, Cheng SL, et al. Differences in baseline factors and survival between normocapnia, compensated respiratory acidosis and decompensated respiratory acidosis in COPD exacerbation: A pilot study. Respirology. 2016; 21 (1): 128–36.
6. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease [internet]. 2016 [citirano 2016 Oct 10]. Dosegljivo na: www.goldcopd.com
7. Kwong JC, Campitelli MA, Rosella LC. Obesity and respiratory hospitalizations during influenza seasons in Ontario, Canada: a cohort study. Clin Infect Dis. 2011; 53 (5): 413–21.
8. Carrillo A, Ferrer M, Gonzalez-Diaz G, et al. Noninvasive ventilation in acute hypercapnic respiratory failure caused by obesity hypoventilation syndrome and chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 2012; 186 (12): 1279–85.
9. Lemyze M, Taufour P, Duhamel A, et al. Determinants of noninvasive ventilation success or failure in morbidly obese patients in acute respiratory failure. PLoS One. 2014; 9 (5): e97563.
10. Antonelli M, Conti G, Moro ML, et al. Predictors of failure of noninvasive positive pressure ventilation in patients with acute hypoxemic respiratory failure: a multi-center study. Intensive Care Med. 2001; 27 (11): 1718–28.
11. Confalonieri M, Potena A, Carbone G, et al. Acute respiratory failure in patients with severe community--acquired pneumonia. A prospective randomized evaluation of noninvasive ventilation. Am J Respir Crit Care Med. 1999; 160 (5 Pt 1): 1585–91.
12. Simonds AK. ERS Practical Handbook of Noninvasive Ventilation. United Kingdom: The European Respiratory Society; 2015.
13 Frat JP, Thille AW, Mercat A, et al. High-flow oxygen through nasal cannula in acute hypoxemic respiratory failure. N Engl J Med. 2015; 372 (23): 2185–96.
14. Trampuz A, Rezar L, Tomič V, et al. SARS (hudi akutni respiratorni sindrom) – nov izziv za človeštvo. Zdrav Vestn. 2003; 72: 453–60.
15. Yam LY, Chan AY, Cheung TM, et al. Non-invasive versus invasive mechanical ventilation for respiratory failure in severe acute respiratory syndrome. Chin Med J (Engl). 2005; 118 (17): 1413–21.
16. Esquinas AM, Egbert Pravinkumar S, Scala R, et al. Noninvasive mechanical ventilation in high-risk pulmonary infections: a clinical review. Eur Respir Rev. 2014; 23 (134): 427–38.
17. Linden PK. Approach to the immunocompromised host with infection in the intensive care unit. Infect Dis Clin North Am. 2009; 23 (3): 535–56.
18. Azoulay E, Mokart D, Pène F, et al. Outcomes of critically ill patients with hematologic malignancies: prospective multicenter data from France and Belgium--a groupe de recherche respiratoire en réanimation onco-hématologique study. J Clin Oncol. 2013; 31 (22): 2810–8.
19. Antonelli M, Conti G, Bufi M, et al. Noninvasive ventilation for treatment of acute respiratory failure in patients undergoing solid organ transplantation: a randomized trial. JAMA. 2000; 283 (2): 235–41.
20. Hilbert G, Gruson D, Vargas F, et al. Noninvasive ventilation in immunosuppressed patients with pulmonary infiltrates, fever, and acute respiratory failure. N Engl J Med. 2001; 344 (7): 481–7.
21. Keenan SP, Sinuff T, Burns KE, et al. Clinical practice guidelines for the use of noninvasive positive-pressure ventilation and noninvasive continuous positive airway pressure in the acute care setting. CMAJ. 2011; 183 (3): E195–214.
22. Schönhofer B, Kuhlen R, Neumann P, et al. Clinical practice guideline: non-invasive mechanical ventilation as treatment of acute respiratory failure. Dtsch Arztebl Int. 2008; 105 (24): 424–33.

23. Lemiale V, Mokart D, Resche-Rigon M, et al. Effect of Noninvasive Ventilation vs Oxygen Therapy on Mortality Among Immunocompromised Patients With Acute Respiratory Failure: A Randomized Clinical Trial. JAMA. 2015; 314 (16): 1711–9.

24. Hui DS, Chow BK, Lo T, et al. Exhaled air dispersion during noninvasive ventilation via helmets and a total facemask. Chest. 2015; 147 (5): 1336–43.

25. Simonds AK, Hanak A, Chatwin M, et al. Evaluation of droplet dispersion during non-invasive ventilation, oxygen therapy, nebuliser treatment and chest physiotherapy in clinical practice: implications for management of pandemic influenza and other airborne infections. Health Technol Assess. 2010;14 (46): 131–72.

Ana Kotnik Pirš[1]

Okužbe dihal pri bolnikih s cistično fibrozo

Respiratory Infections in Patients with Cystic Fibrosis

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: cistična fibroza, okužbe dihal, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Aspergillus fumigatus*, netuberkulozne mikobakterije

Cistična fibroza je najpogostejša dedna redka bolezen belcev. Bolezen večinoma prizadene praktično vse organske sisteme v telesu, predvsem pa pljuča. Kronično vnetje dihalih poti sčasoma vodi v kronično dihalno odpoved, potrebo po presaditvi pljuč in smrt. Poslabšanja bolezni povzročajo bakterije, glive in virusi. Pojavnost in raznolikost mikroorganizmov v dihalih bolnikov s cistično fibrozo se s starostjo spreminja. Za zgodnjo otroško dobo so značilne predvsem okužbe z bakterijami *Haemophilus influenzae* in *Staphylococcus aureus* ter virusne okužbe dihal. Kasneje postanejo pogostejše okužbe z bakterijami *Pseudomonas aeruginosa, Stenotrophomonas maltophilia, Achromobacter xylosoxidans* in vrstami iz kompleksa *Burkholderia cepacia,* od gliv pa predvsem *Aspergillus fumigatus.* V zadnjem času ugotavljamo vse večjo pomembnost okužbe z netuberkuloznimi mikobakterijami.

ABSTRACT

KEY WORDS: cystic fibrosis, respiratory infections, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Aspergillus fumigatus*, non-tuberculous mycobacteria

Cystic fibrosis is the most common inherited rare disease among the Caucasian population. It is a multiorgan disease but it mostly affects the lungs. Chronic infection and inflammation of the airways cause progressive lung damage that leads to end stage lung disease, a need for lung transplantation and eventually death. Respiratory exacerbations are caused by bacteria, fungi and viruses. The diversity of microorganisms in the airways of cystic fibrosis patients narrows with age and disease stage. Isolation of *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* is most common in childhood. Infection with *Pseudomonas aeruginosa, Stenotrophomonas maltophilia, Achromobacter xylosoxidans, Burkholderia cepacia,* and *Aspergillus fumigatus* becomes more common with age. Nontuberculous mycobacteria are becoming increasingly important pathogens.

[1] Asist. Ana Kotnik Pirš, dr. med., Služba za pljučne bolezni, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Bohoričeva ulica 20, 1000 Ljubljana; Katedra za pediatrijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Bohoričeva ulica 20, 1000 Ljubljana; ana.kotnikpirs@kclj.si

UVOD

Cistična fibroza (CF) je najpogostejša dedna redka bolezen belcev. Na svetu ima CF okoli 70.000 ljudi, 35.000 bolnikov je v Evropi *(1)*. V Sloveniji je pojavnost bolezni 1 : 4.500 živorojenih otrok, kar pomeni, da se vsako leto rodi 4–5 otrok s CF. Trenutno je v Sloveniji znanih okoli 120 bolnikov s potrjeno diagnozo CF *(2)*. Bolezen je dedna in se prenaša s staršev, ki so za bolezen prenašalci, na otroka, pri katerem se bolezen izrazi. CF povzroča mutacija gena *CFTR* (angl. *Cystic Fibrosis Related Transmembrane Conductance Regulator*) na kromosomu 7. Okvara gena *CFTR* vpliva na količino in/ali delovanje beljakovine CFTR, ki je kloridni kanalček na apikalni membrani epitelijskih celic. Te najdemo praktično v vseh organskih sistemih, zato je za bolezen značilna sistemska prizadetost. Za vse bolnike s CF je značilna prizadetost dihal. Kronično vnetje dihalih poti sčasoma vodi v kronično dihalno odpoved, potrebo po presaditvi pljuč in smrt *(3)*.

Spremenjeno delovanje ali pa popolna odsotnost kloridnih kanalčkov na apikalni membrani epitelijskih celic spremeni ravnovesje v prehajanju kloridnih ionov med notranjostjo in zunanjostjo celice. To ima za posledico gosto, viskozno sluz v dihalnih poteh. Nabiranje goste sluzi na površini dihalnih poti ovira delovanje respiratornih migetalk – cilij, katerih glavna naloga je odstranjevanje sluzi in tujkov iz dihalnih poti – mukociliarno čiščenje (angl. *mucociliary clearence*). Zmanjšano mukociliarno čiščenje dihalnih poti povečuje zastajanje goste sluzi, ki je odlično gojišče za rast bakterij in gliv. Posledica je kronično vnetje in kronične spremembe dihalnih poti, ki pa dodatno prispevajo k zmanjšanemu mukociliarnemu čiščenju in vztrajajočemu zastajanju bakterij in vnetju *(4)*.

OKUŽBE DIHAL PRI BOLNIKIH S CISTIČNO FIBROZO PO STAROSTNIH OBDOBJIH

Pojavnost in raznolikost mikroorganizmov v dihalih bolnikov s CF se s starostjo spreminja. Za zgodnjo otroško dobo so značilne predvsem okužbe z bakterijami *Haemophilus influenzae* in *Staphylococcus aureus* ter virusne okužbe dihal. Kasneje postanejo pogostejše okužbe z bakterijami *Pseudomonas aeruginosa, Stenotrophomonas maltophilia, Achromobacter xylosoxidans* in vrstami iz kompleksa *Burkholderia cepacia* od gliv pa predvsem *Aspergillus fumigatus*. V zadnjem času imamo vse več podatkov o vplivu okužbe z netuberkuloznimi mikobakterijami na povečano obolevnost in umrljivost bolnikov s CF *(4)*.

Zgodnja otroška doba

V državah brez presejanja novorojenčkov za CF, bolezen diagnosticiramo glede na klinično sliko. V Sloveniji je mediana starost ob postavitvi diagnoze šest mesecev, pri večini bolnikov pa bolezen odkrijemo do drugega leta starosti. Prvi klinični znaki so običajno povezani s prebavili. Dojenčki zaradi slabega presnavljanja maščob iz hrane odvajajo velike količine sluzastega, mastnega, svetlega blata. Ob tem slabo napredujejo na telesni teži in dolžini *(5)*. Težave zaradi okužb dihal se klinično pokažejo kasneje, znano pa je, da prisotnost bakterij v dihalnih poteh kljub odsotnosti kliničnih težav vseskozi povzroča nastajanje kroničnih sprememb v dihalnih poteh *(6)*. Leta 2013 so Sly in sodelavci objavili raziskavo, v katero je bilo vključenih 127 otrok, ki so jim s presejalnimi testi novorojenčkov CF diagnosticirali ob rojstvu. Otroke so sledili od postavitve diagnoze do tretjega leta starosti. V starostih treh mesecev, enega leta in treh let so pri vseh vključenih otrocih naredili bronhoskopijo in CT pljuč. Ugotovili so, da je imela kar tretjina otrok že v starosti treh mesecev na CT začetne spremembe

dihalnih poti, ki so posledica vnetja. Nepovratne kronične spremembe dihalnih poti (bronhiektazije) pa je imelo v starosti enega leta 14 % preiskovanih otrok in v starosti treh let kar 32 % otrok *(7)*.

Virusne okužbe dihal so pri otrocih s CF enako pogoste kot pri otrocih brez kronične bolezni, vendar je potek hujši in pojav zapletov zaradi sekundarne bakterijske okužbe pogostejši. Virusne okužbe so pogostejše v jesenskih in zimskih mesecih in naj bi povzročale okoli 40 % poslabšanj *(8)*. Najtežji potek je običajno ob okužbi z respiratornim sincicijskim virusom in virusi parainfluence in influence *(9)*. Zato bolnikom s CF, njihovim družinskim članom ter skrbnikom svetujemo vsakoletno preventivno cepljenje proti gripi *(10)*. Virusne okužbe pri otrocih s CF večkrat vodijo v sekundarno bakterijsko okužbo dihal, pri kateri je potrebno antibiotično zdravljenje. Sekundarno okužbo najpogosteje povzroča *H. influenzae*. Zato večina protokolov tudi ob zelo verjetni virusni okužbi dihal svetuje uvedbo zdravljenja z amoksicilinom s klavulansko kislino, pri otrocih, ki prejemajo preventivno antibiotično terapijo s flukloksacilinom pa povečanje odmerka za vsaj pet dni *(4)*. Pred uvedbo antibiotičnega zdravljenja je smiselno odvzeti kužnino dihal, v kateri skušamo dokazati prisotnost respiratornih virusov in bakterij *(11)*.

Med bakterijskimi okužbami so za zgodnjo otroško dobo značilne predvsem okužbe s *H. influenzae* in *S. aureus*. Mnenja glede dejanskega vpliva *S. aureus* na dihala bolnikov s CF so deljena. *S. aureus* lahko povzroča akutna poslabšanja in kronično kolonizacijo. Medtem ko v večini britanskih CF-centrov otroci do tretjega leta starosti prejemajo preventivno antibiotično zdravljenje, pa drugje po svetu zdravimo predvsem akutna poslabšanja, ob katerih v kužnini osamimo veliko *S. aureus*. Za zdravljenje uporabljamo ozko usmerjene penicilinske antibiotike, razen kadar so bakterije nanje rezistentne. Prav zaradi različnih pristopov k preventivnemu zdravljenju je pogostost kronične kolonizacije s *S. aureus* pri otrocih s CF različna. Po podatkih iz evropskega registra bolnikov s CF (angl. *European Cystic Fibrosis Society Patient Registry*, ECFS PR) je pogostost najnižja v Veliki Britaniji z 9 % in najvišja v Ukrajini z 80 % kronično koloniziranih otrok. V Sloveniji je bilo v letu 2013 s *S. aureus* kronično koloniziranih 37 % otrok. Po ukinitvi preventivnega zdravljenja se je odstotek kronične kolonizacije pri odraslih bolnikih tudi v Veliki Britaniji povečal na skoraj 24 % *(12)*.

Večji otroci, mladostniki in odrasli

Pri večjih otrocih, mladostnikih in odraslih se poveča odstotek bolnikov, ki so kronično okuženi s *S. aureus*, hkrati pa vse pogosteje iz kužnin dihal osamimo tudi druge bakterije. Za to obdobje so značilne okužbe z bakterijami *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans* in vrste iz kompleksa *B. cepacia*, od gliv pa predvsem *A. fumigatus*. V zadnjem času ugotavljamo vse večji klinični pomen okužbe z netuberkuloznimi mikobakterijami *(4, 12)*.

S starostjo bolnikov se ne spreminja le prisotnost drugih vrst bakterij, temveč tudi njihova raznovrstnost. Večja raznovrstnost bakterij naj bi bila povezana z boljšim potekom bolezni, manjša raznovrstnost in prisotnost določenih dominantnih bakterij v dihalih pa naj bi bila napovedna dejavnika za slabšanje kliničnega stanja *(13)*. Leta 2015 so Coburn in sodelavci objavili raziskavo 269 bolnikov s CF, starih od 4 do 64 let. Pri vseh bolnikih je bil letno odvzet vsaj en vzorec spodnjih dihal – izmeček. Bolnike so ob koncu raziskave razdelili v dve starostni skupini: otroke do 18 let in odrasle nad 18 let. Ocenjevali so pljučno funkcijo, raznovrstnost bakterij in prisotnost dominantne bakterijske vrste. Rezultati primerjave skupin po starosti so pokazali, da

se mikrobna populacija, raznovrstnost in prevladujoča vrsta bakterij med skupinama razlikujejo. V skupini odraslih nad 18 let je bila v 57 % prisotna dominantna vrsta bakterij, medtem ko je bila ta prisotna le pri 45 % otrok do 18. leta starosti. Pri odraslih so bili dominantni po pogostnosti v padajočem vrstnem redu *P. aeruginosa, B. cepacia, S. pneumoniae, H. influenzae* in *S. aureus*, pri otrocih pa *S. pneumoniae, H. influenzae, P. aeruginosa, S. aureus* in *A. xylosoxidans (13).*

Ugotovili so, da je bila raznovrstnost bakterij največja pri mlajših preiskovancih in gostota bakterij največja v starosti med 20 in 24 let. Okrog 25. leta naj bi raznovrstnost dosegla plato. Pri starejših bolnikih sta ob manjši raznovrstnosti dominantni vrsti postala *P. aeruginosa* in *B. cepacia.* Z multivariatno analizo so potrdili višjo starost, nezadostno delovanje trebušne slinavke, večjo potrebo po antibiotičnem zdravljenju in prevlado *P. aeruginosa* kot negativne dejavnike na pljučno funkcijo, višji indeks telesne mase in večjo bakterijsko raznovrstnost pa kot pozitivna dejavnika na pljučno funkcijo *(13).*

Pri preučevanju vpliva okužbe z določeno bakterijo na klinično stanje bolnikov je pomembna primerjava med posameznimi centri in državami. Da je primerjava lahko objektivna, pri terminologiji uporabljamo določene standardne izraze. Terminologija je bila zasnovana ob preučevanju okužbe s *P. aeruginosa* v CF-centru v Leedsu v Veliki Britaniji, zato jo imenujemo merila iz Leedsa *(14, 15).* Z leti se je terminologija prenesla tudi na obravnavo okužb z drugimi bakterijami.

Po merilih iz Leedsa ima bolnik *(15)*:

- kronično okužbo, kadar ima v enem letu bakterijo osamljeno v več kot 50 % odvzetih vzorcev,
- intermitentno okužbo, kadar ima v enem letu bakterijo osamljeno v manj kot 50 % odvzetih vzorcev in
- predhodno okužbo, če je imel že predhodno osamljeno bakterijo, vendar ne v zadnjih 12 mesecih.
- Nikoli okuženi bolniki niso imeli še nikoli osamljene bakterije.

Različne bakterije imajo različen vpliv na obolevnost bolnikov s CF. V začetku letošnjega leta so Hector in sodelavci objavili članek z izsledki 10-letne retrospektivne raziskave, v katero je bilo vključenih 770 bolnikov s CF iz Avstrije in Nemčije. Ugotavljali so klinični vpliv intermitentne in kronične okužbe z različnimi bakterijami na pljučno funkcijo bolnikov. Potrdili so, da je kakršnakoli okužba in kronična kolonizacija z določenimi bakterijami povezana s stabilno pljučno funkcijo, okužba z drugimi bakterijami pa s slabšanjem pljučne funkcije s časom *(16).* Pregled kroničnih okužb z bakterijami in glivami pri bolnikih s CF in njihov klinični pomen je predstavljen v tabeli 1.

Tako so pri bolnikih, intermitentno ali kronično okuženih s *S. aureus* in *H. influenzae* ugotavljali stabilno oz. celo izboljšano pljučno funkcijo v primerjavi z bolniki brez okužbe. Nasprotno so pri bolnikih, ki so bili intermitentno ali kronično okuženi z bakterijami *P. aeruginosa,* proti meticilinu odpornim *S. aureus* (angl. *methicillin-resistant S. aureus,* MRSA) in *B. cepacia* ter glivama *A. fumigatus* ter *Candida glabrata,* ugotavljali pomembno slabšanje pljučne funkcije v primerjavi z bolniki, ki niso bili nikoli okuženi *(16).*

Do odrasle dobe pri več kot 60 % bolnikov vsaj prehodno osamimo *P. aeruginosa.* Znano je, da tako intermitentna kot kronična okužba s *P. aeruginosa* pomembno vpliva na večjo obolevnost in umrljivost bolnikov s CF *(17, 18).* Zgodnje odkrivanje okužbe je pomembno, saj je za *P. aeruginosa* značilno, da se že v kratkem času izredno prilagodi okolju. Bakterije se fenotipsko spremenijo v tako imenovani sluzni tip bakterij. Obdajo se z biofilmom,

ki jih ob drugih mehanizmih ščiti pred učinki antibiotikov. Zato je pomembno, da bolnike redno sledimo in jim ob vsakem pregledu odvzamemo kužnino dihal za osamitev *P. aeruginosa*. Ob prvi osamitvi bakterije in ob osamitvi po predhodnem uspešnem eradikacijskem zdravljenju pričnemo z agresivnim antibiotičnim eradikacijskim zdravljenjem. Protokoli eradikacijskega zdravljenja so različni, vendar vsi vključujejo dvotirno antibiotično terapijo. Običajno začnemo s terapijo doma s peroralnim ciprofloksacinom za tri tedne in inhalatornim kolistinom ali tobramicinom za vsaj štiri tedne. V kolikor na ta način bakterije ne uspemo odstraniti, nadaljujemo z dvotedenskim parenteralnim zdravljenjem v bolnišnici. Večkratno neuspešno eradikacijsko antibiotično zdravljenje vodi v kronično okužbo *(17, 19, 20)*.

Pomembno prelomnico pri obravnavi bolnikov s CF je predstavljala objava smernic za vzpostavitev centrov za CF, ki svetuje ločevanje bolnikov glede na v kužninah osamljene bakterije ob obravnavi v bolnišnici in ambulanti *(21)*. Z upoštevanjem priporočil lahko zmanjšamo prenos različnih bakterij in različnih bakterijskih sevov med bolniki. Na ta način se je v velikem številu centrov število kronično okuženih s *P. aeruginosa* pomembno zmanjšalo. Glede na podatke iz ECFS PR je s *P. aeruginosa* v povprečju kronično okuženih 10 % otrok in 30 % odraslih bolnikov *(12)*.

Prisotnost bakterij *S. maltophilia* in *A. xylosoxidans* je tako pri otrocih in mladostnikih kot pri odraslih bolnikih s CF relativno pogosta. Določeni centri opisujejo pojavnost pri skoraj 25 % bolnikov, natančnih podatkov in primerjav med posameznimi evropskimi centri pa v podatkih ECFS PR ni. Dolgotrajen klinični pomen kronične okužbe s katerokoli izmed teh bakterij ni povsem znan, znano pa je, da lahko obe povzročata akutna poslabšanja bolezni, ob katerih je potrebno antibiotično zdravljenje. Glede na običajno občutljivost se priporoča zdravljenje s trimetoprim-sulfametoksazolom, piperacilin/tazobaktamom in pri odraslih s tetraciklini, običajno v kombinaciji z inhalacijskim kolistinom *(4)*.

Med najhujše okužbe uvrščamo okužbo z bakterijami iz kompleksa *B. cepacia*. Bakterije so običajno večkratno odporne, kar praktično onemogoča njihovo zdravljenje. Kadar pri bolniku osamimo bakterije iz kompleksa *B. cepacia*, je treba izvajati stroge ločevalne ukrepe, saj je znano, da se bakterija lahko med bolniki hitro širi. Najhujši potek okužbe je tako imenovani Cepacia sindrom, ki se lahko pojavi tako pri bolniku, pri katerem prvič osamimo bakterijo, kot pri bolniku, ki ima že več let znano kronično okužbo. Poslabšanje poteka izredno hitro in se običajno začne po virusni okužbi. Kmalu se pojavijo znaki bakterijske sepse z visoko telesno temperaturo, izgubo telesne teže in hitrim napredovanjem vnetnih sprememb na pljučih. Kljub agresivnemu antibiotičnemu zdravljenju je umrljivost zelo visoka *(22)*.

Vse večji pomen v zadnjih letih pripisujemo okužbam z netuberkuloznimi mikobakterijami *(23)*. Običajno osamimo bakterije kompleksa *Mycobacterium avium* in/ali *Mycobacterium abscessus*. Okužba z *M. abscessus* običajno poteka hitreje in ima večji vpliv na povečano obolevnost in umrljivost bolnikov s CF. Zdravljenje je dolgotrajno, običajno večletno in zelo zahtevno. Po večini protokolov je po začetni intenzivni fazi s parenteralnimi antibiotiki v bolnišnici potrebno dolgotrajno zdravljenje doma, s kombinacijo treh do štirih peroralnih in inhalacijskih antibiotikov. Kljub takšni terapiji pa eradikacija bakterij večinoma ni uspešna *(24)*.

Poleg bakterijskih okužb so pri bolnikih s CF pomembne tudi okužbe z glivami. Medtem ko je pristnost kvasovke *Candida albicans* običajno koristna, pa naj bi imela kronična okužba z vrsto *C. glabrata* negativen učinek na pljučno funkcijo

(16). Poleg gliv iz rodu *Candida* so najpogostejše iz kužnin dihal osamljene plesni iz rodu *Aspergillus*, predvsem vrsta *A. fumigatus*. Še desetletje nazaj so bila mnenja glede pomena okužbe z *A. fumigatus* deljena. Danes menimo, da je okužba klinično pomembna in večinoma povezana s slabšanjem pljučne funkcije in splošnega stanja bolnikov s CF. *A. fumigatus* lahko povzroča različne oblike bolezni. Najpogostejši je aspergilusni bronhitis, redkejši pa so alergijska bronhopulmonalna aspergiloza (ABPA), aspergilom in invazivna aspergiloza *(4, 25)*. Aspergilusni bronhitis je povezan s hitrim povečanjem količine *A. fumigatus* v kužninah iz dihal s hkratnim poslabšanjem pljučne funkcije. Poslabšanje je običajno povezano s suhim, bronhitičnim kašljem in epizodami obstruktivnega dihanja, ki se pojavljajo ob telesnih naporih in inhalacijah hipertonične raztopine NaCl. Od ABPA se razlikuje predvsem po tem, da pri preiskavah ne zadostimo vsem kriterijem za ABPA.

Kriteriji za ABPA pri CF so *(4)*:

- klinični znaki akutnega ali kroničnega poslabšanja (kašelj, piskanje, obstruktivno dihanje ob naporih, poslabšanje pljučne funkcije, povečana količina izmečka),
- vrednosti celokupnih IgE proti *A. fumigatus* nad 1000 IU/ml,
- pozitiven kožni alergološki test na *A. fumigatus* s premerom urtike več kot 13 mm,
- povišane vrednosti IgG proti *A. fumigatus* v krvi in
- nove vnetne spremembe na rentgenogramu ali CT pljuč, ki ne izzvenijo po običajnem antibiotičnem zdravljenju in intenzivni respiratorni fizioterapiji.

Medtem ko aspergilusni bronhitis zdravimo s protiglivnimi zdravili, pa ABPA zdravimo s protiglivnimi zdravili v kombinaciji s sistemskimi steroidi. Običajno se zaradi zmanjšanja stranskih učinkov dolgotrajnega zdravljenja z nižjimi odmerki steroidov odločimo za pulzno zdravljenje z metilprednizolonom v kombinaciji z dolgotrajnejšim zdravljenjem s peroralnim itrokonazolom ali vorikonazolom. Pomembno je, da se zavedamo, da ima takšno zdravljenje lahko tudi stranske učinke. Potrebno je redno spremljanje metabolizma ogljikovih hidratov, jetrne in ledvične funkcije, terapija z vo-

Tabela 1. Pregled kroničnih okužb z bakterijami in glivami pri bolnikih s cistično fibrozo in njihov klinični pomen *(12, 16)*.

Bakterija/Gliva	Delež kronično okuženih otrok	Delež kronično okuženih odraslih	Vpliv na dolgotrajno poslabšanje kliničnega stanja		
			Da	Ne	Ni dokončno opredeljeno
H. influenzae	Ni podatkov	Ni podatkov		X	
S. aureus	36,8 %	31,7 %		X	X
P. aeruginosa	21,9 %	44,0 %	X		
S. maltophilia	6,8 %	5,3 %			X
A. xylosoxidans	Ni podatkov	Ni podatkov			X
B. cepacia	1,8 %	7,15 %	X		
Netuberkulozne mikobakterije	1,0 %	2,4 %	X		
A. fumigatus	Ni podatkov	Ni podatkov	X		

rikonazolom pa lahko povzroča tudi motnje vida *(26)*.

ZAKLJUČEK

Stalna prisotnost goste sluzi, v kateri so običajno prisotne tudi bakterije in glive, ob drugih mehanizmih v dihalih bolnikov s CF povzroča kronično vnetje. Posledica kroničnega vnetja so kronične spremembe dihalnih poti, ki se običajno pojavijo že v zgodnji otroški dobi, kljub odsotnosti kliničnih znakov. Napredovanje kroničnih sprememb sčasoma vodi v kronično dihalno odpoved. Ob trenutni oskrbi in zdravljenju bolniki s CF povprečno živijo več kot 40 let, pričakujemo pa, da bodo otroci, ki se rojevajo danes, živeli več kot 60 let. Vzdrževanje pljučne funkcije in stanja dihal je zato izrednega pomena. Pri tem je bistvena vloga bolnikov in njihovih staršev. Z rednim izvajanjem inhalacij in redno respiratorno fizioterapijo lahko pomembno pripomorejo k boljšemu čiščenju dihalnih poti, kar zmanjša obremenitev dihal z različnimi mikroorganizmi. Danes so bolnikom poleg redne terapije na voljo novi antibiotiki, v novih, inhalatornih oblikah. Na ta način je povečano delovanje zdravil neposredno v dihalih z zmanjšanimi sistemskimi stranskimi učinki. Ugodno je, ker lahko bolniki inhalatorne antibiotike prejemajo doma. Ob hitrem napredku pri razvoju novih zdravil za zdravljenje CF je vse večje upanje, da bo v prihodnosti CF postala dokončno ozdravljiva bolezen. Do takrat pa je naša skupna naloga, da bolnikom zagotovimo najboljšo oskrbo, da bo njihovo klinično stanje takrat čim boljše.

LITERATURA

1. MacNeill S. Epidemiology of cystic fibrosis. In: Bush A, Bilton D, Hodson M, eds. Hodson and Geddes' Cystic fibrosis. 4th ed. Boca Raton: CRC Press; 2016. p. 18–40.
2. Kotnik Pirš A, Praprotnik M, Trebušak Podkrajšek K, et al. Značilnosti otrok in mladostnikov s cistično fibrozo v Sloveniji. Slov Pediatr. 2014; 21: 164–71.
3. De Boeck K. From the discovery of the CFTR gene in 1989 through to 2014. In: Bush A, Bilton D, Hodson M, eds. Hodson and Geddes' Cystic fibrosis. 4th ed. Boca Raton: CRC Press; 2016. p. 3–17.
4. Elborn S, Balfour-Lynn I, Bilton D. Respiratory disease: infectious complications. In: Bush A, Bilton D, Hodson M, eds. Hodson and Geddes' Cystic fibrosis. 4th ed. Boca Raton: CRC Press; 2016. p. 205–20.
5. Wallis C, Simmonds N. Diagnosis of the symptomatic patient. In: Bush A, Bilton D, Hodson M, eds. Hodson and Geddes' Cystic fibrosis. 4th ed. Boca Raton: CRC Press; 2016. p. 141–54.
6. Sly PD, Wainwright CE. Diagnosis and early life risk factors for bronchiectasis in cystic fibrosis: a review. Expert Rev Respir Med. 2016; 10: 1003–10.
7. Sly PD, Gangell CL, Chen L, et al. Risk factors for bronchiectasis in children with cystic fibrosis. N Engl J Med. 2013; 368: 1963–70.
8. Van Ewijk BE, van der Zalm MM, Wolfs TF, et al. Prevalence and impact of respiratory viral infections in young children with cystic fibrosis: prospective cohort study. Pediatrics. 2008; 122: 1171–6.
9. Wat D, Gelder C, Hibbitts S, et al. The role of respiratory viruses in cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2008; 7: 320–8.
10. Wat D, Gelder C, Hibbitts S, et al. Is there a role for influenza vaccination in cystic fibrosis? J Cyst Fibros. 2008; 7: 85–8.
11. Jones AM, Flight W, Isalska B, et al. Diagnosis of respiratory viral infections in cystic fibrosis by PCR using sputum samples. Eur Respir J. 2011; 38: 1486–7.
12. European Cystic Fibrosis Society, Petient Registry. ECFS Patient Registry Annual data report 2013 [internet]. Karup: European Cystic Fibrosis Society; c2016 [citirano 1016 Oct 15]. Dosegljivo na: https://www.ecfs.eu/sites/default/files/images/ECFSPR_Report2013_02.2016.pdf

13. Coburn B, Wang PW, Diaz Caballero J, et al. Lung microbiota across age and disease stage in cystic fibrosis. Sci Rep. 2015; 5: 10241.
14. Lee TW, Brownlee KG, Conway SP, et al. Evaluation of a new definition for chronic Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros. 2003; 2: 29–34.
15. Proesmans M, Balinska-Miskiewicz W, Dupont L, et al. Evaluating the "Leeds criteria" for Pseudomonas aeruginosa infection in a cystic fibrosis centre. Eur Respir J. 2006; 27: 937–43.
16. Hector A, Kirn T, Ralhan A, et al. Microbial colonization and lung function in adolescents with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2016; 15: 340–9.
17. Döring G, Flume P, Heijerman H, et al. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies. J Cyst Fibros. 2012; 11: 461–79.
18. Eber E, Zach MS. Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis: prevent, eradicate or both? Thorax. 2010; 65: 849–51.
19. Döring G, Conway SP, Heijerman HG, et al. Antibiotic therapy against Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: a European consensus. Eur Respir J. 2000; 16: 749–67.
20. Döring G. Prevention of Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis patients. Int J Med Microbiol. 2010; 300: 573–7.
21. Conway S, Balfour-Lynn IM, De Rijcke K, et al. European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Framework for the Cystic Fibrosis Centre. J Cyst Fibros. 2014; 13 Suppl 1: S3–22.
22. Gilchrist FJ, Webb AK, Bright-Thomas RJ, et al. Successful treatment of cepacia syndrome with a combination of intravenous cyclosporin, antibiotics and oral corticosteroids. J Cyst Fibros. 2012; 11: 458–60.
23. Viviani L, Harrison MJ, Zolin A, et al. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria (NTM) amongst individuals with cystic fibrosis (CF). J Cyst Fibros. 2016; 15: 619–23.
24. Floto RA, Olivier KN, Saiman L, et al. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis: executive summary. Thorax. 2016; 71: 88–90.
25. Speirs JJ, van der Ent CK, Beekman JM. Effects of Aspergillus fumigatus colonization on lung function in cystic fibrosis. Curr Opin Pulm Med. 2012; 18: 632–8.
26. Clinical guidelines: Care of children with cystic fibrosis 2014. Balfour-Lynn I, ed. 6th ed. London: ROYAL Bromptom & Harefield; 2014.

Sabina Škrgat[1], Daša Naglič[2]

Projekt EMBARC (European Multicentre Bronchiectasis Audit and Research Collaboration) in vloga inhalacijskih antibiotikov in makrolidov pri bronhiektazijah, ki niso posledica cistične fibroze

Brief Report from EMBARC (European Multicentre Bronchiectasis Audit and Research Collaboration) and the Role of Inhaled Antibiotics and Macrolides in non Cystic Fibrosis Broncіectasis

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: bronhiektazije, register, makrolidi, inhalacijski antibiotiki

Bronhiektazije so zanemarjena bolezen. Zdravljenje bronhiektazij tako večinoma temelji na ekspertnih mnenjih in znanjih, ki se v področje bronhiektazij prenašajo iz drugih področij obstruktivnih bolezni pljuč in cistične fibroze. Register EMBARC (European Multicentre Audit and Research Collaboration) je prospektivna evropska opazovalna študija, ki vključuje klinične, mikrobiološke, radiološke in funkcionalne podatke bolnikov z bronhiektazijami (izključeni so bolniki s cistično fibrozo). V registru sodeluje 20 držav, med njimi tudi Slovenija. Sedež Registra za Slovenijo je na Kliniki Golnik. Namen delovanja registra je izboljšanje raziskovalne dejavnosti, povezovanje centrov in končno boljša klinična obravnava bolnikov z bronhiektazijami. Pri teh je z mikrobiološkega stališča problem kolonizacija z bakterijo *Pseudomonas aeruginosa*. V tem primeru se pri nekaterih bolnikih z bronhiektazijami, ki niso posledica cistične fibroze, uvajajo inhalacijski antibiotiki in makrolidi. Cilj tega zdravljenja je zmanjšati frekvenco poslabšanj bolezni in doseči boljšo kvaliteto življenja. Odločitev o zdravljenju naj bo vezana na centre z izkušnjami na tem področju.

ABSTRACT

KEY WORDS: bronchiectasis, register, macrolides, inhaled antibiotics

Although bronchiectasis is not a rare disease, it seems to be a neglected pathology within pneumonology. The number of clinical trials performed is low and therefore management of bronchiectasis is largely based on expert opinions and knowledge, which is

[1] Doc. dr. Sabina Škrgat, dr. med., Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik 36, 4204 Golnik; sabina.skrgat@klinika-golnik.si

[2] Daša Naglič, dr. med., Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik 36, 4204 Golnik

extrapolated into the field of bronchiectasis from other fields of obstructive diseases or cystic fibrosis. Project EMBARC (European Multicentre Audit and Research Collaboration), founded by the European Respiratory Society, deals with clinical, microbiological, radiologic and functional data on patients with bronchiectasis (patients with cystic fibrosis excluded) with the goal of encouraging research and international scientific collaboration in this field. The Slovene segment of the EMBARC register is based at the University Clinic Golnik. *Pseudomonas aeruginosa* is problematic in patients with bronchiectasis because it is associated with poorer lung function and lower quality of life. Inhaled antibiotic therapy and macrolides are a possible option for treating these patients. The goal of suppressive antibiotic therapy is to reduce the bacterial burden and the frequency of exacerbations in these patients. A decision for such treatment should be reached at the level of expert centres.

POROČILO REGISTRA EMBARC ZA SLOVENIJO

Kljub temu, da bronhiektazije niso redka bolezen, gre za zapostavljeno patologijo v pulmologiji *(1, 2)*. Opravljenih je bilo le malo kliničnih raziskav, zato zdravljenje bronhiektazij večinoma temelji na ekspertnih mnenjih in znanjih, ki se v to področje prenašajo iz drugih področij obstruktivnih bolezni pljuč in cistične fibroze (CF). V okviru Evropskega respiratornega združenja je bil ustanovljen projekt EMBARC (European Multicentre Audit and Research Collaboration), prospektivna evropska opazovalna študija, ki vključuje klinične, mikrobiološke, radiološke in funkcionalne podatke bolnikov z bronhiektazijami (bolniki s cistično fibrozo so izključeni), s ciljem spodbuditi raziskovanje in mednarodno raziskovalno sodelovanje na tem področju *(1)*. Sedež slovenskega dela registra EMBARC je na Kliniki Golnik.

Namen raziskave je bil predstaviti klinične, funkcionalne, slikovne in mikrobiološke značilnosti odraslih bolnikov z bronhiektazijami, ki niso posledica CF, v Sloveniji na podlagi pri nas zbranih podatkov. Teh podatkov do sedaj v Sloveniji nismo imeli urejenih in o njih tudi na ta način nismo poročali.

Retrospektivno raziskavo smo izvedli na vzorcu 152 bolnikov z bronhiektazijami, ki niso posledica CF. Pregledani so bili na Kliniki Golnik med 27. 5. 2014 in 29. 7. 2015. Tako anamnestični in klinični kot tudi mikrobiološki, laboratorijski in slikovni podatki o bolnikih so bili vneseni v register EMBARC ter statistično obdelani. V nalogi pa smo se osredotočili na klinične značilnosti bolnikov in mikrobiološko analizo izmečka ter korelacijo le-teh.

Rezultati naše raziskave kažejo mediano starost bolnikov 67 let. Med bolniki je bilo 51 % moških in 49 % žensk, izkašljali so 5 ml izmečka dnevno (mediana). Bolniki so imeli mediano forisiranega ekspiratornega volumna v prvi sekundi (FEV1) 1,805 l (74 %) ter mediano forsirano vitalno kapaciteto (FVC) 3,317 l (102 %). Povezava med FEV1 in dispnejo je bila statistično značilna ($p < 0,001$), korelacije med FEV1 in količino izmečka ($p = 0,7$) ter dispnejo in količino izmečka ($p = 0,56$) pa niso bile statistično pomembne. Pljučna funkcija (mediana FEV1 57 % ter FVC 91,7 %) bolnikov, koloniziranih s *Pseudomonas aeruginosa*, je statistično pomembno manjša ($p = 0,012$, $p = 0,019$) kot pri nekoloniziranih bolnikih. Mediana hospitalizacij pri koloniziranih s

P. aeruginosa je bila ena v zadnjih 12 mesecih, pri nekoloniziranih bolnikih pa nič (p = 0,276). Bolniki, pri katerih smo osamili bakterijo *Staphylococcus aureus*, niso imeli več hemoptiz kot ostali bolniki.

Najpogosteje je bila iz izmečka preiskovancev izolirana normalna mikrobna flora dihal (25 %), sledili so *Haemophilus influenzae* (13,2 %), *P. aeruginosa* (8,8 %), *Candida spp.* (8,3 %), *Staphylococcus aureus* (7,8 %), *Streptococcus pneumoniae* (6,4 %), *Moraxella catarrhalis* (3,4 %). Pri najpogosteje izolirani bakteriji *Haemophilus influenzae* (27 izolatov) smo ugotovili odpornost proti amoksicilinu s klavulansko kislino (3,7 %), azitromicinu (3,7 %) ter cefuroksimu (3,7 %) pri enem sevu. Pri bakteriji *P. aeruginosa* (18 izolatov) smo pri 5,6 % ugotovili odpornost proti ceftazidimu. Pri bakteriji *S. aureus* (16 izolatov) smo ugotovili odpornost proti klindamicinu v 6,3 %, eritromicinu 18,8 % ter pričakovan visok delež sevov, odpornih proti penicilinu 93,8 %. Noben sev bakterije *S. aureus* ni bil odporen proti meticilinu. Pri izoliranih sevih bakterije *S. pneumoniae* (13 izolatov) smo ugotovili odpornost proti klindamicinu v 23,1 % ter eritromicinu v 23,1 %.

V zaključku raziskave ugotavljamo, da so bolniki z bronhiektazijami z mediano starostjo 67 let izkašljali 5 ml izmečka dnevno (mediana). Pljučna funkcija je pokazala blago obstrukcijo. Slabšanje FEV1 bolnikov je statistično značilno koreliralo z višanjem stopnje dispneje, ne pa tudi z večanjem količine izmečka. Dokazali smo pomembno slabšo pljučno funkcijo pri bolnikih, ki so kolonizirani s *P. aeruginosa*, nismo pa dokazali, da so bili tudi statistično značilno večkrat hospitalizirani kot nekolonizirani bolniki.

VLOGA INHALACIJSKIH ANTIBIOTIKOV IN MAKROLIDOV PRI BRONHIEKTAZIJAH, KI NISO POSLEDICA CISTIČNE FIBROZE

Predpisovanje supresivnega antibiotičnega zdravljenja se pri ožji skupini bolnikov z bronhiektazijami, ki niso posledica CF, uvaja s ciljem zmanjševanja bakterijskega bremena dihalnih poti. Poročila kažejo na jasno povezavo med bakterijskim bremenom in jakostjo sistemskega vnetja in vnetja na nivoju dihalne poti *(3, 4)*. Od tod tudi ideja o uvajanju kroničnega antibiotičnega zdravljenja.

Uvedba inhalacijskih antibiotikov pri tej skupni bolnikov se lahko pokaže z zmanjšanim nastajanjem izmečka in bakterijskega bremena ter zmanjšanjem števila poslabšanj bolezni *(5)*. Znanja o predpisovanju inhalacijskih antibiotikov se prenašajo iz znanj in kliničnih praks obravnave bolnikov s CF. Tobramicin, gentamicin, kolistin in aztreonam so inhalacijski antibiotiki, ki se jih lahko uporabi v inhalacijski obliki *(5–9)*. Izbira antibiotika se med državami in institucijami razlikuje glede na izkušnjo in način financiranja zdravil. Zdravila indiciramo pri ožji skupini bolnikov predvsem takrat, ko je v izmečku prisoten *P. aeruginosa*, kadar ima bolnik pogosta poslabšanja bolezni kljub ustreznemu predpisu preostalega zdravljenja ter se kasneje izkažejo ugodni klinični učinki teh zdravil.

Makrolidi pa imajo imunomodulatorni učinek brez imunosupresivnega učinka *(10)*. Ti učinki vključujejo spremenjeno nastajanje mukusa, inhibicijo nastajanja biofilma, zaviranje vnetnih mediatorjev, modificiranje funkcije levkocitov *(11, 12)*. Med ugodnimi kliničnimi učinki uvedbe azitromicina 250 mg 3-krat na teden ali 500 mg 2-krat na teden se pokažejo zmanjšana pogostost poslabšanja bolezni in zmanjšano nastajanje izmečka. Problem je možno nastajanje odpornosti proti makrolidom *(13)*. Kronična uporaba makro-

lidov lahko vodi tudi v nastanek odpornih netuberkuloznih mikobakterij (NTM). Pred uvedbo tega zdravljenja je potrebno izključiti okužbo z NTM, bolniku pa pred in po uvedbi azitromicina posneti EKG zaradi možnega vpliva na dobo QT *(2, 4)*. Inhalacijski antibiotiki in makrolidi naj se pri bolnikih z bronhiektazijami, ki niso posledica CF, uvajajo v centrih z izkušnjami in dobrim spremljanjem bolnikov.

LITERATURA

1. Chalmers JD, Aliberti S, Polverino E, et al. The EMBARC European Bronciectasis Registry: protocol for an international observational study. ERJ Open Res. 2016; 2 (1). pii: 00081-2015.
2. Pasteur MC, Bilton D, Hill AT. British Thoracic Society guideline for non-CF bronchiectasis. Thorax. 2010; 65 Suppl 1: i1-58.
3. Chalmers JD, Aliberti S, Blasi F. Management of bronchiectasis in adults. Eur Respir J. 2015; 45: 1446-62.
4. Chalmers JD, Smith MP, McHugh BJ, et al. Short- and long-term antibiotic treatment reduces airway and systemic inflammation in non-cystic fibrosis bronchiectasis. Am J Respir Crit Care Med. 2012; 186: 657-65.
5. Orriols R, Roig J, Ferrer J, et al. Inhaled antibiotic therapy in non-cystic fibrosis patients with bronchiectasis and chronic bronchial infection by Pseudomonas aeruginosa. Respir Med. 1999; 93: 476-80.
6. Barker AF, Couch L, Fiel SB, et al. Tobramycin solution for inhalation reduces sputum Pseudomonas aeruginosa density in bronchiectasis. Am J Respir Crit Care Med. 2000; 162: 481-5.
7. Scheinberg P, Shore E. A pilot study of the safety and efficacy of tobramycin solution for inhalation in patients with severe bronchiectasis. Chest. 2005; 127: 1420-6.
8. Dhar R, Anwar GA, Bourke SC, et al. Efficacy of nebulised colomycin in patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis colonised with Pseudomonas aeruginosa. Thorax. 2010; 65: 553.
9. Murray MP, Govan JR, Doherty CJ, et al. A randomized controlled trial of nebulized gentamicin in non-cystic fibrosis bronchiectasis. Am J Respir Crit Care Med. 2011; 183: 491-9.
10. Cymbala AA, Edmonds LC, Bauer MA, et al. The disease-modifying effects of twice-weekly oral azithromycin in patients with bronchiectasis. Treat Respir Med. 2005; 4: 117-22.
11. Anwar GA, Bourke SC, Afolabi G, et al. Effects of long-term low-dose azithromycin in patients with non-CF bronchiectasis. Respir Med. 2008; 102: 1494-6.
12. Wong C, Jayaram L, Karalus N, et al. Azithromycin for prevention of exacerbations in non-cystic fibrosis bronchiectasis (EMBRACE): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet. 2012; 380: 660-7.
13. Altenburg J, de Graaff CS, Stienstra Y, et al. Effect of azithromycin maintenance treatment on infectious exacerbations among patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis: the BAT randomized controlled trial. JAMA. 2013; 309: 1251-9.

Katja Seme[1], Viktorija Tomič[2]

Mikrobiološka diagnostika bakterijskih okužb dihal

Microbiological Diagnostics of Bacterial Respiratory Tract Infections

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: mikrobiološka diagnoza, bakterijske okužbe, akutno vnetje žrela, pljučnica, cistična fibroza, hitri antigenski test, kultura

Odpornost bakterij proti protimikrobnim zdravilom se povečuje povsod po svetu. Prekomerna in neustrezna uporaba protimikrobnih zdravil je poglavitni vzrok za pojav in širjenje odpornosti. Največji delež protimikrobnih zdravil zdravniki v primarnem zdravstvu predpišejo za zdravljenje okužb dihal, medtem ko se mikrobiološke diagnostike pri tovrstnih okužbah poslužujejo le izjemoma. Na sekundarnem in terciarnem nivoju je mikrobiološka diagnostika okužb dihal bolj uveljavljena, saj gre najpogosteje za težje potekajoče okužbe in je izbira ustreznega antibiotika toliko bolj pomembna.

ABSTRACT

KEY WORDS: microbiological diagnostics, bacterial infections, acute pharyngitis, pneumonia, cystic fibrosis, rapid antigen test, culture

Antimicrobial resistance is increasing all around the world. Excessive and inappropriate use of antimicrobials is the main reason for resistance development and spread. In the majority of cases, antimicrobial treatment is prescribed by primary care physicians for the treatment of respiratory tract infections whereas microbiological diagnostics is rarely used. In secondary and tertiary healthcare, microbiological diagnostics is well established because patients are treated for more severe respiratory tract infections where appropriate antimicrobial treatment is of much greater importance.

[1] Prof. dr. Katja Seme, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; katja.seme@mf.uni-lj.si

[2] Doc. dr. Viktorija Tomič, dr. med., Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, Golnik 36, 4204 Golnik; viktorija.tomic@klinika-golnik.si

UVOD

Okužbe dihal so najpogostejše in potencialno ene najtežjih okužb, ki jih zdravijo zdravniki na vseh nivojih zdravstvenega varstva. Okužbe spodnjih dihal, vključno z gripo, so tudi najpogostejši vzrok smrti zaradi okužb. Dejavniki tveganja za okužbe dihal so številni in sicer starost (zelo mladi in starejši), kajenje, alkoholizem, imunosupresija, pridružene kronične bolezni. Najpogostejši mikrobni povzročitelji okužb dihal se razlikujejo glede na anatomsko mesto okužbe oz. tip okužbe (npr. sinusitis v primerjavi s pljučnico), mesto nastanka (domače okolje v primerjavi z bolnišničnim okoljem), letni čas, posebne skupine prebivalstva (npr. osebe s cistično fibrozo, osebe s presajenimi tkivi in organi). V Sloveniji je bila leta 2014 prijavna incidenčna stopnja za gripo 27,85/100.000 prebivalcev, za streptokokni tonzilitis 9,66/100.000, za legionelozo 2,9/100.000 in za invazivno pnevmokokno okužbo 13,4/100.000 prebivalcev *(1)*.

MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA OKUŽB ZGORNJIH DIHAL

Pri okužbah zgornjih dihal se zdravniki na primarnem nivoju premalokrat odločijo za poskus vzročne opredelitve, kar ima za posledico čezmerno in nepotrebno predpisovanje antibiotikov, zlasti za zdravljenje akutnega vnetja žrela, ki je pri več kot polovici bolnikov virusnega izvora. Osamitev bakterijskih povzročiteljev okužb zgornjih dihal je nepogrešljiva, kadar želimo dobiti pregled nad najpogostejšimi povzročitelji tovrstnih okužb v določenem okolju in nad njihovo občutljivostjo oz. odpornostjo proti antibiotikom. Podatki nam olajšajo izbiro primernega antibiotika in omogočajo izdelavo priporočil za izkustveno zdravljenje.

Akutno vnetje žrela

Streptococcus pyogenes ali betahemolitični streptokok skupine A je edini povzročitelj akutnega vnetja žrela, ki ga moramo zlasti zaradi preprečevanja poznih posledic streptokokne okužbe zdraviti z antibiotikom. Zato je treba *S. pyogenes* ločiti od ostalih možnih povzročiteljev te okužbe. To nam zanesljivo omogočajo mikrobiološke metode, s katerimi dokažemo antigen bakterije *S. pyogenes* neposredno v odvzeti kužnini (bris nebnic ali žrela) ali bakterijo osamimo iz kužnine ali v kužnini dokažemo nukleinske kisline *S. pyogenes (2, 3)*.

Odvzem kužnine je eden od ključnih dejavnikov, ki vpliva na zanesljivost rezultatov mikrobiološke preiskave. Pri akutnem vnetju žrela je treba z ustreznim brisom dobro obrisati nebnici oziroma njuni ležišči, uvulo, zadnjo steno žrela, ter pri tem paziti, da se z brisom ne dotaknemo jezika in ustne sluznice. Če kužnina ni odvzeta pravilno, se občutljivost mikrobioloških preiskav močno zmanjša *(3, 4)*. Kadar jemljemo bris za hitri antigenski test, uporabimo brise, ki jih priporoča proizvajalec izbranih testov in jih zdravniku priskrbi laboratorij, ki hitre teste izvaja. Za klasično osamitev bakterije *S. pyogenes* iz kužnine so najprimernejši brisi s konico iz umetnih materialov (npr. dakron ali kalcijev alginat), ki jih v ustreznem transportnem gojišču pošljemo v mikrobiološki laboratorij *(4)*.

Priporočila Evropskega združenja za klinično mikrobiologijo in infekcijske bolezni (angl. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, ESCMID) za obravnavo akutnega vnetja žrela priporočajo uporabo kliničnih točkovnih sistemov, s katerimi ocenjujemo verjetnost streptokokne okužbe in na osnovi katerih se odločimo o smiselnosti mikrobiološke diagnostike, in opozarjajo, da je uporabnost točkovnih sistemov pri otrocih manj zanesljiva kot pri odraslih *(5)*. Evropska priporočila svetujejo pri bolnikih z visokim točkovnim seštevkom uporabo hitrih antigenskih testov za dokaz okužbe s *S. pyogenes*. Evropska pripo-

ročila tudi navajajo, da v primeru negativnega rezultata hitrega testa pri takšnem bolniku ni potrebno opraviti kulture brisa žrela *(5)*. Najnovejša priporočila Ameriškega infektološkega združenja (IDSA) za obravnavo akutnega vnetja žrela priporočajo pri kliničnih znakih faringitisa tako pri otrocih kot pri odraslih uporabo hitrega antigenskega testa ali kulture za dokaz *S. pyogens*, razen če so prisotni znanki virusne okužbe, kot so izcedek iz nosu, kašelj, razjede v ustih in/ali hripavost *(6)*. Ameriška priporočila navajajo, da je negativni rezultat hitrega antigenskega testa pri otrocih in adolescentih treba preveriti s kulturo, ni pa ga treba preverjati pri odraslih. Pri odraslih je namreč pojavnost streptokoknega faringitisa zelo nizka in primarna revmatična vročica je pri njih izjemno redka *(6)*.

Kadar v mikrobiološki laboratorij za klasično bakteriološko diagnostiko dobimo bris, odvzet ob akutnem vnetju žrela, lahko razen bakterije *S. pyogenes* osamimo tudi druge možne bakterijske povzročitelje tovrstne okužbe (betahemolitične streptokoke skupine C in G, *Arcanobacterium haemolyticum*) *(3, 4)*. Pri sumu, da gre za redke in z mikrobiološkega stališča zahtevne bakterijske povzročitelje vnetja žrela (*Corynebacterium diphtheriae, Neisseria gonorrhoeae* ali *Francisella tularensis*), mora lečeči zdravnik neposredno opozoriti mikrobiološki laboratorij, kjer bo dobil tudi ustrezna navodila za najprimernejši način odvzema in transporta kužnine *(3, 4)*.

Vnetje srednjega ušesa in obnosnih votlin

Zdravniki na primarnem nivoju praktično ne morejo etiološko opredeliti vnetja srednjega ušesa in obnosnih votlin, saj je za ta namen potreben invaziven odvzem kužnine, in sicer diagnostična timpanocenteza ali odvzem kužnine ob spontanem razpoku bobniča pri vnetju srednjega ušesa in aspiracijska punkcija obnosne votline pri vnetju obnosnih votlin *(3, 4, 7, 8)*. Le osamitev povzročitelja iz tako odvzetih kužnin omogoča zanesljivo etiološko opredelitev okužbe. Nekateri zdravniki namesto invazivno odvzete kužnine pošiljajo v mikrobiološke laboratorije pri vnetju srednjega ušesa bris nazofarinksa, pri vnetju obnosnih votlin pa bris nosu. Žal je pozitivna napovedna vrednost rezultatov osamitve povzročitelja okužbe iz brisa nazofarinksa samo 47 %, ujemanje rezutatov osamitve patogenih bakterij iz brisa nosu in aspirata obnosne votline pa v nobeni raziskavi ni preseglo 64 %. To jasno potrjuje nesmiselnost neinvazivnega odvzema kužnin za etiološko opredeljevanje tovrstnih okužb *(4, 7, 8)*. Pogojno uporaben je negativen rezultat kulture nazofarinksa pri sumu na akutno vnetje srednjega ušesa, ki ima zelo dobro negativno napovedno verjetnost *(3)*.

MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA OKUŽB SPODNJIH DIHAL

Okužbe spodnjih dihal so eden najpogostejših razlogov za obisk pri zdravniku. Zdravniki na primarnem nivoju mikrobiološke diagnostike ne izvajajo ali jo izvedejo le izjemoma, zato je antibiotično zdravljenje teh bolnikov praviloma izkustveno. Pri obravnavi bolnikov z okužbo spodnjih dihal v bolnišnici moramo opraviti mikrobiološko diagnostiko, saj so ti praviloma huje bolni in za ugoden izid bolezni nujno potrebujejo ustrezno ciljano antibiotično zdravljenje. Za izvedbo medicinsko in ekonomsko najprimernejše oz. najustreznejše mikrobiološke diagnostike moramo poznati najverjetnejše povzročitelje pri posameznih vrstah okužb spodnjih dihal in najprimernejše mikrobiološke diagnostične preiskave zanje. Enako pomembno je poznavanje pravilnih načinov odvzema posameznih vrst kužnin, načina in trajanja transporta oz. pogojev shranjevanja kužnin ter dobra povezava med kliniki in kliničnimi mikrobiologi *(4, 9)*.

Pljučnica

Etiološka opredelitev pljučnice je zanesljiva, če smo ob ustrezni klinični sliki pljučnice in potrditvi diagnoze s slikovno diagnostiko osamili potencialno patogeno bakterijo iz primarno sterilne kužnine (kri, plevralni izliv, transtrahealni aspirat, transtorakalni aspirat). Osamitev iz drugih kužnin, odvzetih iz spodnjih dihal, pa je zanesljiva le, ko osamimo povzročitelja, ki ne kolonizira zgornjih dihal (mikobakterije, legionele). Etiološka opredelitev pljučnice je ob ustrezni klinični sliki in rezultatu slikovne diagnostike zanesljiva tudi ob pozitivnem izvidu testiranja na topni antigen bakterij *Streptococcus pneumoniae* in *Legionella pneumophila* v urinu *(10)*.

Hemokulture omogočajo zanesljivo mikrobiološko diagnozo povzročitelja. Imajo zelo visoko specifičnost, vendar so pozitivne le v 4–18 % primerov zunajbolnišničnih pljučnic *(4, 9, 10)*. Delež pozitivnih hemokultur je praviloma višji pri bolnikih s pnevmokokno pljučnico (do 25 %). V do 40 % primerov pljučnic se lahko pojavi plevralni izliv. Enako kot pri hemokulturah je specifičnost osamitev povzročitelja pljučnice iz plevralnega izliva zelo visoka, občutljivost pa nizka *(4, 9, 10)*.

Etiološka opredelitev pljučnice je verjetna, če smo ob ustrezni klinični sliki osamili potencialno patogeno bakterijo iz kakovostne kužnine iz spodnjih dihal. Med neinvazivno odvzetimi kužninami je za diagnostiko okužb spodnjih dihal najpogosteje uporabljen izmeček. Z invazivnimi postopki lahko iz spodnjih dihal odvzamemo nesterilne vzorce s pomočjo bronhoskopa (izpirek bronha, bronhoalveolarni izpirek (BAL), odvzem z zaščitenim katetrom in/ali zaščiteno krtačko). Pri intubiranih in umetno predihavanih bolnikih sta poleg omenjenih invazivno odvzetih kužnin uporabni še dve neinvazivno odvzeti, in sicer endotrahealni aspirat in mini BAL *(4, 9–11)*.

Iz vseh kužnin iz spodnjih dihal lahko pogledamo razmaz, obarvan po Gramu, kar omogoča prvo in najhitrejšo informacijo, ki jo mikrobiološki laboratorij lahko pošlje kliniku. Kužnine za kulturo lahko obdelamo kvalitativno, polkvantitativno ali kvantitativno *(4)*.

Odvzem izmečka je relativno enostaven, čeprav pogosto ne dobimo kakovostnega vzorca. Za mikrobiološko diagnostiko so uporabni le vzorci, ki vsebujejo manj kot 10 celic ploščatega epitela in več kot 25 nevtrofilnih levkocitov pri mikroskopskem pregledu pod majhno (100-kratno) povečavo *(4, 9, 11)*. Mnogi bolniki s pljučnico ne izkašljujejo, še posebno starejši bolniki oz. bolniki s pljučnico, ki jo povzročajo atipične bakterije (*Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae, Chlamydia psittaci* in *L. pneumophila*). Kadar dobimo kakovosten vzorec izmečka, lahko zdravniku že zelo hitro posredujemo pomembne informacije o povzročitelju pljučnice, če je le-ta prevladujoč v razmazu, obarvanem po Gramu *(4, 9)*. Razmaz, obarvan po Gramu, olajša in obenem omogoči pravilnejšo interpretacijo rezultatov kulture izmečka. Obenem je rezultat mikroskopskega pregleda razmaza zdravnikom v pomoč pri odločanju o izkustvenem antibiotičnem zdravljenju. Pri prevladovanju ene značilne bakterijske oblike v razmazu je verjetnost pravilne opredelitve povzročitelja velika. Kadar pri bolniku, ki ni prejemal antibiotikov, v ustreznem izmečku z obilico polimorfonuklearnih levkocitov ne vidimo bakterij, je to lahko znak, da gre za atipičnega povzročitelja *(9)*.

Ker pri vseh intubiranih bolnikih pride do kolonizacije dihal z mikrobno floro in ker se tudi pri invazivnem odvzemu kužnin iz spodnjih dihal ne moremo v celoti izogniti kontaminaciji kužnine z izločki in mikrobno floro ustno-žrelnega prostora, se je uveljavilo priporočilo kvantitativne kulture teh vzorcev za namen mikrobio-

loške diagnostike pljučnice, zlasti tiste, povezane z mehanskim predihavanjem *(4, 9)*. S tem pristopom naj bi lažje razlikovali med kolonizirajočimi bakterijami in tistimi, ki dejansko povzročajo okužbo (pljučnico). Mejne vrednosti za koncentracijo bakterij v vzorcih iz spodnjih dihal, ki ločijo kolonizirajoče bakterije od potencialnih povzročiteljev okužbe, so odvisne od vrste vzorca in znašajo med 10^5 in 10^6 CFU/ml za endotrahealni aspirat, 10^4 CFU/ml za BAL ter 10^3 CFU/ml za mini-BAL in zaščiteno krtačenje *(4, 9, 11–15)*. Občutljivosti kvantitativne kulture vzorcev iz spodnjih dihal v primerjavi s histopatološko potrjeno diagnozo pljučnice, ugotovljene v različnih raziskavah, znašajo 19–83 % za BAL, 36–83 % za zaščiteno krtačenje in 44–87 % za endotrahealni aspirat. Primerjave specifičnosti pa znašajo 45–100 % za BAL, 50–95 % za zaščitno krtačenje in 31–92 % za endotrahealni aspirat *(11–15)*. Če želimo doseči maksimalno občutljivost kulture kužnine, odvzete iz spodnjih dihal, zadošča kvalitativna obdelava, medtem ko s kvantitativno obdelavo lahko izboljšamo specifičnost *(14, 15)*.

Okužbe dihal pri bolnikih s cistično fibrozo

Mikrobiološka diagnostika okužb dihal pri bolnikih s cistično fibrozo v največji meri temelji na neposrednem dokazovanju za cistično fibrozo značilnih povzročiteljev, kot so *Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae, Pseudomonas aeruginosa,* vrste iz kompleksa *Burkholderia cepacia, Stenotrophomonas maltophilia, Achromobacter xylosoxidans* in atipične mikobakterije v ustreznih kužninah *(16)*. Najprimernejša kužnina je izmeček in ob ustrezni indikaciji bronhoskopsko odvzet vzorec. Pri otrocih in bolnikih, ki ne izkašljujejo, je najboljši približek inducirani izmeček. Pri majhnih otrocih zaradi slabšega sodelovanja pogosto odvzamemo globoki aspirat žrela ali nakašljan bris, kjer je večinoma žal tudi mikrobiota zgornjih dihal. Pri dojenčkih in otrocih, ki še ne znajo izkašljati izmečka, lahko uporabimo aspirat žrela, bris žrela ali induciran izmeček, izjemoma tudi bronhoskopsko odvzet vzorec *(17–19)*.

Izolacija in identifikacija bakterij iz sputuma bolnikov s cistično fibrozo je zahtevnejša, kot pri ostalih bolnikih z okužbami spodnjih dihal, saj *(16)*:

- je izmeček praviloma zelo viskozen in zato zahteva predhodno homogenizacijo z ustreznim mukolitikom,
- večino okužb povzroča več vrst bakterij z različnimi rastnimi zahtevami,
- se bakterije zlasti pri dolgotrajni kolonizaciji oz. kronični okužbi tudi fenotipsko spremenijo ter so zato težje prepoznavne in
- hitro rastoče bakterije, kot je npr. sluzni tip *P. aeruginosa*, pogosto prerastejo druge bakterijske povzročitelje okužb.

Uspešnost osamitve bakterijskih povzročiteljev okužb dihal pri bolnikih s cistično fibrozo lahko povečamo samo z uporabo kombinacije selektivnih gojišč, ki jih pri ostalih bolnikih ni smiselno uporabljati. Zato je izjemno pomembno, da lečeči zdravnik laboratorij opozori, da gre za bolnika s cistično fibrozo. Ključna je uporaba selektivnega gojišča in podaljšana inkubacija (5 dni) za osamitev bakterij iz kompleksa *B. cepacia* (*Burkholderia cepacia* selective agar – BCSA), selektivnega gojišča za *S. aureus* (manitol slani agar ali kromogeni agar za *S. aureus*), selektivnega gojišča za *H. influenzae*, selektivnega gojišča za po Gramu negativne bacile ter poročanje sluznega fenotipa izolatov *P. aeruginosa (16)*. Zavedati se moramo, da fenotipska identifikacija in komercialni identifikacijski sistemi (API 20NE, VITEK 2 (Biomerieux, Francija), BDPhoenix (BD, ZDA) in MicroScan Walkaway (DadeBehring, ZDA, zdaj Siemens)) niso zanesljivi za identifikacijo nefermentativnih po Gramu nega-

tivnih bacilov, ki jih osamimo iz spodnjih dihal pri bolnikih s cistično fibrozo. Identifikacijo netipičnih kolonij *P. aeruginosa* in vseh vrst iz kompleksa *B. cepacia* je treba zato potrditi z molekularnimi metodami *(16)*. Številne raziskave nakazujejo, da bo uporaba masne spektrometrije MALDI-TOF (angl. *matrix assisted laser desorption ionization-time of flight*) zmanjšala potrebo po molekularnih identifikacijskih testih za nefermentativne po Gramu negativne bacile in poenostavila in pospešila prepoznavanje teh pomembnih povzročiteljev okužb dihal pri bolnikih s cistično fibrozo. Osamitev in identifikacija netuberkuloznih mikobakterij mora biti v pristojnosti na tem področju izkušenih laboratorijev *(16)*.

ZAKLJUČEK

Poraba protimikrobnih zdravil za zdravljenje okužb dihal je zelo velika, čeprav je vsaj za zdravljenje večjega deleža okužb zgornjih dihal neupravičena in nepotrebna. Prekomerna uporaba protimikrobnih zdravil pa je glavni spodbujevalec nastanka in širjenja odpornosti bakterij proti antibiotikom. S pomočjo ustrezne mikrobiološke diagnostike okužb dihal na vseh nivojih zdravstvenega varstva bi lahko zmanjšali predpisovanje protimikrobnih zdravil, omogočili ciljano zdravljenje tistih okužb, ki jih je potrebno zdraviti, ter obenem pridobili kakovostne podatke za morebitno prilagajanje nacionalnih priporočil za protimikrobno zdravljenje okužb dihal.

LITERATURA

1. Kraigher A, Sočan M, Klavs I, et al. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2014 [internet]. Nacionalni inštitut za javno zdravje; 2015 [citirano 2016 Oct 7]. Dostopno na: http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/epidemiolosko_spremljanje_nalezljivih_bolezni_2014_2.pdf
2. Rakuš J, Lejko Zupanc T. Akutno vnetje žrela. In: Tomažič J, Strle F, eds. Infekcijske bolezni. Ljubljana: Združenje za infektologijo, Slovensko zdravniško društvo; 2014/2015. p. 252–6.
3. Štrumbelj I. Bakteriološke preiskave zgornjih dihal danes – zakaj in kako. Med Razgl. 2008; 47 Suppl 3: 27–30.
4. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). Clin Infect Dis. 2013; 57 (4): e22–121.
5. ESCMID Sore Throat Guideline Group, Pelucchi C, Grigoryan L, et al. Guideline for the management of acute sore throat. Clin Microbiol Infect. 2012; 18 Suppl 1: 1–28.
6. Shulman ST, Bisno AL, Clegg HW, et al. Clinical practice guideline for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: 2012 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2012; 55 (10): e86–102.
7. Carroll K, Reimer L. Microbiology and laboratory diagnosis of upper respiratory tract infections. Clin Infect Dis. 1996; 23: 442–8.
8. Low DE, Desrosiers M, McSherry J, et al. A practical guide for the diagnosis and treatment of acute sinusitis. Can Med Assoc J. 1997; 156 Suppl 6: 1–14.
9. Tomič V. Mikrobiološka diagnostika okužb spodnjih dihal. Med Razgl. 2008; 47 Suppl 3: 41–4.
10. Lejko Zupanc T, Pokorn M. Pljučnice In: Tomažič J, Strle F, eds. Infekcijske bolezni. Ljubljana: Združenje za infektologijo, Slovensko zdravniško društvo; 2014/2015. p. 272–80.
11. Loens K, Van Heirstraeten L, Malhotra-Kumar S, et al. Optimal sampling sites for detection of pathogens possibly causing community-acquired lower respiratory tract infections. J Clin Microbiol. 2009; 47: 21–31.
12. Johansson N, Kalin M, Tiveljung-Lindell A, et al. Etiology of community-acquired pneumonia. Increased microbiological yield with new diagnostic methods. Clin Infect Dis. 2010; 50: 202–9.

13. American Thoracic Society; Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2005; 171 (4): 388–416.

14. File TM Jr. Recommendations for treatment of hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: review of recent international guidelines. Clin Infect Dis. 2010; 51 Suppl 1: S42–7.

15. Seme K. Mikrobiološka diagnostika pljučnice, povezane z mehanskim predihavanjem. In: Zbornik predavanj 1. mednarodnega izobraževanja s področja okužb pri življensko ogroženih bolnikih. Okužbe pri kritično bolnih. Ljubljana, 2014. Združenje za infektologijo in Slovensko združenje za intenzivno medicino, Ljubljana; 2014. p. 71–5.

16. Laboratory standards for processing microbiological samples from people with cystic fibrosis. In: Report of the UK Cystic Fibrosis Trust Microbiology Laboratory Standards Working Group. 1st ed. 2010 [citirano 2016 Oct 7]. Dostopno na:. https://www.cysticfibrosis.org.uk/the-work-we-do/clinical-care/consensus-documents

17. Hoppe JE, Towler E, Wagner BD, et al. Sputum induction improves detection of pathogens in children with cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol. 2015; 50 (7): 638–46.

18. Doumit M, Belessis Y, Stelzer-Braid S, et al. Diagnostic accuracy and distress associated with oropharyngeal suction in cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2016; 15 (4): 473–8.

19. Hammitt LL, Murdoch DR, Scott JA, et al. Specimen collection for the diagnosis of pediatric pneumonia. Clin Infect Dis. 2012; 54 Suppl 2: S132–9.

Darja Keše[1], Rok Kogoj[2]

Novosti v mikrobiološki diagnostiki atipičnih bakterij

Recent Advances in Laboratory Diagnostics of Atypical Bacteria

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: atipične bakterije, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella* spp., laboratorijska diagnostika

Atipične bakterije, kot so *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* in *Legionella* spp., so pogosto vpletene v okužbe dihal in lahko povzročijo podobne klinične znake. Dokazovanje teh bakterij je težavno zaradi njihovih posebnosti v zgradbi, občutljivosti na zunanje vplive okolja in zapoznelega imunskega odziva. Molekularne metode imajo zato vedno večji pomen v diagnostiki teh povzročiteljev bolezni dihal. V zadnjih letih vse bolj prihajajo v ospredje tudi novejše tehnike pomnožitve nukleinskih kislin, ki omogočajo v eni reakciji hkratno dokazovanje večjega števila patogenov. Večinoma so ti testi ovrednoteni za dokazovanje virusnih povzročiteljev in manj za atipične bakterije.

ABSTRACT

KEY WORDS: atypical bacteria, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella* spp., laboratory diagnostics

Atypical bacteria such as *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* and *Legionella* spp. are often implicated in respiratory tract infections with similar clinical symptoms. Laboratory diagnostics is laborious due to the particular structure of the bacteria, their sensitivity to environmental effects and the delayed immune response. For these reasons, molecular methods are quickly gaining in importance for the diagnosis of these respiratory tract infection agents. Recently, newly developed multiplex methods that allow for the detection of more pathogens in one reaction have become put to practice worldwide. However, such tests are usually validated only for viruses and to a lesser extent for atypical bacteria.

[1] Doc. dr. Darja Keše, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska Fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana, Slovenija; darja.kese@mf.uni-lj.si

[2] Asist. Rok Kogoj, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska Fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana, Slovenija; rok.kogoj@mf.uni-lj.si

UVOD

Atipične bakterije, kot so *Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae* in *Legionella* spp., so vpletene v okužbe dihal in lahko povzročijo podobne klinične znake. Pri otrocih so znane tudi mešane okužbe z respiratornimi patogeni, kar še otežuje klinično sliko. Da bi zmanjšali stroške diagnostike in čas, potreben za ugotovitev povzročitelja okužbe, razvijajo različne multiple molekularne teste, ki omogočajo hkratno dokazovanje dveh ali treh atipičnih bakterij ali celo do 20 različnih povzročiteljev bolezni dihal *(1)*. Vendar pa so multipli testi z verižno reakcijo s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) večinoma ovrednoteni za dokazovanje virusnih povzročiteljev in manj za atipične bakterije. Prav tako so ugotovitve ter rezultati primerjav teh testov z eno-tarčnimi testi PCR dostikrat nasprotujoči glede občutljivosti in specifičnosti. Navzočnost številnih začetnih oligonukleotidov v reakcijski mešanici lahko namreč poveča možnost povezave oligonukleotidov v dimere kot tudi napačne vezave na tarčno DNA, posledica česar so nespecifični pomnoženi pridelki. Koncentracije soli, encimov in temperaturni pogoji se lahko tudi nekoliko razlikujejo pri pomnoževanju posamezne tarčne DNA. Vsi ti dejavniki morda vplivajo na manjšo občutljivost multiplih testov PCR *(2)*. Poleg tega atipične bakterije povzročajo okužbe skozi vse leto in so manj vezane na sezonske epidemije, kot je to značilno za respiratorne viruse.

MYCOPLASMA PNEUMONIAE

Mycoplasma pneumoniae je znana povzročiteljica bolezni dihal pri ljudeh vseh starosti kot tudi izvenpljučnih akutnih in kroničnih okužb *(2)*. V preteklosti so okužbe z M. *pneumoniae* dokazovali z gojenjem na umetnih gojiščih in identifikacijo na podlagi morfoloških značilnosti kolonij. Danes je možno kolonije M. *pneumoniae* hitro prepoznati z metodo MALDI-TOF MS. Osamitev bakterije nima večjega diagnostičnega pomena, saj zahteva tudi več tednov gojenja in ima relativno slabo občutljivost *(3)*.

Za diagnostiko okužb, ki jih povzroča M. *pneumoniae*, tako uporabljamo predvsem serološke in molekularne metode. Encimsko-imunske metode za dokaz protiteles IgM, IgG in IgA so enostavne za dokazovanje okužb z M. *pneumoniae*, vendar je serokonverzija protiteles IgG zapoznela; do nje pride šele v treh do osmih tednih po pojavu bolezenskih znakov, medtem ko protitelesa IgM redkeje dokažemo pri ponovnih okužbah. Poleg tega na protitelesni odziv vpliva tudi imunsko stanje bolnika, ki je lahko oslabljeno zaradi drugih spremljajočih bolezni *(4)*.

Hitrejši dokaz okužb z M. *pneumoniae* v vzorcih zgornjih ali spodnjih dihal omogočajo metode PCR v realnem času, ki kot tarčo izrabljajo gen za beljakovino P1, 16S ribosomalno RNA, ATPazo, proteazo ali gen za toksin CARDS *(2)*.

Vse pogosteje se za dokaz DNA *M. pneumoniae* uporabljajo multipli testi PCR v realnem času, kjer se sočasno dokazuje tudi nukleinska kislina (NK) drugih atipičnih bakterij ali virusov, ki lahko povzročajo okužbe dihal *(3)*. Ključna problema tovrstnega pristopa k diagnostiki sta možnost dokaza NK-patogena, ki ni vzročno vključen v bolezensko stanje, ter nekoliko nižja občutljivost (93–100 %) *(5)*. Včasih je zaradi pomanjkljive standardizacije laboratorijskih testov in različnih rezultatov študij vlogo M. *pneumoniae* v dihalih še vedno težko opredeliti, predvsem pri asimptomatskih nosilcih. Spuesens in sodelavci so v študiji dokazali podoben delež okužb z M. *pneumoniae* tako pri otrocih z boleznijo dihal (16,2 %) kot pri brezsimptomnih otrocih (21 %). Vendar pa obstajajo tudi številne druge raziskave, ki poročajo o statistično značilnih razlikah med bolniki z dokazano mikopla-

zemsko okužbo in zdravimi preiskovanci *(6)*. Potekajo tudi raziskave, ki skušajo z ugotavljanjem bakterijskega bremena pojasniti dokaz NK *M. pneumoniae* pri navidezno zdravih ljudeh *(7)*.

V zadnjem času se pojavlja vse več skrb vzbujajočih objav zaradi naraščajoče rezistence *M. pneumoniae* na makrolide, ki je povezana s točkovnimi mutacijami v domeni V gena 23S ribosomalne RNA. V azijskih državah, predvsem na Kitajskem, naj bi bilo že več kot 90 % okužb povzročenih s sevi *M. pneumoniae*, odpornih na makrolide *(8)*. V Sloveniji smo z metodo pirosekvenciranja mutacije, povezane z rezistenco, ugotovili pri manj kot 1 % pregledanih sevov *M. pneumoniae (9)*. Ta rezultat je primerljiv s podatki iz Evrope in Amerike, kjer je odpornost mikoplazem proti makrolidom ugotovljena v manj kot 10 % *(10, 11)*. Zaradi naraščajoče rezistence *M. pneumoniae* na makrolide se tako pojavlja potreba po uvedbi molekularnih testov, s katerimi bi sočasno dokazovali okužbe z *M. pneumoniae* in mutacije, ki so povezane z rezistenco *(2)*.

Genotipizacija *M. pneumoniae* postaja vse pomembnejša pri raziskovanju epidemij. Tradicionalno se je *M. pneumoniae* tipiziralo glede na razlike v ponavljajočih se elementih RepMP2/3 in RepMP4 znotraj gena za adhezin P1 z uporabo tehnike polimorfizma dolžin pomnoženih fragmentov (angl. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP) *(12)*. To dolgotrajno in zahtevno metodo danes nadomeščajo metode visokoresolucijsko taljenje (angl. *high resolution melting* – HRM), pirosekvenciranje, sekvenciranje po Sangerju, analiza multilokusnih spremenljivo število tandemskih ponovitev (angl. *multilocus variable number of tandem repeat analysis*, MLVA) in multilokusno sekvenčno tipizacijo (angl. *multilocus sequence typing*, MLST) (13). S pomočjo metode MLVA so raziskovalci ugotovili, da je bila svetovna epidemija leta 2010–2011 poliklonskega izvora *(14, 15)*. Metoda sekvenciranja celotnega genoma (angl. *whole genome sequencing*, WGS) ima najvišjo ločljivost in je zaradi razvoja vse bolj zmogljivih platform ter zniževanja cene tovrstne analize vedno dostopnejša *(5)*. Tako so samo v letu 2015 raziskovalci sekvencirali 38 genomov izolatov *M. pneumoniae (16, 17)* in pri tem ugotovili, da je *M. pneumoniae* genetsko pestrejša, kot so do sedaj predvidevali.

LEGIONELLA SPP.

Legionele so fakultativne znotrajcelične, po Gramu negativne bakterije, ki živijo v vodnem okolju in zemlji. Okužba poteka predvsem preko vdihavanja okuženih aerosolov in redkeje preko mikroaspiracije okužene vode. Povzročajo pljučnico oz. legionarsko bolezen in milejšo pontiaško vročico. Do sedaj poznamo preko 60 vrst legionel z več kot 70 serološkimi skupinami, med katerimi je vsaj 24 vrst takih, ki lahko povzročijo okužbo pri ljudeh *(18)*. Najbolj patogena vrsta je *L. pneumophila* serološke skupine 1, ki povzroča več kot 90 % vseh legionarskih pljučnic *(19)*. Druge vrste, kot so *L. anisa, L. micdadei, L. dumoffii* in *L. bozemanae*, pogosto kolonizirajo vodovodne sisteme, a redkeje povzročajo okužbe pri ljudeh, običajno le pri imunsko oslabljenih bolnikih v zdravstvenih ustanovah. Po novejših podatkih iz ZDA in Avstralije je stopnja smrtnosti med bolnišničnimi okužbami z legionelo 14 %, in 5–10 % med okužbami, pridobljenimi v domačem okolju *(20)*.

Klinični znaki in simptomi legioneloze niso specifični, zato je pomembno, da hitro identificiramo povzročitelja, da lahko uvedemo ustrezno zdravljenje, ugotovimo vir okužbe in preprečimo nadaljnje širjenje okužbe *(21)*. Zlati standard v diagnostiki legionelnih okužb še vedno ostaja osamitev bakterije iz vzorcev spodnjih dihal bolnikov, saj omogoča diagnostiko okužb z vsemi vrstami legionel, raziskavo

izbruhov legioneloz, epidemiološke študije in ugotavljanje občutljivosti na antibiotike. Kljub temu se zaradi zahtevnosti izvedbe, relativno slabe občutljivosti (20–80 %) in dolgotrajnega postopka metodo le redko uporablja v mikrobioloških laboratorijih. Nizka občutljivost metode je lahko posledica slabe kvalitete kužnine (predvsem izmečka), predhodne antibiotične terapije bolnika, kot tudi zahtevnih pogojev rasti bakterije in slabe usposobljenosti laboratorijskega osebja *(22)*. Poleg tega več kot polovica bolnikov nima produktivnega kašlja *(23)*.

V zadnjem desetletju je v diagnostiki legioneloz opazen upad uporabe seroloških metod iz 61 % na manj kot 6 % *(19)*. Glavni razlog je predvsem v nastopu serokonverzije, do katere običajno pride v treh do štirih tednih ali celo v 10 tednih po nastopu bolezni. Posamičen visok titer protiteles v akutnem serumu sicer nakazuje verjetno okužbo, a ni zanesljiv, saj so protitelesa lahko navzoča zaradi predhodne izpostavitve legionelam ali so navzkrižno reaktivna. Poleg tega raziskave kažejo, da mnogi imunsko oslabeli bolniki nimajo protitelesnega imunskega odziva na okužbo *(22)*.

Encimska imunoadsorpcijska preiskava (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) in imunokromatografski testi (angl. *immunochromatographic test*, ICT) za dokaz topnega antigena *L. pneumophila* v urinu (angl. *urinary antigen*, UAg) se uporabljajo kar v 82–97 % vseh preiskav za prepoznavanje legioneloze *(19, 24)*. Topni antigen lahko dokažemo že v enem do treh dneh po pojavu bolezenskih znakov. Specifičnost testa je 99 %, medtem ko je občutljivost testa od 70–90 % za dokaz okužbe z *L. pneumophila* serološke skupine 1, pridobljene v domačem okolju, in manj kot 50 % za dokaz okužbe z drugimi serološkimi skupinami. Pomanjkljivost testa se kaže tudi v nizki občutljivosti pri blažjih oblikah okužbe in pri okužbah z legionelami drugih vrst *(25)*. Zato se tudi v diagnostiki legioneloz vse bolj uveljavlja metoda PCR v realnem času, predvsem za hkratno odkrivanje DNA *L. pneumophila* in DNA *Legionella* spp. Delež prijavljenih primerov legioneloz, ugotovljenih z metodo PCR, se je tako povečal iz 2 % v letu 2008 na 8 % v letu 2014 *(24)*.

Žal nobena od teh metod nima zadosti visoke občutljivosti, zato se priporoča testiranje bolnika s sumom na legionelozo vsaj z dvema testoma. S hkratno uporabo metode PCR in testa za dokaz topnega antigena odkrijemo lahko za 11 % več bolnikov kot z uporabo samo enega *(26, 27)*.

Za ugotavljanje vira okužbe in za preprečevanje nadaljnjih okužb je nujno, da primerjamo klinične seve legionele in legionele iz okolja, ki jim je bil bolnik izpostavljen. Trenutno je zlati standard na tem področju tipizacija s sekvenčno analizo (angl. *sequence-based typing*, SBT), ki temelji na določanju nukleotidnega zaporedja izbranih regij sedmih genskih lokusov in se lahko izvaja tudi neposredno iz kužnine brez predhodne osamitve bakterije. Večjo ločljivost posameznih podtipov *L. pneumophila* serološke skupine 1 dosežemo še z dodatno serotipizacijo s specifičnimi 21 monoklonskimi protitelesi. Na ta način določimo fenotip in genotip posamezne legionele. Sekvenciranje celotnega genoma omogoča tipizacijo v 24 urah po osamitvi legionele in ima najvišji indeks diskriminacije, kar po vsej verjetnosti predstavlja prihodnost v molekularni tipizaciji legionel *(28)*.

Genotipizacija bakterije *L. pneumophila* ima pomembno vlogo pri dokazovanju skladnosti kliničnega in okoljskega seva kot tudi pri primerjavi sekvenčnih profilov legionel v različnih državah. Ti podatki so izjemnega pomena za razumevanje epidemiologije in ekologije bakterije *L. pneumophila* ter za razvoj smernic in preventivnih ukrepov.

CHLAMYDIA (CHLAMYDOPHYLA) PNEUMONIAE

Okužbe, ki jih povzroča *Chlamydia pneumoniae*, je še vedno zelo težko dokazovati. Najbolj omejujoč dejavnik je njihova občutljivost na zunanje vplive okolja in majhna vsebnost bakterij v bolnikovi kužnini. Laboratorijska diagnostika zato še vedno temelji na serološkem testu mikroimunofluorescence in molekularnem dokazovanju s testi PCR. Ker *M. pneumoniae* in *C. pneumoniae* povzročata atipično pljučnico s podobnimi kliničnimi znaki, je smiselno hkrati dokazovati obe povzročiteljici. V ta namen uporabljamo multiple teste PCR v realnem času.

ZAKLJUČEK

Molekularne metode imajo velik pomen v dokazovanju atipičnih bakterij kot povzročiteljev bolezni dihal. V zadnjih letih vse bolj prihajajo v ospredje tudi novejše tehnike pomnoževanja nukleinskih kislin, ki v eni reakciji omogočajo hkratno dokazovanje večjega števila patogenov. Poleg tega napredki na področju tipizacije bakterij s tehnikami sekvenciranja celotnega genoma neposredno iz kužnine nakazujejo, da bi lahko v bodoče postale metode izbora za epidemiološke raziskave.

Literatura

1. JH, Lam HY, Yip CC, et al. Clinical evaluation of the new high-throughput Luminex NxTAG respiratory pathogen panel assay for multiplex respiratory pathogen detection. J Clin Microbiol. 2016; 54 (7): 1820–5.
2. Loens K, Ieven M. *Mycoplasma pneumoniae*: current knowledge on nucleic acid amplification techniques and serological diagnostics. Front Microbiol. 2016; 7: 448.
3. Parrott GL, Kinjo T, Fujita J. A compendium for *Mycoplasma pneumoniae*. Front Microbiol. 2016; 7: 513.
4. Loens K, Goossens H, Ieven M. Acute respiratory infection due to *Mycoplasma pneumoniae*: current status of diagnostic methods. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010; 29 (9): 1055–69.
5. Diaz MH, Winchell JM. The evolution of advanced molecular diagnostics for the detection and characterization of *Mycoplasma pneumoniae*. Front Microbiol. 2016; 7: 232.
6. Jain S, Williams DJ, Arnold SR, et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. children. N Engl J Med. 2015; 372: 835–45.
7. Jiang W, Yan Y, Ji W, et al. Clinical significance of different bacterial load of *Mycoplasma pneumoniae* in patients with *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. Braz J Infect Dis. 2014; 18 (2): 124–8.
8. Okada T, Morozumi M, Tajima T, et al. Rapid effectiveness of minocycline or doxycycline against macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infection in a 2011 outbreak among Japanese children. Clin Infect Dis. 2012; 55 (12): 1642–9.
9. Kogoj R, Mrvic T, Praprotnik M, et al. Prevalence, genotyping and macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* among isolates of patients with respiratory tract infections, Central Slovenia, 2006 to 2014. Euro Surveill. 2015; 20 (37). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.37.30018.
10. Steffens IKH, Wilson W, Wilson K. Special edition: *Mycoplasma pneumoniae* and *Legionella pneumophila*. Euro Surveil. 2012; 17: 2–47.
11. Zheng X, Lee S, Selvarangan R, et al. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*, United States. Emerg Infect Dis. 2015; 21 (8): 1470–2.
12. Sasaki T, Kenri T, Okazaki N, et al. Epidemiological study of *Mycoplasma pneumoniae* infections in japan based on PCR-restriction fragment length polymorphism of the P1 cytadhesin gene. J Clin Microbiol. 1996; 34 (2): 447–9.
13. Brown RJ, Holden MT, Spiller OB, et al. Development of a multilocus sequence typing Scheme for molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae*. J Clin Microbiol. 2015; 53 (10): 3195–203.
14. Chalker V, Stocki T, Litt D, et al. Increased detection of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children in England and Wales, October 2011 to January 2012. Euro Surveill. 2012; 17 (6). pii: 20081.

15. Diaz MH, Benitez AJ, Cross KE, et al. Molecular Detection and Characterization of *Mycoplasma pneumoniae* Among Patients Hospitalized With Community-Acquired Pneumonia in the United States. Open Forum Infect Dis. 2015; 2 (3): ofv106.
16. Lluch-Senar M, Cozzuto L, Cano J, et al. Comparative „-omics" in *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates reveals key virulence factors. PLoS One. 2015; 10 (9): e0137354.
17. Xiao L, Ptacek T, Osborne JD, et al. Comparative genome analysis of *Mycoplasma pneumoniae*. BMC Genomics. 2015; 16: 610.
18. Benitez AJ, Winchell JM. Rapid detection and typing of pathogenic nonpneumophila *Legionella* spp. isolates using a multiplex real-time PCR assay. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016; 84 (4): 298–303.
19. Beauté J, Zucs P, de Jong B, et al. Legionnaires disease in Europe, 2009-2010. Euro Surveill. 2013; 18 (10): 20417.
20. Palusińska-Szysz M, Cendrowska-Pinkosz M. Pathogenicity of the family Legionellaceae. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2009; 57 (4): 279–90.
21. Mercante JW, Winchell JM. Current and emerging Legionella diagnostics for laboratory and outbreak investigations. Clin Microbiol Rev. 2015; 28 (1): 95–133.
22. Cunha BA, Burillo A, Bouza E. Legionnaires' disease. Lancet. 2016; 387 (10016): 376–85.
23. Blyth CC, Adams DN, Chen SC. Diagnostic and typing methods for investigating Legionella infection. N S W Public Health Bull. 2009; 20 (9–10): 157–61.
24. European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease in Europe, 2014. Stockholm: ECDC; 2016.
25. Avni T, Bieber A, Green H, et al. Diagnostic Accuracy of PCR alone and compared to urinary antigen testing for detection of *Legionella* spp.: a systematic review. J Clin Microbiol. 2016; 54 (2): 401–11.
26. Diederen BM, Kluytmans JA, Vandenbroucke-Grauls CM, et al. Utility of real-time PCR for diagnosis of Legionnaires' disease in routine clinical practice. J Clin Microbiol. 2008; 46 (2): 671–7.
27. Botelho-Nevers E, Grattard F, Viallon A, et al. Prospective evaluation of RT-PCR on sputum versus culture, urinary antigens and serology for Legionnaire's disease diagnosis. J Infect. 2016; 73 (2): 123–8.
28. Khodr A, Kay E, Gomez-Valero L, et al. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Legionella*. Infect Genet Evol. 2016; 43: 108–22.

Miroslav Petrovec[1]

Mikrobiološka diagnostika virusnih okužb dihal

Microbiological Diagnostics of Viral Respiratory Tract Infections

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: okužbe dihal, virusi, mikrobiološka diagnostika

Diagnostika virusnih okužb dihal je v zadnjih letih doživela pravi razcvet, ki temelji na uporabi različnih, najnovejših molekularnih tehnologij. Kljub vrhunski tehnologiji dokazovanja virusov ostaja še precej nerešenih problemov. Ti so povezani predvsem s predanalitičnim delom, ki zajema odvzem in transport vzorca, časom, potrebnim do rezultata preiskave, in interpretacijo izvidov. Kljub izjemnemu tehničnemu napredku pa je še zelo malo objavljenih raziskav, ki bi molekularno testiranje na respiratorne viruse umestile v klinično pot diagnostike okužb dihal in določile stroškovno učinkovitost in algoritme uporabe. Za zagotavljanje najboljše možne kakovosti oskrbe bolnika je potrebna dobra komunikacija med kliničnim mikrobiologom in zdravnikom, ki mora trajati od odvzema kužnine do interpretacije rezultatov.

ABSTRACT

KEY WORDS: respiratory infections, viruses, microbiological diagnostics

In recent years, laboratory diagnostics of respiratory viral infections is becoming one of the most rapidly developing fields of virology mostly due to the use of molecular techniques. Even with the most modern technologies many problems need to be addressed. Preanalytic procedures, collection and transport of samples, turnaround time of tests and interpretation of the analytical findings are among the most burning issues. Further studies are required to place the newly developed tests in different clinical situations as are algorithms and recommendations for the most efficient and economical use of these technologies. Continuous communication between the virology laboratory and the physician from sample collection to data interpretation is of paramount importance to ensure the highest quality for patient care.

[1] Prof. dr. Miroslav Petrovec, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; mirc.petrovec@imi.si

UVOD

Virusne okužbe dihal so med najpogostejšimi okužbami nasploh *(1)*. Večina virusnih okužb pogosteje prizadene zgolj zgornja dihala. Čeprav prizadenejo okužbe vse starostne skupine, so bolj ogroženi otroci (predvsem do 3. leta starosti), starostniki, bolniki z drugimi osnovnimi boleznimi in imunsko oslabljeni bolniki *(2)*. Pri njih se pogosteje razvije težka klinična slika okužbe spodnjih dihal, kot so npr. pljučnica, bronhitis, bronhiolitis in poslabšanje osnovnih pljučnih bolezni, kot sta astma in kronična obstruktivna pljučna bolezen (KOPB) *(1, 3–5)*. Čeprav lahko v grobem povežemo virusne povzročitelje z določeno klinično sliko okužbe dihal, je zgolj s kliničnim pregledom nemogoče potrditi etiologijo bolezni. Veliko nam pri tem lahko pomagajo sveži epidemiološki podatki (če jih imamo na voljo), pogoj za njihovo generiranje pa je vzpostavljena mreža klinik in laboratorijev, ki pri tem sodelujejo.

Diagnostiko virusnih okužb dihal zapleta predvsem veliko število povzročiteljev, ki so lahko vzrok okužbe. Dodaten problem predstavlja interpretacija rezultatov, ker se virusi v dihalih lahko zadržujejo še več tednov ali celo mesecev po okrevanju, prav tako so pri majhnih otrocih pogoste zaporedne okužbe *(6)*. Danes še ne poznamo odgovora na vprašanje, kaj pomeni hkraten dokaz nukleinskih kislin več respiratornih virusov, ki so lahko vsak zase ali pa skupno etiološko povezani z okužbo dihal. Ali hkratna okužba z več virusi poteka drugače ali težje kot okužba s samo enim virusom, še ni povsem jasno, saj so na voljo nasprotujoči si podatki *(1, 6)*.

RAZLOGI ZA DIAGNOSTIKO VIRUSNIH OKUŽB DIHAL

Večina okužb dihal je blage, trivialne narave in zaradi njih bolniki ne iščejo zdravniške pomoči. Včasih je zaradi hudih ali dalj časa trajajočih simptomov potreben obisk zdravnika, ki pa se le redko konča z napotitvijo bolnika k specialistu ali s hospitalizacijo. Jasno je, da pri takih vrstah okužb etiološka diagnostika ni potrebna. Specifična in natančna diagnoza pa je pomembna predvsem v naslednjih okoliščinah:

- pri bolnikih, ki prejemajo imunosupresivna zdravila,
- za ustrezno ukrepanje za zmanjšanje hospitalnih okužb,
- za uvedbo specifičnega zdravljenja ali specifične preventive (gripa, respiratorni sincicijski virus – RSV, adenovirusi) in
- za zbiranje epidemioloških podatkov o okužbah v populaciji.

Druge pozitivne posledice uspešne respiratorne virološke diagnostike so tudi zmanjšanje uporabe antibiotikov, zmanjšanje dodatnih laboratorijskih in kliničnih preiskav in s tem dodatnih stroškov pri oskrbi bolnika *(7)*. Najpomembnejši razlog za virusno diagnostiko v kliničnem okolju je potencialni vpliv rezultatov testiranja na triažo in zdravljenje bolnikov. V letu 2016 so bili prvič objavljeni podatki o vplivu hitre molekularne diagnostike na klinični izhod odraslih bolnikov *(8)*. V raziskavi, v kateri so primerjali dve obdobji, v katerih so najprej uporabljali virusno diagnostiko z dokazovanjem virusnih antigenov z obdobjem, ko so viruse dokazovali s hitro molekularno metodo, so ugotovili, da je uporaba molekularne diagnostike znatno skrajšala čas do diagnoze. V prvem obdobju je bil čas do diagnoze gripe 7,7 ure, po uvedbi molekularnega testiranja pa le še 1,7 ure. Še bolj se je skrajšal čas do diagnoze za druge respiratorne viruse: s 13,5 ur na samo 1,5 ure. Še pomembnejša ugotovitev je bila, da se je pri bolnikih s potrjeno okužbo z virusom gripe (pa tudi pri tistih, ki so imeli dokazan drug respiratorni virus) zmanjšala verjetnost za sprejem v bolnišnico, skrajšal se je tudi čas hospitalizacije. Čeprav se

pogostost uporabe protimikrobnih zdravil ni zmanjšala, se je skrajšal čas protimikrobnega zdravljenja pri bolnikih s potrjeno virusno okužbo. Zmanjšalo se je tudi število opravljenih rentgenskih pregledov pljuč *(8)*. Podobna študija je bila izvedena tudi z vključitvijo bolnih otrok. Tudi v tej so dokazali znatno skrajšanje časa do rezultata testiranja in skrajšanje časa obravnave na urgentnem oddelku *(9)*.

KUŽNINE

Izločanje virusov, ki povzročajo okužbe dihal, je največje v prvih dneh od začetka okužbe, zato je zelo pomembno, da vzorec odvzamemo čim bolj zgodaj po pojavu simptomov. V primeru okužbe z virusom influence A (InfA) so v nedavni raziskavi ugotovili, da je izločanje virusa največje prvi in drugi dan bolezni, do 6. ali 7. dneva pa se postopno zniža na ničelne vrednosti. Pri virusu influence B (InfB) so ugotovili, da je izločanje virusa zelo veliko že dva dni pred začetkom simptomov in vztraja do 6. ali 7. dneva po pojavu bolezni, in sicer v dvofazni obliki *(10)*. Primerne kužnine za virološko preiskavo so nazofaringealni aspirat (NFA), izpirek nosu, nazofaringealni bris in bris žrela. Pri okužbah spodnjih dihal pa so ob navedenih kužninah primerni še sputum, aspirat traheje, bronhoalveolarni lavat (BAL) in druge invazivno pridobljene kužnine. V vseh do sedaj opravljenih raziskavah se je kot najprimernejša kužnina zgornjih dihal izkazal NFA, ki pa ga v Sloveniji izjemno redko dobimo v analizo (manj kot 0,5 % vseh poslanih vzorcev v letu 2007). Za odvzem NFA potrebujemo izurjeno osebje in tudi nekaj dodatne opreme (aspirator, sterilno cevko ali kateter). Pri odvzemu NFA je možen nastanek aerosolov in s tem nekoliko večja možnost za razvoj hospitalne okužbe. Med kužninami, ki jih lahko odvzamemo iz spodnjih dihal, je najboljši BAL, sputum pa je zaradi specifične konsistence (sluz) težji za obdelavo *(11)*.

Nazofaringealni bris (lahko tudi v kombinaciji z brisom žrela) se je v večini raziskav izkazal kot primerna kužnina, vendar je občutljivost molekularnih preiskav, ki jih izvajamo iz vzorcev brisov v primerjavi z NFA nižja za 3–10 % *(12)*. Posebno novost pri odvzemu kužnin iz zgornjih dihal predstavljajo novo razviti krtačkasti brisi (angl. *flocked swabs*), za katere je dokazano, da pri odvzemu zadržijo več celic in tekočine, kasneje pa jih pri obdelavi v laboratoriju tudi več sprostijo v transportni medij. Z uporabo molekularnih metod in krtačkastih brisov so se raziskovalci zelo približali občutljivosti detekcije, ki jo izkazuje NFA *(13)*. Zaradi naštetih prednosti pri odvzemu in minimalni izgubi senzitivnosti, je bris praktično v celoti nadomestil NFA tudi v okoljih, kjer je bila to prej standardna kužnina.

Poudariti moramo, da je bris žrela manj primeren, kadar je odvzet kot edina kužnina *(11)*. V primeru, da želimo izvesti osamitev virusa na celični kulturi, je pomembno, da bris takoj po odvzemu odložimo v ustrezen transportni medij za viruse in ga čim hitreje transportiramo v laboratorij (transport mora biti izveden v roku ene ure). Infektivnost virusov (še posebej RSV) že v nekaj urah zelo hitro pade, če so izpostavljeni sobni temperaturi. Infektivnost virusov in s tem možnost uspešne osamitve na celični kulturi se precej zmanjša tudi v vzorcih in kužninah, ki so izpostavljene večkratnim ciklom zmrzovanja in odtajevanja. Današnje formulacije virusnih transportnih medijev (VTM) so prilagojene tako, da lahko iz odvzetega brisa izvedemo katerokoli preiskavo za dokaz respiratornih virusov pod pogojem, da je ta ustrezno hitro transportirana v laboratorij. Najbolje je, da ne glede na zahtevano metodo diagnostike vse brise hranimo v VTM. Zanimiva pa je ugotovitev britanskih raziskovalcev, da lahko za molekularne preiskave na respiratorne viruse odvzamejo celo suhe brise in jih

brez škode za rezultate pošljejo na analizo v laboratorij pri sobni temperaturi v roku dveh dni *(14)*.

Vzorcev, kot so BAL, NFA ali aspirat traheje, ni potrebno transportirati v VTM, ampak jih pri 4 °C čim prej prenesemo v laboratorij v sterilni posodici ali epruveti. Vzorce tkiva, odvzete pri biopsiji ali posmrtno, je najbolje transportirati v VTM, če ni druge izbire tudi v sterilni fiziološki raztopini. Do preiskave jih lahko tudi zamrznemo na –70 °C.

Najpogostejše napake, vezane na odvzem kužnin dihal, ki jih zaznavamo pri rutinskem delu, so:

- predolg transport,
- bris je poslan brez transportnega gojišča ali druge primerne tekočine,
- v transportnem gojišču ni brisa,
- bris je bil odvzet s setom za bakteriološke preiskave in bakteriološkim transportnim gojiščem (trdno transportno gojišče),
- odvzet je samo bris žrela za metodo direktne imunofluorescence (DIF),
- tip kužnine,
- čas odvzema in
- bolnikovi podatki niso ustrezno označeni.

POVZROČITELJI

Virusne povzročitelje okužb dihal lahko razdelimo glede na več kriterijev (vrsta genoma, povzročitelji okužb zgornjih ali spodnjih dihal, porajajoči ali klasični itd). Tudi krajši opis lastnosti posameznih povzročiteljev bi presegal obseg in namen tega prispevka, zato navajam samo ustrezno literaturo *(11)*. Klasičnim povzročiteljem, kamor spadajo adenovirusi, RSV, virusa influence A in B ter virusi parainfluence, so se v zadnjih letih pridružili nekateri novo identificirani virusi, kot so humani metapneumovirus (hMPV), novi koronavirusi NL63 in HKU1 (HCoV-NL63 in HcoV-HKU1), bokavirusi, humani rinovirusi vrste C in poliomavirusi WU in KI *(15, 16)*. Z njihovim odkritjem in začetkom uporabe molekularnih metod pa se je začelo ponovno odkrivanje že dolgo znanih povzročiteljev virusnih okužb dihal, kot so npr. enterovirusi, rinovirusi in koronavirusi.

METODE

Metode za pomnoževanje nukleinskih kislin so v zadnjih 15 letih temeljito spremenile pogled na diagnostični virološki laboratorij. Bliskovit razvoj novih tehnik, metod in aparatur hitro dopolnjuje in celo prehiteva naše vedenje o biologiji povzročiteljev okužb. Tako danes v izkušenih in dobro opremljenih laboratorijih ni več velikih tehničnih problemov, kako hitro, učinkovito in zanesljivo pomnožiti del DNA- ali RNA-genoma respiratornih (in drugih) virusov. Večji problem predstavlja interpretacija velike količine podatkov, ki v tem še niso zadovoljivo vzporejani s kliničnimi podatki o poteku bolezni pri bolnikih z virusnimi okužbami dihal. Ker so bile posebnosti za »klasične« metode virološke diagnostike že opisane drugje, tudi v slovenščini, se omejujemo zgolj na opis uporabe modernih molekularnih preiskav, ki so v zadnjih petih letih s tehnološkim razvojem postale dosegljive širokemu krogu uporabnikov in so praktično izrinile vse druge, prej uporabljane metode.

Kljub enostavnosti izvedbe, ki večinoma vključuje zgolj stresanje (vorteksiranje) vzorca in dodajanje v kaseto z reagenti, ne smemo nikoli spregledati, da gre za zelo občutljive molekularne metode, ki kot končno posledico vključuje nastanek pomnožkov nukleinskih kislin. Kužnine bolnikov lahko v akutnem obdobju, predvsem če gre za otroke, vsebujejo velike količine virusnih nukleinskih kislin, ki se lahko tudi ob pazljivem ravnanju znajdejo na površini epruvet, v katerih se transportirajo brisi in so lahko vir kontaminacije med vzorci. Novo nastali pomnožki v kasetah z reagenti pa so lahko vir kontaminacije v naslednjih reakcijah. Pri rav-

nanju tako s kužninami kot z izrabljenimi reagenti (kasetami) moramo biti zato izjemno previdni, sicer lahko v diagnostiki povzročimo hude napake. Ker gre za zaprte sisteme, moramo biti še posebej pozorni na kakršnekoli znake puščanja tekočine, kajti te lahko vsebujejo pomnožke, ki so vir kontaminacije. Puščanje takšnih sistemov smo pri rutinski diagnostiki opazili že vsaj pri dveh neodvisnih sistemih za diagnostiko respiratornih virusov in vsaj v enem primeru dokazali kontaminacijo tako aparature kot okolja. Na take primere moramo osebje načrtno pripraviti (obvezno dnevno optično preverjanje notranjosti aparature in pregled porabljenih kontejnerjev z reagenti), saj lahko takšna napaka pri slepem zaupanju v sistem ostane povsem neopažena.

Najširše uporabljana platforma v Sloveniji je trenutno FilmArray (Biofire, Biomerieux, Francija), ki vsebuje 15 virusnih in 3 bakterijske tarče *(9, 17)*. Sama zasnova testa z vključitvijo tako različnih tarč, kot so virusi z genomom RNA in bakterije pomeni sklepanje kompromisov pri postopkih ekstrakcije in pomnoževanja nukleinskih kislin. Zato je obvezno natančno branje spremne dokumentacije in dosledno obveščanje naročnikov o morebitnih posebnostih pri diagnostiki posamičnih tarč. Nekateri strokovnjaki se ne strinjajo s tako širokim naborom tarč in opozarjajo na razlike v kliničnem izražanju npr. okužbe s koronavirusi in oslovskega kašlja. Drugi zagovarjajo strogo pragmatičen pristop z vključitvijo samo tistih tarč, za katere je že jasno, da bodo v primeru pozitivnega rezultata pomenile drugačno ukrepanje pri bolniku ali uporabljajo restrikcijo nabora možnih tarč, kadar gre za sezono gripe *(18)*. Različni proizvajalci zato omogočajo modularno sestavljanje nabora tarč v različnih formatih testov. Z laboratorijskega vidika je omogočanje modularnosti tudi dvorezen meč, saj ob skromnem naboru virusnih tarč to pogosto pomeni dodatna testiranja v primeru negativnih rezultatov. Tudi izbor ožjega nabora tarč za uporabo v obdobju visoke sezone okužb (npr. InfA, InfB, RSV) lahko vodi v situacije, ko s klasičnim molekularnim dodatnim testom dokažemo virus, ki ga s hitrim molekularnim testom nismo *(18)*. Takšne situacije pogosto povzročajo nezaupanje klinikov v uporabljene teste, čeprav se npr. občutljivost lahko razlikuje le za nekaj odstotnih točk v koristih klasičnih molekularnih metod.

POSEBNOSTI PRI DIAGNOSTIKI GRIPE

Testiranje na viruse gripe zaradi uvedbe zdravljenja ni potrebno pri vseh bolnikih z značilnimi simptomi in znaki gripe. Ko je laboratorijsko potrjeno kroženje virusov gripe v populaciji, je za bolnike, ki niso sprejeti na bolnišnično zdravljenje, mogoče diagnozo postaviti klinično, še posebej v obdobju epidemije. Testiranje na virus gripe je priporočljivo za bolnike, ki potrebujejo sprejem v bolnišnico in bi pozitiven rezultat spremenili klinično obravnavo bolnika. Kliniki morajo biti seznanjeni z značilnostmi testa, ki ga uporablja mikrobiološki laboratorij (specifičnost in občutljivost), in s primernimi kužninami. Če klinična slika narekuje potrebo po protivirusnem zdravljenju, ga je potrebno uvesti še predno so na voljo rezultati testiranja, še posebej, če je to v obdobju epidemije gripe. Učinkovitost protivirusnega zdravljenja je tem večja, če je uvedena čim prej po razvoju simptomov bolezni, kar je še posebej pomembno za bolnike z dodatnimi dejavniki tveganja za hud potek bolezni in zaplete. Pri bolnikih, ki se zdravijo v bolnišnici, je primerno testiranje vzorcev zgornjih dihal, predvsem brisa nosno-žrelnega prostora. Pri bolnikih z znaki okužbe spodnjih dihal je v primeru negativnega rezultata primerno tudi testiranja izmečka. Pri tistih bolnikih, kjer pride do dihalne odpovedi, so primerne kužni-

ne tudi aspirat traheje in BAL. V nedavno objavljeni raziskavi so ugotovili, da je optimalno občutljivost testiranja za viruse gripe mogoče doseči samo s hkratnim testiranjem tako brisa nosno-žrelnega prostora kot tudi izmečka. Raziskovalci so dokazali, da je bilo moč virus gripe dokazati pri nekaterih bolnikih zgolj v izmečku, med tem ko je bil bris nosno-žrelnega prostora negativen *(17)*.

Uporaba molekularnih testov za gripo je pomembna tudi za namen odkrivanja epidemij v zdravstvenih ustanovah in ustanovah za dolgotrajno oskrbo, kot so rehabilitacijske ustanove in domovi za ostarele *(19, 20)*. V primeru izbruhov v ustanovah ni potrebno testiranje vseh obolelih, ampak se odločimo zgolj za potrditev enega ali nekaj epidemiološko povezanih primerov, ki nam olajša uvedbo specifičnih protivirusnih zdravil in drugih potrebnih ukrepov *(20)*.

Žal danes uporabljani molekularni testi še ne omogočajo, da bi bili rezultati na voljo v tako kratkem času, da bi bilo mogoče ukrepanje na osnovi laboratorijskega testiranja. Najnovejše tehnologije dokazovanja virusov, ki jih lahko pričakujemo že v najkrajšem času, pa že združujejo preprostost in hitrost uporabe imunodifuzijskih testov in občutljivost molekularnih testov. Tako so že na voljo diagnostične platforme, ki bodo rezultate lahko podale v 15–20 minutah od začetka testiranja. Po podatkih, ki so na voljo, taki testi v primerjavi s trenutno uporabljanimi molekularnimi testi (verižna reakcija s polimerazo) dosegajo občutljivost med 70 in 100 % *(21)*.

ZAKLJUČEK

Najpomembnejše novosti na področju virusnih okužb dihal lahko strnemo v naslednje ugotovitve. V zadnjih letih se je močno povečala dostopnost sodobnih, specifičnih, zelo občutljivih testov za laboratorijsko diagnostiko virusnih okužb dihal. Zelo se je povečalo število različnih virusov, ki jih lahko dokažemo v kužninah dihal, saj večina sodobnih neposrednih testov vsebuje širok nabor respiratornih virusov *(9)*. Sodobni testi so zasnovani večinoma na principu »vse v enem«, kjer pri testiranju ni več potreben poseben korak ekstrakcije nukleinskih kislin in pri večini testov tudi ne korak dodajanja reagentov. Vse to se pozitivno odraža v enostavnosti in hitrosti izvedbe testiranja. Najnovejše različice testov, ki so tik pred uvedbo v rutinsko diagnostiko, bodo čas do rezultata v primerjavi s trenutno situacijo skrajšale še za dva do trikrat, kar bo resnično omogočilo rezultat, na osnovi katerega bo mogoče sprejemati na etiologijo usmerjene klinične odločitve.

Najpogosteje testirana kužnina je postal bris nosno-žrelnega prostora ali kombinirani bris ustnega in nosnega dela žrela. Glede na nedavne objave, je postalo jasno, da bi bilo potrebno za optimalno občutljivost testiranja na viruse gripe pri bolnikih z znaki in simptomi okužbe spodnjih dihal, testirati tudi izmeček (sputum) *(17, 22–24)*. Za to kužnino pa bo potrebno šele razviti optimalno metodo predpriprave. Nobeden od danes dosegljivih komercialnih testov namreč nima ustrezne evaluacije za uporabo te kužnine, ki je zaradi svoje konsistence in viskoznosti lahko zelo problematična za uporabo v avtomatiziranih sistemih. Za racionalno uporabo testiranja na respiratorne viruse je v zdravstvenih ustanovah smiselno pred sezono postaviti jasne smernice oz. algoritme za različne klinične skupine in pravila testiranja, saj lahko v nasprotnem primeru stroški močno presežejo potencialne koristi za bolnika *(9)*.

LITERATURA

1. Byington CL, Ampofo K, Stockmann C, et al. Community Surveillance of Respiratory Viruses Among Families in the Utah Better Identification of Germs-Longitudinal Viral Epidemiology (BIG-LoVE) Study. Clin Infect Dis. 2015; 61 (8): 1217-24.
2. Falsey AR. Current management of parainfluenza pneumonitis in immunocompromised patients: a review. Infect Drug Resist. 2012; 5: 121-7.
3. Biancardi E, Fennell M, Rawlinson W, et al. Viruses are frequently present as the infecting agent in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease in patients presenting to hospital. Intern Med J. 2016; 46 (10): 1160-5.
4. Meissner HC. Viral Bronchiolitis in Children. N Engl J Med. 2016; 374 (1): 62-72.
5. Self WH, Williams DJ, Zhu Y, et al. Respiratory Viral Detection in Children and Adults: Comparing Asymptomatic Controls and Patients With Community-Acquired Pneumonia. Journal of Infectious Diseases. 2016; 213 (4): 584-91.
6. Jartti T, Lee W-M, Pappas T, et al. Serial viral infections in infants with recurrent respiratory illnesses. Eur Respir J. 2008; 32 (2): 314-20.
7. Templeton KE. Why diagnose respiratory viral infection? J Clin Virol. 2007; 40: S2-4.
8. Rappo U, Schuetz AN, Jenkins SG, et al. Impact of Early Detection of Respiratory Viruses by Multiplex PCR Assay on Clinical Outcomes in Adult Patients. J Clin Microbiol. 2016; 54 (8): 2096-103.
9. Xu M, Qin X, Astion ML, et al. Implementation of FilmArray Respiratory Viral Panel in a Core Laboratory Improves Testing Turnaround Time and Patient Care. Am J Clin Pathol. 2012; 139 (1): 118-23.
10. Ip DKM, Lau LLH, Chan K-H, et al. The Dynamic Relationship Between Clinical Symptomatology and Viral Shedding in Naturally Acquired Seasonal and Pandemic Influenza Virus Infections. Clin Infect Dis. 2015; civ909-7.
11. Storch GA. Respiratory infections. In: Storch GA. Essentials of diagnostic virology. 1st ed. New York: Churchill Livingstone; 2000. p. 59-78.
12. Lambert SB, Whiley DM, O'Neill NT, et al. Comparing Nose-Throat Swabs and Nasopharyngeal Aspirates Collected From Children With Symptoms for Respiratory Virus Identification Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. Pediatrics. 2008; 122 (3): e615-20.
13. Walsh P, Overmyer CL, Pham K, et al. Comparison of Respiratory Virus Detection Rates for Infants and Toddlers by Use of Flocked Swabs, Saline Aspirates, and Saline Aspirates Mixed in Universal Transport Medium for Room Temperature Storage and Shipping. J Clin Microbiol. 2008; 46 (7): 2374-6.
14. Moore C, Corden S, Sinha J, et al. Dry cotton or flocked respiratory swabs as a simple collection technique for the molecular detection of respiratory viruses using real-time NASBA. J Virol Methods. 2008; 153 (2): 84-9.
15. Sloots TP, Whiley DM, Lambert SB, et al. Emerging respiratory agents: New viruses for old diseases? J Clin Virol. 2008; 42 (3): 233-43.
16. Berry M, Gamieldien J, Fielding BC. Identification of New Respiratory Viruses in the New Millennium. Viruses. 2015; 7 (3): 996-1019.
17. Branche AR, Walsh EE, Formica MA, et al. Detection of respiratory viruses in sputum from adults by use of automated multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2014; 52 (10): 3590-6.
18. Ginocchio CC, McAdam AJ. Current Best Practices for Respiratory Virus Testing. J Clin Microbiol. 2011; 49: S44-8.
19. Stupica D, Lusa L, Petrovec M, et al. Respiratory viruses in patients and employees in an intensive care unit. Infection. 2012; 40 (4): 381-8.
20. Gorišek Miksić N, Uršič T, Simonovič Z, et al. Oseltamivir prophylaxis in controlling influenza outbreak in nursing homes: a comparison between three different approaches. Infection. 2015; 43 (1): 73-81.
21. Binnicker MJ, Espy MJ, Irish CL, et al. Direct Detection of Influenza A and B Viruses in Less Than 20 Minutes Using a Commercially Available Rapid PCR Assay. J Clin Microbiol. 2015; 53 (7): 2353-4.
22. Falsey AR, Formica MA, Walsh EE. Yield of sputum for viral detection by reverse transcriptase PCR in adults hospitalized with respiratory illness. J Clin Microbiol. 2012; 50 (1): 21-4.

23. Huijskens EGW, Rossen JWA, Kluytmans JAJW, et al. Evaluation of yield of currently available diagnostics by sample type to optimize detection of respiratory pathogens in patients with a community-acquired pneumonia. Influenza Other Respir Viruses. 2014; 8 (2): 243–9.

24. Wolff BJ, Bramley AM, Thurman KA, et al. Improved Detection of Respiratory Pathogens Using High-Quality Sputum with TaqMan Array Card Technology. J Clin Microbiol. 2016; pii: JCM.01805-16

Rok Tomazin[1], Tadeja Matos[2]

Vlaknate glive in okužbe dihal

Filamentous Fungi and Respiratory Infections

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: aspergiloza, mukormikoza, fuzarioza, scedosporioza, mikrobiološka diagnostika

V sklopu povzročiteljev okužb dihal se v zadnjem času čedalje pogosteje omenjajo tudi različne vrste gliv. Najvidnejše mesto med glivnimi povzročitelji imajo številne plesni, ki prizadenejo predvsem imunsko oslabele bolnike. Najbolj ogrožena populacija so tako bolniki po presaditvi čvrstih organov ali krvotvornih matičnih celic, hemato-onkološki bolniki in bolniki s kroničnimi boleznimi pljuč ter bolniki z virusno povzročeno imunosupresijo. V teh skupinah bolnikov se lahko iz začetnih blagih oblik okužbe razvijejo agresivno potekajoče, invazivne, diseminirane mikoze, ki so povezane z visoko smrtnostjo. Diagnostika glivnih okužb dihal je zahtevna in poleg klinične slike upošteva analizo različnih informacij iz področij radiologije, histopatologije in klinične mikologije.

ABSTRACT

KEY WORDS: aspergillosis, mucormycosis, fusariosis, scedosporiosis, microbiological diagnostics

In recent times, fungal respiratory infections are gaining more attention than ever. Most prominent causative agents are found among numerous species of filamentous fungi that affect mostly the immunocompromised such as solid organ and haematopoietic stem cell transplant recipients, patients with hematologic malignancies or chronic lung diseases and patients with viral-induced immunosuppression. In these high-risk groups, fungal infections can progress from mild respiratory syndromes to invasive disseminated infections with high mortality rate. Diagnostics is not straightforward; it is rather a complex process where clinical information has to be considered jointly with radiological, histopathological and clinical mycology data.

[1] Asist. Rok Tomazin, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; rok.tomazin@mf.uni-lj.si

[2] Doc. dr. Tadeja Matos, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

UVOD

Patogene glive povzročajo širok spekter okužb dihal, ki obsega vse od blagih gripi podobnih okužb do težko potekajočih pljučnic z razširitvijo v druge organske sisteme. Večinoma gre za okužbe, ki se pojavljajo v specifičnih situacijah, predvsem v primeru okvare ali oslabelosti imunskega sistema. Tukaj imajo pomembno mesto oportunistično patogene vlaknate glive – plesni – ki prizadenejo predvsem spodnja dihala. Pomembnejši povzročitelji izhajajo iz rodov *Aspergillus, Fusarium* in *Scedosporium* ter reda *Mucorales*. Te okužbe so običajno agresivno potekajoče in zahtevne za zdravljenje. Posamezne glivne vrste so vpletene tudi v okužbe zgornjih dihal, kjer so najbolj prizadete obnosne votline. V tropskih predelih sveta so poleg klasičnih patogenov v etiologijo kroničnega sinuzitisa vpletene še vrste iz reda *Entomophtorales*. Poleg oportunistično patogenih gliv povzročajo okužbe spodnjih dihal še primarno patogene glive, ki prizadenejo tudi populacijo oseb z normalno delujočim imunskim sistemom. V teh primerih so kot povzročitelji opisani rodovi *Histoplasma, Coccidioides* in *Blastomyces*. Diagnostika glivnih okužb dihal temelji na klinični sliki, ocenah tveganja ter slikovni, histopatološki in mikrobiološki diagnostiki. Slednja v zadnjem času doživlja velik napredek predvsem na področju nekonvencionalnih metod, katerih osnova je dokazovanje glivnih antigenov, protiteles in nukleinskih kislin v kliničnih vzorcih.

ASPERGILOZA

Rod *Aspergillus* vključuje več kot 250 različnih vrst vlaknatih gliv, ki jih najdemo prosto v okolju, primarno na razpadajočem rastlinju *(1)*. So tako rekoč ubikvitarno prisotni in jih lahko osamimo iz vode, zraka, prsti, razpadajočega organskega materiala in prahu. Najpogosteje osamljene vrste so *A. fumigatus, A. flavus* in *A. niger*. Glavna pot okužbe je preko vdihavanja aerosoliziranih konidijev, ki v odsotnosti ustreznega imunskega odziva povzročijo širok spekter kliničnih manifestacij *(2)*.

Najpomembnejše dejavnike tveganja za okužbo prepoznamo v *(3)*:

- dolgotrajni nevtropeniji (manj kot 500 celic/µl, več kot 10 dni),
- presaditvi krvotvornih matičnih celic in čvrstih organov – predvsem pljuč,
- dolgotrajnem zdravljenju s kortikosteroidi (več kot trije tedni),
- hematoloških malignih obolenjih (predvsem levkemija),
- kemoterapiji,
- napredovanem aidsu in
- kronični granulomatozni bolezni.

Poleg naštetih dejavnikov v zadnjih letih pridobivajo na pomenu tudi manj očitni, kot so zdravljenje na oddelkih intenzivne nege in virusne okužbe dihal *(4)*. Kakšen tip okužbe se bo razvil, je odvisno predvsem od imunskega statusa vsakega posameznika in se lahko razlikuje od različnih tipov preobčutljivostnih reakcij do invazivne pljučne aspergiloze.

Alergijska bronhopulmonalna aspergiloza

Med pogostejšimi in bolj poznanimi alergijskimi reakcijami je alergijska bronhopulmonalna aspergiloza (ABPA), ki prizadene predvsem bolnike z bronhialno astmo in cistično fibrozo. Prizadetih je do 6 % astmatikov in do 15 % bolnikov s cistično fibrozo. ABPA je posledica razraščanja micelija po bronhialnem drevesu in kombinacije preobčutljivostnih reakcij tipa I in III. Za ABPA je značilno, da ne pride do invazije v pljučni parenhim *(5)*. Diagnostika ABPA temelji večinoma na klinični sliki in imunološki diagnostiki. Slednja daje večji pomen dokazovanju celokupnih ter specifičnih IgE in IgG v serumu, medtem ko kultivacija aspergilusov na mikoloških gojiščih nima

Tabela 1. Kriteriji za diagnostiko alergijske bronhopulmonalne aspergiloze pri bolnikih z bronhialno astmo *(6)*. ABPA – alergijska bronhopulmonalna astma.

Diagnostični kriteriji za ABPA pri bolnikih z bronhialno astmo
Radiološko dokazani infiltrati v prsnem košu.
Pozitiven kožni test za antigene *A. fumigatus*.
Celokupna koncentracija IgE v serumu ≥ 1000 IU/mL. Nekateri priporočajo tudi nižje postavljeno mejo, 416 IU/mL.
Dokazana prisotnost precipitirajočih IgG, specifičnih za *A. fumigatus*.
Povišana serumska koncentracija IgE, specifičnih za *A. fumigatus* – dvakrat višja kot v primeru astmatikov brez ABPA.
Periferna eozinofilija.
Povišana serumska koncentracija IgG, specifičnih za *A. fumigatus*.
Centralne bronhiektazije.

vidnejšega diagnostičnega pomena *(5, 6)*. Za postavitev diagnoze ABPA pri astmatikih morajo biti izpolnjeni kriteriji našteti v tabeli 1.

V primeru bolnikov s cistično fibrozo je potrditev ABPA zahtevnejša zaradi prekrivanja simptomatike osnovne bolezni z ABPA *(6)*. V primeru cistične fibroze je torej potrebno upoštevati kriterije, opisane v tabeli 2.

Zdravljenje ABPA poteka s kortikosteroidi, ki blažijo simptomatiko in protiglivnimi zdravili iz skupine triazolov, ki zmanjšajo breme aspergilusov *(6)*. Poleg ABPA se v sklopu preobčutljivostnih reakcij pojavljajo še aspergilusno sprožena astma, alergijski sinuzitis in preobčutljivostni pnevmonitis, ki so običajno posledica dolgotrajne izpostavljenosti aspergilusnim antigenom ali enkratni izpostavitvi večji količini konidijev *(5)*.

Aspergilom

Najpogostejša oblika aspergilusne okužbe dihal je aspergilom – skupek zgrajen iz prepleta hif, prizadetega tkiva in vnetnih celic. Aspergilomi se pojavljajo pri bolnikih s kavitarnimi boleznimi pljuč – najpogosteje v povezavi s tuberkulozo, lahko pa nastanejo tudi kot sekundarni zaplet

Tabela 2. Kriteriji za diagnostiko alergijske bronhopulmonalne aspergiloze pri bolnikih s cistično fibrozo *(6)*. ABPA – alergijska bronhopulmonalna astma.

Diagnostični kriteriji za ABPA pri bolnikih s cistično fibrozo
Subakutno ali akutno klinično poslabšanje bolezni v odsotnosti drugih mogočih vzrokov.
Celokupna koncentracija IgE > 500 IU/ml razen, če se bolnik zdravi s kortikosteroidi – testiranje ponovimo po končanem zdravljenju. Če se koncentracija IgE giba med 200 in 500 IU/mL, testiranje ponovimo po enem do treh mesecih.
Eno od naštetega: • Takojšnja kožna občutljivost na antigene *A. fumigatus*, v primeru, da se bolnik ne zdravi z antihistaminiki. • *In vitro* prisotnost serumskih IgE, specifičnih za *A. fumigatus*.
Eno od naštetega: • Dokaz prisotnosti precipitirajočih protiteles. • *In vitro* prisotnost serumskih IgG, specifičnih za *A. fumigastus*. • Prisotnost novih ali nedavnih radioloških nepravilnosti v prsnem košu, ki vztrajajo kljub fizioterapiji ali zdravljenju z antibiotiki.

ABPA *(7)*. Aspergilomi so ne-invazivna oblika pljučne aspergiloze, ki večinoma poteka subklinično. Najpogostejši možni klinični znaki so hemoptize, ki so pri večini bolnikov blage *(3, 7)*. Diagnostika se opira na klinično sliko ter radiološke preiskave in v manjši meri na medicinsko mikrobiologijo. Klasična kultivacija na mikoloških gojiščih je v približno polovici primerov negativna. Uporablja se dokazovanje specifičnih IgG v serumu, ki je pri bolnikih, ki se zdravijo s kortikosteroidi, lahko lažno negativno, ter galaktomananski test iz bronhoalveolarnih izpirkov, ki ima za zdaj še nejasen diagnostičen pomen *(5, 7)*. Približno ena desetina vseh aspergilomov spontano izzveni in specifično zdravljenje tako ni potrebno. Za zdravljenje se odločijo predvsem pri simptomatskih bolnikih s (hudimi) hemoptizami. Sestavljeno je iz protiglivnih zdravil, predvsem itrakonazola ali amfotericina B, in v določenih primerih kirurške odstranitve aspergiloma *(3)*. Upoštevati je treba, da je sistemsko zdravljenje z antimikotiki težavno, saj le-ti težko prehajajo na mesto okužbe *(8)*.

Aspergiloze pri bolnikih z oslabelim imunskim sistemom

Pri bolnikih z oslabelim imunskim sistemom se pojavljata v osnovi dve obliki aspergiloze – kronična nekrotizirajoča aspergiloza v primeru blage imunosupresije in invazivna pljučna aspergiloza, ki se razvije v obdobju hude imunosupresije *(3)*.

Kronična nekrotizirajoča aspergiloza

Kronična nekrotizirajoča aspergiloza (KNA), znana tudi pod imeni semi-invazivna ali subakutna invazivna pljučna aspergiloza, je aspergilusna okužba, ki se pojavi pri bolnikih s kronično obstruktivno pljučno boleznijo, z aktivno mikobakterijsko okužbo, sarkoidozo, pnevmokoniozo, cistično fibrozo in pri bolnikih z blago obliko imunosupresije, kot so sladkorni bolniki in alkoholiki. Povezana je s precej visoko smrtnostjo, ki dosega tudi 67 %. Za KNA je značilno počasno napredovanje tekom več tednov ali mesecev. Okužba običajno poteka simptomatsko in se diagnosticira na podlagi klinične slike, radioloških, histopatoloških in mikrobioloških preiskav. Med slednjimi imajo pomembno mesto povišani aspergilusni precipitini, katerih koncentracija je odvisna od faze oz. aktivnosti bolezni *(8)*. Galaktomananski test ima v primerjavi s precipitini manjšo občutljivost. Dokazovanje celokupnih in za aspergilus specifičnih IgE za zdaj še nima jasne vloge v diagnostiki KNA. Pomembno vlogo ima kultivacija bronhoskopsko in biopsijsko odvzetih vzorcev na mikoloških gojiščih – v kombinaciji s histopatološkimi preiskavami se doseže visoka občutljivost in specifičnost *(3, 8)*. Aktivno zdravljenje poteka predvsem v primerih težko potekajoče oblike KNA in je sestavljeno iz protiglivnega zdravljenja z antimikotiki iz skupine triazolov ali amfotericina B ter kirurških posegov *(8)*.

Invazivna pljučna aspergiloza

Najbolj znana in najbolj agresivno potekajoča aspergilusna okužba je invazivna pljučna aspergiloza (IPA). Klasični dejavnik tveganja je dolgotrajna in huda nevtropenija v kombinaciji s trombocitopenijo *(9)*. V tem primeru smrtnost presega 50 % *(3)*. Druga pomembna ogrožena skupina bolnikov so osebe po presaditvi pljuč ali krvotvornih matičnih celic, kjer se smrtnost približa 90 % *(3, 9)*. Opisani so tudi redki primeri, ko se je IPA razvila pri sicer zdravih osebah po izpostavljenosti visoki koncentraciji konidijev. V tem primeru gre za intersticijsko pljučnico, ki sprva spominja na ekstrinzični alergijski alveolitis – zdravljenje je posledično napačno (kortikosteroidi) in vodi v klinično poslabšanje. IPA lahko povzročajo številne vrste iz rodu *Aspergillus*, najpogosteje je povezana

z *A. fumigatus*. Značilnost *Aspergillus* spp. je angioinvazija, ki je skupaj z drugimi virulentnimi dejavniki razlog za trombozo, lokalne infarkte in nekrozo prizadetega tkiva. V nasprotju s KNA IPA ni omejena le na pljuča, ampak se lahko hematogeno razširi in prizadene različne organe, kot so možgani, oči ali koža *(9)*. Diagnostika IPA je zahtevna in upošteva klinično sliko, slikovno diagnostiko – predvsem CT ter rezultate histopatoloških in mikrobioloških preiskav. V sklopu slednjih se priporoča analiza bronhoskopsko odvzetih kužnin, ki so ob pravilnem odvzemu in transportu nekontaminirane z aspergilusi iz okolja *(3, 9)*. Za vzorce, ki niso aseptično odvzeti ali niso vnaprej primarno sterilni, vedno obstaja nevarnost kontaminacije z aspergilusi iz neposrednega okolja. Temelj mikrobiološke diagnostike je kultivacija kužnin na mikoloških gojiščih ter spremljanje galaktomanana v serumu ali bronhoalveolarnih izpirkih. Od leta 2008 naprej sta definirani dve skupini IPA: potrjena in verjetna invazivna aspergiloza. V tretjo skupino – možna invazivna mikoza – bolnike uvrstimo, kadar nimamo nikakršnega mikološkega dokaza, da gre za okužbo z vrstami iz rodu *Aspergillus*; posledično ne moremo govoriti o aspergilozi. Diagnostika potrjene IPA temelji na dokazovanju prisotnosti *Aspergillus* spp. v aseptično odvzetem kliničnem materialu s kultivacijo na mikoloških gojiščih ter histopatološkim dokazom invazije aspergilusov v prizadetem tkivu. V poštev pridejo bronhoskopsko in biopsijsko odvzeti vzorci spodnjih dihal. Pri marsikaterem bolniku s sumom na IPA taka diagnostika žal ni mogoča – bolniki, pri katerih ni mogoče histopatološko dokazati IPA, postanejo kandidati za verjetno IPA *(10)*.

V teh situacijah je potrebno upoštevati *(10)*:

- Dejavnike bolnika:
  - Dolgotrajna nevtropenija (< 500 nevtrofilcev/µl več kot 10 dni).
  - Dolgotrajno zdravljenje s kortikosteroidi (več kot trije tedni) – bolniki z ABPA so izključeni.
  - Zdravljenje z imunosupresivnimi zdravili, ki delujejo na limfocite T (npr. ciklosporin, monoklonska protitelesa, nukleozidni analogi, blokatorji TNFα, ...) v zadnjih 90 dneh.
- Klinične kriterije (prisotnost ene od teh treh radioloških sprememb):
  - kavitacije,
  - znak polmeseca (angl. *air-crescent sign*) in
  - zgostitve z ali brez halo znaka.
- Mikološke kriterije:
  - Neposredni dokaz aspergilusov:
    - Prisotnost dihotomno razvejanih, septiranih hif v mikroskopskih preparatih.
    - Prisotnost aspergilusov v primarno sterilnih kužninah, dokazana s kultivacijo na mikoloških gojiščih.
  - Posredni dokaz aspergilusov:
    - Pozitiven galaktomananski test (serum, bronhoalveolarni izpirek).
    - Prisotnost aspergilusne DNA v primarno sterilnih kužninah (običajno bronhoalveolarni izpirek).

Med mikološke diagnostične kriterije so se v zadnjih letih uvrstile številne nekonvencionalne metode, tudi iz področja molekularno-biološke diagnostike, ki v primeru IPA temelji na verižni reakciji s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) v realnem času. Med vsemi invazivnimi mikozami je prav molekularna diagnostika IPA najbolj preučena in najbližje standardizaciji. Glede na rezultate številnih meta-analiz je učinkovitost PCR povsem primerljiva z antigenskimi testi, vendar se žal v njih ne upošteva formata PCR, kar onemogoča standardizacijo in vključitev molekularne diagnostike v smernice *(11)*. Specifičnost PCR za *Aspergillus* spp. se giba med 64 in 100 %, občutljivost med 43 in 100 % *(12)*. Razlogov za

tako velik razpon je več, med njimi zagotovo format PCR, uporaba različnih začetnih oligonukleotidov in tarčnih mest, izbor testirane kužnine in metoda osamitve DNA *(12, 13)*. Kot uporabno diagnostično orodje precej obeta kombinacija galaktomananskega testa in PCR iz bronhoalveolarnega izpirka, ki močno poveča občutljivost (100 %) in ima visoko negativno napovedno vrednost (85–90 %) *(14, 15)*. Poleg bronhoskopsko odvzetih kužnin se najpogosteje opisuje PCR za dokazovanje aspergilusne DNA v vzorcih krvi. V primeru invazivne aspergiloze pogostost skoraj nikoli ne preseže 15 %, zato je bolj smiselno PCR iz plazme uporabljati kot presejalni test za izključevanje okužbe in s tem preprečevanje nepotrebnega protiglivnega zdravljenja *(16)*. PCR za *Aspergillus* spp. je dober kandidat za presejalni test tudi iz razloga, ker je povezan z visoko negativno napovedno vrednostjo, ki presega 95 % *(17)*. PCR za *Aspergillus* spp. iz plazme naj bi se uporabljalo v kontekstu ostale diagnostike v kombinaciji z galaktomananskim testom za izključevanje okužbe *(12–14)*. Kot pozitiven rezultat se štejeta dva zaporedna pozitivna testa *(12)*. PCR za *Aspergillus* spp. iz seruma/plazme se lahko uporablja tudi za spremljanje učinkovitosti protiglivnega zdravljenja: vztrajanje pozitivnosti po 14 do 20 dneh zdravljenja je povezano s slabo prognozo in 90-dnevno smrtnostjo *(17)*. Poleg diagnostike naj bi PCR omogočal lažjo in hitrejšo detekcijo glivnih izolatov, ki so odporni proti določenim protiglivnim zdravilom *(11)*.

Za zdravljenje IPA se v prvi vrsti priporoča uporaba vorikonazola ali amfotericina B ter v določenih situacijah zdravila iz skupine ehinokandinov *(9)*. V zadnjem času se med zdravila izbora šteje še novi predstavnik triazolov, izavukonazol, ki je v učinkovitosti primerljiv z vorikonazolom. Prednost izavukonazola pred vorikonazolom je predvsem v manjšem številu interakcij z drugimi zdravili ter širši spekter protiglivnega delovanja *(18)*. Čedalje pomembnejše postaja testiranje občutljivosti za protiglivna zdravila in pravilna identifikacija do nivoja vrste. Za *Aspergillus* spp. je značilna tako naravna odpornost, ki je vrstno specifična, kot sekundarno pridobljena odpornost. V prvem primeru je nadvse pomembna pravilna identifikacija plesni, ki včasih presega zmožnosti klasične identifikacije, ki temelji na morfoloških značilnostih. V zadnjem času ima tako velik pomen odkrivanje kriptičnih vrst, ki so naravno odporne proti različnim skupinam protiglivnih zdravil; med najbolj znanimi so vrste iz kompleksa *A. fumigatus* kot na primer *A. fischeri*, *A. lentulus* in *A. fumigatiaffinis*. Vsi trije omenjeni so naravno odporni proti vorikonazolu, zadnja dva pa še proti amfotericinu B *(19)*. Ob naravni se pojavlja tudi pridobljena odpornost proti triazolom, povezana z mutacijami gena *Cyp51A*, ki kodira lanosterol-14α-demetilazo, tarčo triazolov. Ločimo dva načina pridobivanja odpornosti: v prvem primeru gre za dolgotrajno zdravljenje s triazoli, v drugem za okužbo z že odpornim sevom iz okolja. Vzrok pojavnosti odpornih sevov prosto v okolju je povezan z uporabo triazolnih fungicidov v kmetijstvu, ki so strukturno in funkcionalno zelo sorodni triazolom, ki se uporabljajo v humani medicini. Iz okolja in bolnikov pridobljeni odporni sevi imajo značilne tandemske ponovitve v promotorju tarčnega gena in točkovne mutacije: TR_{34}/L98H ali TR_{46}/Y121F/T289A *(20)*.

MUKORMIKOZA

Mukormikoze so agresivno potekajoče glivne okužbe povezane z visoko smrtnostjo, ki jih povzročajo plesni iz reda *Mucorales*. Žargonsko se tem organizmom še vedno pravi zigomicete (in okužbam zigomikoze) na račun dolgotrajnega uvrščanja v deblo *Zygomycota* katerega obstoj

so izbrisale raziskave na področju molekularne filogenije. Zigomicete so ubikvitarno prisotne, termotolerantne plesni z značilnim cenocitičnim micelijem, ki se razmnožujejo nespolno s sporangiosporami, ki se sproščajo v neposredno okolje organizma *(21)*. Načeloma zigomicete izkazujejo nizko stopnjo virulence, zato se okužbe pojavljajo le pri imunsko oslabeli populaciji. Glavni virulentni dejavniki oz. lastnosti zigomicet so angio- in perinevralna invazija *(22)*. V okužbe so najpogosteje vpletene vrste iz rodov *Rhizopus, Mucor, Rhizomucor, Saksenaea* in vrste iz kompleksov *Cunninghamella bertholletiae* in *Lichtheimia corymbifera (21–24)*. Pomembni dejavniki tveganja za okužbo so hematološka maligna obolenja, presaditev krvotvornih matičnih celic in čvrstih organov, granulocitopenija, sladkorna bolezen in dializa s kelatorji železa, predvsem z deferoksaminom *(21, 24)*. Glavna pot okužbe je vdihavanje aerosoliziranih sporangiospor. Osnovni obliki mukormikoze, ki vključujeta dihala, sta pljučna mukormikoza, ki se razvije predvsem pri hematoloških bolnikih, in rino-orbito-cerebralna mukormikoza, ki prizadene večinoma bolnike z nenadzorovano sladkorno boleznijo *(24)*.

Pljučna mukormikoza

Pljučna mukormikoza (PM) prizadene večinoma hudo imunsko oslabele bolnike, kot so rakavi bolniki z nevtropenijo na indukcijski kemoterapiji in bolniki po presaditvi krvotvornih matičnih celic z reakcijo presadka proti gostitelju. PM je povezana z visoko smrtnostjo, ki doseže tudi 76 % *(23)*. Zigomicete z angioinvazijo povzročajo trombozo, infarkte in nekrozo okuženega tkiva. Okužba se iz pljuč lahko hematogeno razširi v druge organe – govorimo o diseminirani mukormikozi – in je povezana s še višjo smrtnostjo, do 96 % *(22–24)*.

Diagnostika PM je težavna, saj okužba ni povezana z značilno simptomatiko in spominja na druge invazivne mikoze, predvsem IPA *(23, 24)*. Slikovna diagnostika, predvsem CT, v začetnih fazah okužbe deloma omogoča razlikovanje med IPA in PM: za slednjo so značilni multipli pljučni infiltrati (> 10), plevralni izliv in zgostitve z reverznim halo znakom *(23)*. Mikrobiološka diagnostika še vedno temelji na kultivaciji bronhoskopsko in biopsijsko odvzetih kužnin spodnjih dihal na mikoloških gojiščih. Ob tem je potrebno poudariti, da so nežne strukture zigomicetnih hif občutljive za mehanski stres, in se zato agresivna homogenizacija vzorcev prizadetega tkiva odsvetuje. Sporangiospore so ubikvitarno prisotne, zato so zigomicete znani kontaminanti gojišč – za dokazovanje okužbe/invazije se posledično priporoča še histopatološki pregled kliničnih vzorcev. Dokazovanje ß-D-glukana v serumu je smiselno samo kot orodje, ki do neke mere razlikuje med PM in IPA oz. drugimi glivnimi okužbami – v primeru PM je ß-D-glukanski test načeloma negativen *(25)*. Molekularna diagnostika temelji na PCR v realnem času, vendar se za zdaj vrši le na eksperimentalnem nivoju.

Zdravljenje PM je težavno in vključuje protiglivno zdravljenje ter zmanjšanje vpliva dejavnikov tveganja. Kadar bolnik ni trombocitopeničen, se lahko prizadeto tkivo tudi kirurško odstrani *(25)*. Klasična zdravila izbora so predvsem amfotericin B in posakonazol. V novejšem času pride v poštev še izavukonazol, ki omogoča učinkovito zdravljenje v primeru nejasnosti, ali gre za PM ali IPA, saj učinkuje tako proti *Mucorales* kot proti *Aspergillus* spp. *(18)*.

Rino-orbito-cerebralna mukormikoza

Rino-orbito-cerebralna mukormikoza (ROCM) prizadene hematološke bolnike, bolnike po presaditvi krvotvornih matičnih celic ali čvrstih organov in v prvi

vrsti bolnike s slabo nadzorovano sladkorno boleznijo ali drugimi oblikami metabolne acidoze *(23)*. Okužba se začne v nosni votlini in se preko ožilja in živčnih celic širi v orbito, obnosne votline in nazadnje v možgane ter lobanjske kosti. ROCM v začetnih fazah spominja na sinuzitis in periorbitalni celulitis, v poznih fazah pride do uničenja trdega neba in lobanjskih kosti *(19, 21, 23, 25)*. Diagnostika se opira na klinično sliko in radiološke preiskave. Klinično so značilne črne nekrotične lezije in otekanje obraza *(23)*. Za ugotavljanje intraduralne in intrakranialne vpletenosti ter perinevralne invazije se priporoča (kontrastni) MRI *(23, 25)*. Za mikrobiološke preiskave so ustrezni le endoskopsko odvzeti vzorci oz. biopti. Poleg kultivacije se tako kot v primeru PM priporoča še histopatološka analiza za dokaz invazivne okužbe *(25)*. Zdravljenje je podobno kot v primeru PM in temelji na amfotericinu B, posakonazolu ali izavukonazolu ter obsežni kirurški odstranitvi prizadetega tkiva *(18, 25)*.

ENTOMOFTORAMIKOZA

Entomoftoramikoze so kronično potekajoče glivne okužbe, ki prizadenejo tudi imunokompetentno populacijo bolnikov in so za zdaj relativno slabo raziskane. Povzročitelje uvrščamo v red *Entomophtorales*, ki je nekdaj spadal v deblo *Zygomycota*. Entomoftoramicete večinoma povzročajo okužbe žuželk toda plesni iz dveh rodov – *Conidiobolus* in *Basidiobolus* – imajo pomen tudi v humani medicini, kjer so znane kot povzročitelji kronično potekajočih okužb podkožja (*Basidiobolus*) in nosno-obraznega predela (*Conidiobolus*) *(26)*.

Okužbe, ki jih povzročata plesni *Conidiobolus coronatus* and *Conidiobolus incongruus*, imenovane konidiobolomikoze, najdemo v tropskih in subtropskih regijah, predvsem v ekvatorialni Afriki, Srednji Ameriki in Indiji. Večina primerov izhaja iz Nigerije, kjer je najbolj prizadeta populacija mladih moških. Okužba se začne z vdihavanjem spor in kasnejšim širjenjem v obnosne votline in okoliška mehka tkiva; možgani in lobanjske kosti niso prizadeti kot pri ROCM, saj *Conidiobolus* spp. nima angioinvazivnih lastnosti. Konidiobolomikoza je tako omejena okužba, ki ne pritegne pozornosti dokler se ne pojavi intenzivno otekanje ustnic ali drugih delov obraza. V redkih primerih se pri imunsko oslabelih bolnikih okužba hematogeno razširi v druge organske sisteme in je povezana z visoko smrtnostjo. Diagnostika se zanaša na klinično sliko ter histopatološke in mikrobiološke preiskave biopsijsko odvzetih vzorcev prizadetega tkiva. Za uspešno kultivacijo *Conidiobolus* spp. je potrebno paziti, da se kužnina ne homogenizira preagresivno in da se ne shladi pod 4 °C, saj pri tej temperaturi entomoftoramicete ne preživijo. Za zdravljenje, ki poteka več mesecev, se uporablja kalijev jodid in itrakonazol *(26)*.

FUZARIOZA

Fuzarioza je druga najpogostejša okužba (takoj za aspergilozo) pri ljudeh, povzročena s strani plesni. Povzročitelji izhajajo iz rodu *Fusarium*, ki vključuje številne saprofitne in fitopatogene vrste, najdemo pa tudi približno 70 vrst, ki povzročajo okužbe pri ljudeh – približno 60 % okužb pripisujemo vrstam kompleksa *Fusarium solani*, okrog 20 % pa vrstam kompleksa *Fusarium oxysporum* *(27)*. Fuzariji so znani povzročitelji površinskih okužb, kot je na primer onihomikoza ali keratitis, ter invazivnih okužb, ki so povezane s 60–100 % smrtnostjo *(27, 28)*. Glavni dejavnik tveganja za invazivno obliko okužbe je dolgotrajna in huda nevtropenija, predvsem pri bolnikih s hematološkimi malignimi obolenji in pri bolnikih po presaditvi krvotvornih matičnih celic *(27)*.

Pljučna fuzarioza (PF) predstavlja 50–80 % invazivnih fuzarioz in je bodi-

si posledica vdihavanja aerosoliziranih mikrokonidijev bodisi hematogene razširitve iz nekega drugega izvornega mesta. Pomemben virulentni dejavnik *Fusarium* spp. je angioinvazija, ki je v kombinaciji z ostalimi virulentrnimi dejavniki odgovorna za trombozo, lokalne infarkte in nekrozo prizadetega tkiva ter hematogeno razširjanje. Dejavniki tveganja in klinična slika PF so precej podobni IPA, tako da diagnostika temelji na radioloških preiskavah in histopatološki ter mikrobiološki analizi bronhoskopsko in biopsijsko odvzetih kliničnih vzorcev *(27, 28)*. V primeru hematogene razširitve se na koži pojavijo lezije z nekrotičnim središčem, ki so v določenih situacijah značilne za diseminirano fuzariozo. CT prsnega koša naj bi razkril pljučne infiltrate z zgostitvami brez haloja; verjetnost za fuzariozo je večja, če so radiološko vpleteni še maksilarni in etmoidni sinusi *(28)*. Histopatološki preparati ne omogočajo zanesljivega razlikovanja med PF in IPA, saj sta si plesni morfološko v prizadetem tkivu zelo podobni – dihotomno razvejane, septirane hife. Pomembna značilnost PF in diseminirane fuzarioze je fungemija, ki jo s hemokulturnimi sistemi zaznamo v približno polovici primerov *(27, 28)*. Posledično imata kultivacija ustreznih kužnin in odvzemi hemokultur velik pomen v diagnostiki PF. Identifikacija fuzarijev do nivoja vrste je težavna zaradi izjemne podobnosti in neznačilne variabilnosti makro- in mikromorfologije ter kompleksne in konstantno spreminjajoče se taksonomije *(27, 29)*.

Zdravljenje PF je težavno s srednje dobrim odzivom na amfotericin B, vorikonazol in posakonazol. Plesni *Fusarium* spp. so *in vitro* naravno odporne proti številnim protimikrobnim zdravilom in najnižje minimalne inhibitorne koncentracije dobimo v primeru amfotericina B *(27)*.

SCEDOSPORIOZA

Scedosporiozo povzročajo vrste, ki jih uvrščamo v skupino *Scedosporium apiospermum/Pseudallescheria boydii*. Ta vključuje več različnih rodov plesni, ki jih najdemo v vodi in prsti, večinoma na onesnaženih področjih. Glavni dejavniki tveganja za razvoj invazivne scedosporioze so presaditev čvrstih organov – predvsem pljuč – in krvotvornih matičnih celic, hematološka maligna obolenja, kavitacijske bolezni pljuč ter sindrom skorajšnje utopitve *(30)*. Pri slednjem gre za aspiracijo plesni v spodnja dihala in obnosne votline, iz česar se lahko razvije pljučna ali možganska scedosporioza *(30, 31)*.

Vrste iz kompleksa *S. apiospermum/P. boydii* lahko prehodno ali kronično kolonizirajo dihalni epitelij, kar je značilno za bolnike s cistično fibrozo *(30–32)*. Čeprav je v tej populaciji bolnikov delež koloniziranih visok – do 10 % –, so invazivne okužbe izjemno redke, vendar so povezane s 100 % smrtnostjo. Posledično je pri bolnikih s cistično fibrozo kolonizacija z vrstami *S. apiospermum/P. boydii* kontraindikacija za presaditev pljuč *(32)*.

Pljučna scedosporioza (PS) se pojavi predvsem pri bolnikih po presaditvi pljuč in po skorajšnji utopitvi. Klinično se kaže kot pljučnica ali mediastininis; v primeru predhodnih kavitacij se lahko razvije ne-invazivna oblika scedosporioze, psevdalešeriom – skupki micelija in vnetnih celic – ki si deli številne klinične lastnosti z aspergilomom *(30, 31, 33)*. V tem primeru je smrtnost približno 27 % *(33)*.

PS se lahko iz pljuč hematogeno razširi ter prizadene še druge organe in tako povzroči nastanek diseminirane invazivne scedosporioze, ki je povezana s smrtnostjo, ki se giba okrog 57 % *(33)*. Za diseminirano scedosporiozo je tako kot za fuzariozo značilna prava fungemija, zato se priporoča odvzem hemokultur *(30)*.

Diagnostika temelji na klinični sliki, slikovni diagnostiki ter histopatološki in mikrobiološki analizi bronhoskopsko ali biopsijsko odvzetih kužnin *(30–34)*. Zaradi velike morfološke podobnosti *Fusarium* spp. z *Aspergillus* spp. histopatološke metode ne ločijo med posameznimi rodovi in se uporabljajo predvsem za dokazovanje oz. potrjevanje invazivne okužbe. Klasične kultivacijske metode se priporočajo samo v primeru primarno sterilnih kliničnih vzorcev, ker je v nasprotnem primeru praktično nemogoče ločiti med kolonizacijo, okužbo in okoljsko kontaminacijo. Zanesljiva identifikacija vrst znotraj kompleksa *S. apiospermum/P. boydii* se zanaša na sekvenciranje vmesnega distančnika ribosomskega operona, medtem ko se sam kompleks in njemu sorodne rodove identificira na podlagi makro- in mikromorfoloških značilnosti *(31, 34)*.

Vrste kompleksa *S. apiospermum/P. boydii* so naravno odporne proti amfotericinu B in flucitozinu, kar onemogoča zdravljenje PS s tema zdraviloma. Protiglivno aktivnost izkazujejo vorikonazol in posakonazol iz skupine azolov ter mikafungin iz skupine ehinokandinov *(34)*. Izbor zdravila je torej odvisen od rezultatov testiranja občutljivosti, čeprav je običajno vorikonazol prva izbira *(33, 34)*.

ENDEMSKE MIKOZE

Endemske mikoze so v klasičnem smislu okužbe omejene na specifična geografska območja in jih povzročajo glive, za katere je značilen temperaturni dimorfizem. Povzročitelji so primarno patogene glive iz rodov *Histoplasma, Coccidioides, Blastomyces, Emmonsia, Paraccoidioides* in vrsta *Penicillium marneffei*. Med naštetimi so prvi štirje rodovi še najbolj povezani z okužbami dihal. Za vse je značilen dimorfizem, ki je tudi pomemben virulentni dejavnik – vse naštete glive se v okolju nahajajo v saprofitski micelijski obliki, v človeškem organizmu pa v parazitski kvasni obliki. Okužbe se pojavljajo tudi pri sicer zdravih osebah, hujše oblike invazivnih mikoz pa povzročajo pri imunsko oslabelih bolnikih. V zadnjem času se pojavlja vedno več prispevkov, ki opisujejo pojavljanja tako samih gliv kot okužb izven tradicionalnih endemskih področij, tudi v Evropi *(35)*.

Histoplazmoza, blastomikoza, kokcidioidomikoza in emonsioza so povezane s spodnjimi dihali tako pri imunokompetentnih kot pri imunsko oslabelih bolnikih. V osnovi je potek okužbe pri vseh omenjenih boleznih podoben in se pri imunokompetentnih bolnikih na začetku razvije bodisi v blago, gripi podobno obolenje dihal bodisi poteka subklinično. V primeru imunosupresije začetna okužba napreduje v pljučnico, pri histoplazmozi še v mediastinitis ali mediastinalne granulome. Najbolj virulentni so prav *Coccidioides* spp., ki so na endemskih območjih odgovorni za približno 30 % vseh doma pridobljenih pljučnic. Razlike se pojavijo predvsem, ko pride do hematogene razširitve in so glede na etiologijo prizadeti različni organski sistemi. Dejavniki tveganja za invazivne, diseminirane okužbe so podobni kot pri večini oportunističnih invazivnih mikoz in vključujejo okužbo s HIV, presaditev čvrstih organov ali krvotvornih matičnih celic ter zdravljenje z inhibitorji TNF-α ali drugimi biološkimi zdravili *(35)*.

Endemske mikoze običajno povezujemo predvsem z Ameriko, tako Severno, Srednjo kot Južno, in Afriko. Histoplazmoza se tradicionalno omejuje na področja dolin rek Mississippi, Ohio in St. Lawrence v vzhodnem delu ZDA; blastomikozo povezujemo z jugovzhodnim delom ZDA; kokcidioidomikozo srečujemo predvsem na zahodnem delu ZDA, v Srednji Ameriki in nekaterih predelih Južne Amerike; endemska področja emonsioze pa povezujemo predvsem z Južno Afriko

Tabela 3. Pregled osnovnih značilnosti endemskih mikoz, ki v prvi vrsti prizadenejo spodnja dihala.

Endemske mikoze spodnjih dihal	Okužbe dihal	Povzročitelji	Geografska porazdelitev
Histoplazmoza	blaga gripi podobna obolenja, pljučnica, mediastinitis, mediastinalni granulomi	*Histoplasma capsulatum*	endemska v dolinah rek Ohio, Mississippi in Missouri, sicer globalno razširjena
Blastomikoza	blaga gripi podobna obolenja, pljučnica	*Blastomyces dermatitidis*	doline rek Mississippi, Ohio in St. Lawrence, jugovzhodne ZDA
Kokcidioidomikoza	blaga gripi podobna obolenja, pljučnica	*Coccidioides immitis, Coccidioides posadasii*	Srednja in Južna Amerika, sušna področja jugozahodnih ZDA
Emonsioza	pljučnica, adiaspiromikoza	*Emmonsia pasteuriana, Emmonsia parva, Emmonsia crescens*	Južna Afrika, Kitajska, Evropa?

(35). V tabeli 3 je krajši povzetek o endemskih mikozah spodnjih dihal.

Diagnostika endemskih mikoz temelji na klinični sliki ter histopatoloških preiskavah in klasični kultivaciji na mikoloških gojiščih ob upoštevanju pravil dela v laboratorijih tretje biovarnostne stopnje. Med nekonvencionalnimi metodami se dobro obnesejo različni antigenski testi, ki dokazujejo prisotnost bolj ali manj specifičnih eksopolisaharidov dimorfnih gliv v serumu ali seču. Občutljivost in specifičnost antigenskih testov je močno odvisna od oblike okužbe in testirane populacije. Glede na obliko okužbe so rezultati zanesljivejši, če gre za diseminirano okužbo kot na primer pri histoplazmozi, kjer občutljivost doseže tudi 100 %. Glede na testirano populacijo pa govorimo o uporabi antigenskih testov v imunokompetentni populaciji in imunsko oslabeli populaciji bolnikov; v primeru kokcidioidomikoze se ti testi za postavitev diagnoze pri imunokompetentnih osebah odsvetujejo. Molekularne diagnostične metode se opirajo na PCR v realnem času, večinoma iz seruma in bioptov prizadetega tkiva, vendar še zdaleč niso blizu standardizacije in se uporabljajo samo v eksperimentalne namene *(35)*.

Zdravljenje endemskih respiratornih mikoz je zahtevno in dolgotrajno. Večinoma temelji na itrakonazolu za blage do zmerno težke oblike okužb in na amfotericinu B za agresivno potekajoče diseminirane okužbe. Pogosta je tudi uporaba obeh zdravil – začetno zdravljenje z amfotericinom B, ki mu sledi večmesečno zdravljenje z itrakonazolom *(35)*.

PREGLED MOŽNOSTI ZDRAVLJENJA GLIVNIH OKUŽB DIHAL

V tabeli 4 je prikazan povzetek možnosti zdravljenja prej opisanih glivnih okužb dihal in obsega vse od zdravljenja s protivnetnimi ali protiglivnimi zdravili, kirurške odstranitve prizadetega tkiva do kombinacije vseh treh pristopov.

Tabela 4. Pregled možnosti zdravljenja okužb dihal, ki jih povzročajo vlaknate glive.

Mikoza	Možnosti zdravljenja
Alergijska bronhopulmonalna aspergiloza	kortikosteroidi, rekombinantna monoklonska protitelesa, vorikonazol, itrakonazol
Aspergilom	itrakonazol, amfotericin B, kirurška odstranitev
Kronična nekrotizirajoča aspergiloza	vorikonazol, itrakonazol, amfotericin B, kirurška odstranitev prizadetega tkiva
Invazivna pljučna aspergiloza	vorikonazol, izavukonazol, amfotericin B, ehinokandini
Pljučna in rino-orbito-cerebralna mukormikoza,	amfotericin B, posakonazol, izavukonazol, kirurška odstranitev prizadetega tkiva
Konidiobolomikoza	kalijev jodid, itrakonazol
Pljučna fuzarioza	vorikonazol, amfotericin B, posakonazol
Scedosporioza	vorikonazol, mikafungin
Endemske mikoze spodnjih dihal	itrakonazol, amfotericin B

ZAKLJUČEK

Plesni povzročajo širok spekter okužb, ki se običajno začnejo v dihalih, kjer lahko vztrajajo ali pa se hematogeno razširijo v druge organske sisteme. V Evropi najdemo najpomembnejše in najpogostejše povzročitelje v rodovih *Aspergillus, Fusarium, Scedosporium* in redu *Mucorales*. Prizadenejo predvsem bolnike z okrnjeno celično posredovano imunostjo, pri katerih se lahko razvijejo življenjsko ogrožajoče okužbe. Diagnostika je zelo kompleksna in zahteva tesno sodelovanje klinikov in mikrobiologov. Poleg klasičnih metod diagnostične mikologije se v zadnjem času razvijajo tudi metode, ki temeljijo na imunoencimskih testih in PCR v realnem času. Le-te omogočajo hitrejšo, visoko specifično in visoko občutljivo diagnostiko, ki pa žal še vedno ni na vseh področjih dovolj preučena in standardizirana za umestitev v smernice. Z napredkom v biomedicinski znanosti se bo zagotovo odpravila tudi ta pomanjkljivost.

LITERATURA

1. Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, et al. The current status of species recognition and identification in Aspergillus. Stud Mycol. 2007; 59: 1–10.
2. Latgé JP. The pathobiology of Aspergillus fumigatus. Trends Microbiol. 2001; 9 (8): 382–9.
3. Kousha M, Tadi R, Soubani OA. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. Eur Respir Rev. 2011; 20 (121): 156–74.
4. Baddley JW. Clinical risk factors for invasive aspergillosis. Med Mycol. 2011; 49 Supp 1: S7–12.
5. Shah A, Panjabi P. Allergic aspergillosis of the respiratory tract. Eur Respir Rev. 2014; 23 (131): 8–29.
6. Knutsen AP, Slavin RG. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in asthma and cystic fibrosis. Clin Dev Immunol. 2011; 2011: 843763.
7. Lee JK, Lee YL, Park SS et al. Clinical course and prognostic factors of pulmonary aspergilloma. Respirology. 2014; 19 (7): 1066–72.

8. Schweer KE, Bangard C, Hekmat K, et al. Chronic pulmonary aspergillosis. Mycoses. 2014; 57 (5): 257–70.
9. Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. Thorax. 2015; 70 (3): 270–7.
10. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis. 2008; 46 (12): 1813–21.
11. Alanio A, Bretagne S. Difficulties with molecular diagnostic tests for mould and yeast infections: where do we stand? Clin Microbiol Infect. 2014; 20 Suppl 6: 36–41.
12. Arvanitis M, Ziakas PD, Zacharioudakis IM, et al. PCR in the diagnosis of invasive aspergillosis: a meta-analysis of diagnostic performance. J Clin Microbiol. 2014; 52 (10): 3731–42.
13. Arvanitis M, Anagnostou T, Fuchs BB, et al. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. Clin Microbiol Rev. 2014; 27 (3): 490–526.
14. Heng SC, Chen SCA, Morrissey CO, et al. Clinical utility of Aspergillus galactomannan and PCR in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with haematological malignancies. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014; 79 (3): 322–7.
15. Hoenigl M, Prattes J, Spiess B, et al. Performance of galactomannan, beta-D-glucan, Aspergillus lateral-flow device, conventional culture, and PCR tests with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. J Clin Microbiol. 2014; 52 (6): 2039–45.
16. White PL, Barnes RA, Springer J, et al. Clinical performance of Aspergillus PCR for testing serum and plasma: a study by the European Aspergillus PCR Initiative. J Clin Microbiol. 2015; 53 (9): 2832–7.
17. Imbert S, Gauthier L, Joly I, et al. Aspergillus PCR in serum for the diagnosis, follow-up and prognosis of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients. Clin Microbiol Infect. 2016; 22 (6): 562. e1–8.
18. Maertens JA, Raad II, Marr KA, et al. Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by *Aspergillus* and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial. Lancet. 2016; 387 (10020): 760–9.
19. Verweij PE, Howard SJ, Melchers WJ, et al. Azole-resistance in Aspergillus: proposed nomenclature and breakpoints. Drug Resist Updat. 2009; 12 (6): 141–7.
20. Astvad KM, Jensen RH, Hassan TM, et al. First detection of TR46/Y121F/T289A and TR34/L98H alterations in Aspergillus fumigatus isolates from azole-naive patients in Denmark despite negative findings in the environment. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58 (9): 5096–101.
21. Richardson M. The ecology of the Zygomycetes and its impact on environmental exposure. Clin Microbiol Infect. 2009; 15 Suppl 5: 2–9.
22. Morace G, Borghi E. Invasive mold infections: virulence and pathogenesis of mucorales. Int J Microbiol. 2011; 2012: 349278.
23. Petrikkos G, Skiada A, Lortholary O, et al. Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. Clin Infect Dis. 2012; 54 Suppl 1: S23–34.
24. Tacke D, Koehler P, Markiefka B, et al. Our 2014 approach to mucormycosis. Mycoses. 2014; 57 (9): 519–24.
25. Skiada A, Lanternier F, Groll AH, et al. Diagnosis and treatment of mucormycosis in patients with hematological malignancies: guidelines from the 3rd European Conference on Infections in Leukemia (ECIL 3). Haematologica. 2013; 98 (4): 492–504.
26. El-Shabrawi MH, Arnaout H, Madkour L, et al. Entomophthoromycosis: a challenging emerging disease. Mycoses. 2014; 57 Suppl 3: 132–7.
27. Guarro J. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013; 32 (12): 1491–500.
28. Sassi C, Stanzani M, Lewis RE, et al. Radiologic findings of Fusarium pneumonia in neutropenic patients. Mycoses. 2016; doi: 10.1111/myc.12538.
29. Al-Hatmi AMS, Van Den Ende AH, Stielow JB, et al. Evaluation of two novel barcodes for species recognition of opportunistic pathogens in Fusarium. Fungal Biol. 2016; 120 (2): 231–45.
30. Johnson LS, Shields RK, Clancy CJ. Epidemiology, clinical manifestations, and outcomes of Scedosporium infections among solid organ transplant recipients. Transpl Infect Dis. 2014; 16 (4): 578–87.
31. Tintelnot K, Wagner N, Seibold M, et al. Re-identification of clinical isolates of the Pseudallescheria boydii-complex involved in near-drowning. Mycoses. 2008; 51 Suppl 3: 11–6.
32. Morio F, Horeau-Langlard D, Gay-Andrieu F, et al. Disseminated Scedosporium/Pseudallescheria infection after double-lung transplantation in patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2010; 48 (5): 1978–82.

33. Kantarcioglu AS, de Hoog GS, Guarro J. Clinical characteristics and epidemiology of pulmonary pseudallescheriasis. Rev Iberoam Micol. 2012; 29 (1): 1–13.

34. Lackner M, de Hoog GS, Verweij PE, et al. Species-specific antifungal susceptibility patterns of Scedosporium and Pseudallescheria species. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56 (5): 2635–42.

35. Schwartz SI, Kenyon C, Thompson GR. Endemic mycoses: what's new about old diseases? Curr Clin Micro Rpt. 2016; 3 (2): 71–80.

Andrej Glaser[1], Erika Robič[2], Petra Rogina Skvarč[3], Barbara Šoba Šparl[4], Saša Simčič[5], Miha Skvarč[6]

Kolonizacija s *Pneumocystis jirovecii* ali pnevmocistična pljučnica – pregled diagnostičnih metod

Pneumocystis jirovecii – Colonisation or Pneumonia - Review of Diagnostic Methods

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Pneumocystis jirovecii*, kolonizacija, pljučnica, verižna reakcija s polimerazo, β-(1-3)-D-glukan, HIV-pozitivni bolniki, trimetoprim/sulfametoksazol

Pneumocystis jirovecii spada med patogene glive, ki pri HIV-pozitivnih in HIV-negativnih imunsko oslabelih ljudeh povzročajo pljučnico z visoko stopnjo umrljivosti. Med najpogostejše dejavnike tveganja spada okužba s HIV, med HIV-negativnimi bolniki pa so ogroženi predvsem bolniki z različnimi hematološkimi malignomi, osebe po alogeni presaditvi krvotvornih matičnih celic ali čvrstih organov in osebe, ki so zaradi različnih kroničnih bolezni zdravljene z imunosupresivi in imunomodulatorji. Gostota glive *P. jirovecii* v različnih delih dihal ni enaka. Najbolj ustrezen vzorec v mikrobiološki diagnostiki pnevmocistične pljučnice je bronhoalveolarna lavaža. Zlati standard mikrobiološkega testiranja je enostopenjska kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času, s katero lahko opredelimo glivno breme. V podporo rezultatom molekularnih diagnostičnih metod za diagnostiko okužbe s *P. jirovecii* se določa tudi β-(1-3)-D-glukan kot panglivni označevalec in z določevanjem obeh šele lahko določimo, ali ima bolnik pnevmocistično pljučnico ali je koloniziran z dovolj veliko diagnostično natančnostjo.

[1] Andrej Glaser, dr. med., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; glaser.andrej@gmail.com

[2] Erika Robič, dipl. mikrobiol. (UN), Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

[3] Petra Rogina Skvarč, dr. med., Infekcijski oddelek, Splošna bolnišnica Novo Mesto, Šmihelska cesta 1, 8000 Novo mesto

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

[5] Asist. znan. sod. dr. Saša Simčič., univ. dipl. kem., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

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

ABSTRACT

KEY WORDS: *Pneumocystis jirovecii*, colonization, pneumonia, polymerase chain reaction, β-(1-3)-D-glucan, HIV-positive patients, trimethoprim/sulphamethoxazole

Pneumocystis jirovecii is a pathogenic fungus, which causes pneumocystic pneumonia with very high mortality in HIV positive and HIV negative immunocompromised patients. The most common factor contributing to the development of pneumocystic pneumonia is infection with HIV. Other factors that contribute to the development of pneumonia are hematologic malignant diseases such as acute lymphoblastic leukemia and lymphoproliferative disorders, solid cancers, allogenic stem cell transplantation, transplantation of various solid organs, and treatment of chronic diseases with immunosupresive or immunomodulatory therapeutic agents. The highest fungal burden of *P. jirovecii* is in the alveolar space and much less in other parts of the respiratory tract; because of this discrepancy, the optimal specimen for molecular and microscopic diagnostic methods is bronchoalveolar lavage. The golden standard for the detection of *P. jirovecii* is real time one-step quantitative polymerase chain reaction. The threshold value determines the fungal burden. The detection of the pan-fungal marker β-(1-3)-D-glucan in serum specimens is complementary to the polymerase chain reaction method and with both we can distinguish pneumocystic pneumonia and colonization with *Pneumocystis jirovecii* with adequate diagnostic accuracy.

UVOD

Pnevmocistična pljučnica, ki je posledica okužbe z glivo *Pneumocystis jirovecii*, povzroča visoko stopnjo umrljivosti pri osebah z oslabelim imunskim sistemom, pri čemer so vzrok za motnjo imunskega sistema lahko bodisi okužbe s HIV bodisi različne prirojene in pridobljene nenalezljive bolezni. Prevalenca in stopnja smrtnosti zaradi pljučnice, povzročene s *P. jirovecii*, sta se močno povišali med pojavom pandemije aidsa v 80. letih prejšnjega stoletja, vendar sta se z uvedbo visoko aktivnih protiretrovirusnih zdravil (angl. *highly active anti-retroviral therapy*, HAART) in preventivnega zdravljenja ponovno znižali. Še vedno pa pnevmocistična pljučnica ostaja pomemben vzrok smrti med ranljivimi skupinami bolnikov *(1, 2)*.

Glivo, ki jo danes uvrščamo v rod *Pneumocystis*, je prvič opisal Carlos Chagas leta 1909 kot posebno razvojno stopnjo parazita *Trypanosoma cruzi*. Leta 1912 je bila uvrščena v lasten rod parazitov *Pneumocystis*. Leta 1914 so jo v čast Antoniju Cariniju poimenovali *P. carinii*. Tekom druge svetovne vojne je bila prvič opisana povezava med intersticijsko pljučnico in oslabelostjo imunskega sistema pri podhranjenih otrocih. S pomočjo genotipizacijskih metod in filogenetske primerjave zaporedij za malo ribosomsko podenoto je bila uvrščena med glive *(3, 4)*. Večvrstnost rodu *Pneumocystis* so dokazali leta 1976 s serološkimi tipizacijskimi metodami. Človek se lahko okuži le z vrsto *P. jirovecii*. Tudi druge vrste pnevmocist so gostiteljsko specifične: *P. carinii* in *P. wakefildae* pri podganah, *P. murina* pri miših in *P. oryctalagi* pri zajcih *(1)*. Bistvena značilnost, po kateri se pnevmocista loči od ostalih gliv, je prisotnost holesterolnih gradnikov v celični steni, kar omeji uporabo fungicidnih sredstev (npr. amfotericina B) *(5)*.

Zaradi vedno večjega števila oseb s pridobljeno oslabelostjo imunskega sistema je pomembno ugotoviti, ali je pri bolniku prisotna kolonizacija ali okužba s *P.*

jirovecii. V primeru okužbe je namreč potrebno bolnika zdraviti s specifično fungistatično terapijo, ogrožene pa preventivno kriti s trimetoprim/sulfametoksazolom *(1)*. V prispevku bodo orisane različne diagnostične metode dokazovanja *P. jirovecii* in načini razlikovanja med pnevmocistično pljučnico in kolonizacijo.

DEJAVNIKI TVEGANJA, ŽIVLJENJSKI KROG *PNEUMOCYSTIS JIROVECII*, PRENOS IN KOLONIZACIJA

P. jirovecii povzroča izključno pljučnico pri osebah z motnjo delovanja imunskega sistema, medtem ko so zdravi ljudje in otroci kolonizirani z glivo. Najvišja prevalenca pnevmocistične pljučnice je pri osebah, ki so okužene s HIV in imajo nizko število celic T-pomagalk (< 200 celic/µl). V ekonomsko razvitih državah z urejenim zdravstvenim sistemom je stopnja umrljivosti zaradi pnevmocistične pljučnice pri HIV-pozitivnih osebah nizka, v delih sveta, kjer ni dostopa do visoko aktivnih protiretrovirusnih zdravil, predvsem v Podsaharski Afriki, pa je pnevmocistična pljučnica še vedno zelo pogost vzrok obolevnosti in smrtnosti *(6)*.

Pomemben bazen kliničnih stanj, ki vplivajo na visoko prevalenco obolevnosti s pnevmocistično pljučnico, je pri osebah, ki imajo iatrogeno povzročeno imunosupresijo oziroma motnje imunskega sistema zaradi nenalezljivih bolezni. Visoka obolevnost in umrljivost je pri bolnikih, ki obolevajo zaradi različnih hematoloških malignomov (akutna limfoblastna levkemija, limfoproliferativne bolezni), primarnih in sekundarnih malignih tumorjev (karcinom pljuč, ledvic, glioblastom), kroničnih vnetnih bolezni (ulcerozni kolitis, Crohnova bolezen, granulomatozna bolezen s poliangiitisom) ali pa so zdravljeni s presaditvijo krvotvornih matičnih celic (pojav je pogostejši pri alogeni presaditvi kot pri avtologni presaditvi), indukcijsko imunosupresivno kemoterapijo ali adjuvantno imunosupresivno in imunomodulatorno terapijo, pri kateri je treba upoštevati odmerek, frekvenco odmerjanja in sočasno uporabo drugih učinkovin *(1, 3, 6, 7)*.

Razvojni krog *Pneumocystis spp.* zaradi nezmožnosti kultiviranja *in vitro*, izven pljuč človeka in laboratorijskih živali, še ni docela razjasnjen. Predvidoma se pnevmociste razmnožujejo s pomočjo spolnega in nespolnega razvojnega kroga. Oba načina razmnoževanja sta med seboj tesno povezana. V nespolnem razvojnem krogu se haploidne trofozoitne oblike z mitozo delijo, pri čemer nastaneta iz enega haploidnega trofozoita dva. Spolni razvojni krog se začne s procesom kariogamije z zlitjem dveh trofozoitnih vegetativnih oblik, sledita mejotična delitev in sporogeneza. Na koncu sporogeneze nastane sporocista. Dodatne mitotične delitve in kompartmentalizacija jeder in organelov povzročijo, da znotraj sporociste nastane osem spor. Zaključna faza spolnega razvojnega kroga je okrogla cista, iz katere se izločijo spore – trofozoiti, ki vstopijo v nespolni razvojni krog *(4, 23)*.

Še vedno ni popolnoma jasno, ali se pnevmocistična pljučnica razvije zaradi reaktivacije okužbe pri koloniziranih osebah ob padcu njihovega imunskega statusa ali gre za *de novo* okužbo. Rezervoar pnevmocist so lahko osebe z normalno delujočim imunskim sistemom (npr. otroci, nosečnice, zdravstveni delavci). Pri otrocih lahko pride do kolonizacije že pred prvim letom starosti, še preden se njihov imunski sistem razvije tako dobro, da bi odstranil kolonizacijo. Otroci so tudi pomembni prenašalci okužbe, predvsem ko zbolijo z virusnimi okužbami zgornjih dihal. Kolonizirane so lahko tudi osebe, ki so pred kratkim prebolele pnevmocistično pljučnico – HIV-pozitivne osebe so lahko nosilci tudi več kot leto dni. Zdravstveni delavci so pomembni prenašalci pnevmocist, predvsem tisti, ki delajo na kliničnih

oddelkih, kjer je potrebna dodatna zaščita bolnikov zaradi osnovnih bolezni. *P. jirovecii* se prenaša bodisi iz imunokompetentne osebe na imunonekompetentno osebo ali obratno *(6, 8, 9)*. S pomočjo genotipizacijskih metod je bil dokazan kapljični in aerogeni prenos *P. jirovecii* tako pri bolnikih s pnevmocistično pljučnico kot pri koloniziranih osebah. Pneumocista je bila dokazana v oddaljenosti 1, 5 in 8 m od bolniške postelje, kar je pomembno vedeti pri preprečevanju prenosov okužbe v zdravstvenih ustanovah *(8)*.

KLINIČNA SLIKA

Kolonizacija s *P. jirovecii* pri osebah z normalnim delovanjem imunskega sistema je brez klinično pomembnih simptomov. Potek pnevmocistične pljučnice pri HIV-pozitivnih in pri HIV-negativnih osebah, ki imajo okvarjeno delovanje imunskega sistema, se razlikuje tako v hitrosti napredovanja okužbe kot tudi v simptomatiki okužbe. Tarčno tkivo pri okužbi s pnevmocističnimi vegetativnimi celicami – trofozoiti so alveolarne epitelijske celice oziroma pnevmociti tipa 1, ki tvorijo substrat za razmnoževanje pnevmocist in patohistološke spremembe ob okužbi. Zaradi aktivacije pljučnih makrofagov, celic T-pomagalk in nevtrofilcev pride do patoloških sprememb na alveolarnem epiteliju. Zaradi patoloških sprememb se poveča prepustnost alveolarnih kapilar in nastane intersticijski edem. Vnetna reakcija, spremembe v alveolarni steni in prekomerno razmnoževanje trofozoitov vodijo v moteno izmenjavo kisika in ogljikovega dioksida s hiperkapnijo in hipoksemijo ter v motnje kislinsko-baznega ravnovesja *(4)*.

Pnevmocistična pljučnica spada med netipične intersticijske pljučnice. Klinična slika in simptomi so neznačilni in nespecifični. Bolniki imajo blago povišano telesno temperaturo do 38,5 °C, izgubijo apetit, telesno težo, se znojijo in imajo suh kašelj brez izmečka. S poslabšanjem hipoksemije pride do progresivnega povečanja dihalnega dela, dispneje, tahipneje z visoko dihalno frekvenco (> 50 vdihov/minuto) in respiratorne odpovedi, ki vodi v večorgansko odpoved. Pnevmocistična pljučnica poteka pri HIV-negativnih bolnikih, zaradi močnega vnetnega odziva in težkih osnovnih bolezni hitreje in s težjo klinično sliko. Bolniki velikokrat potrebujejo podporno respiratorno terapijo. Pri HIV-pozitivnih bolnikih ima pnevmocistična pljučnica zaradi motenega delovanja makrofagov in mediatorjev vnetja subakuten potek. Ob upoštevanju različnih kliničnih in diagnostičnih spremenljivk lahko pnevmocistično pljučnico razdelimo, glede na težo simptomov, v tri razrede: v blago, srednjo in težko (tabela 1) *(10)*.

Tabela 1. Stopnje teže pnevmocistične pljučnice.

	Pnevmocistična pljučnica		
	Blaga	**Srednja**	**Težka**
Klinični znaki in simptomi	povečanje dispneje ob naporu z ali brez kašlja in potenja	dispneja pri majhnem naporu, občasno ob mirovanju, povišana telesna temperatura z/brez znojenja	dispneja in tahipneja ob mirovanju, povišana telesna temperatura, kašelj
Tlak kisika v arterijski krvi	> 11,0 kPa	8,1–11,0 kPa	< 8,0 kPa
Saturacija kisika v arterijski krvi	> 96 %	91–96 %	< 91 %
RTG p/c	normalni izvid oziroma blago perihilarno zasenčenje	difuzno intersticijsko zasenčenje	zelo razširjeno intersticijsko zasenčenje z/brez difuznega alveolarnega zasenčenja

V redkih primerih lahko pride do nastanka limfogenih ali hematogenih kužnih zasevkov pnevmociste v različne organske sisteme. Najpogostejše mesto izvenpljučne pnevmocistične okužbe so bezgavke, sicer pride do zasevanja tudi v organe retikuloendotelijskega sistema, nadledvično žlezo, ščitnico, trebušno slinavko, črevesje in sečila *(4)*.

Klinična slika pnevmocistične pljučnice je zelo nespecifična, zato je treba predvsem pri HIV-negativnih bolnikih, ki lahko imajo za pljučnico številne neinfekcijske vzroke in prejemajo močno imunosupresivno terapijo, upoštevati širok spekter diferencialnih diagnoz (npr. invazivna pljučna aspergiloza). Sedem odstotkov bolnikov z oslabelostjo imunskega sistema nima klinične simptomatike, zato je pri teh potrebno uporabiti kombinirano klinično, slikovno, mikrobiološko in biokemično obravnavo za diagnosticiranje pnevmocistične pljučnice *(11)*.

Določanje števila limfocitov ali limfocitnih populacij v diagnostiki pnevmocistične pljučnice nima visoke specifičnosti. Zaradi poškodbe alveolarnega epitelija pride do nespecifičnega povišanja laktatne dehidrogenaze (LDH) v serumu. Nemikrobiološko diagnostiko kombiniramo s slikovnimi metodami, vključujoč rentgensko slikanje pljuč in računalniško tomografijo visoke ločljivosti (angl. *high-resolution computed tomography*, HRCT). HRCT je zlati standard slikovne diagnostike s 100 % občutljivostjo, specifičnost je 89 %, zato je treba ob pozitivnem HRCT izvidu izključiti tudi druge vzroke pljučne patologije, medtem ko negativni HRCT izvid izključi pnevmocistično pljučnico *(12, 13)*.

MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA

Pnevmocistična pljučnica je urgentno stanje in zahteva hitro in točno diagnostično obravnavo. Ta temelji na različnih pristopih. V klinični obravnavi bolnika je treba opraviti temeljit anamnestični in klinični pregled, slikovno diagnostiko s pomočjo RTG p/c in HRTC ter širok nabor laboratorijskih preiskav.

Mikrobiološka diagnostična obravnava etiološko opredeli, ali je bolnik le koloniziran in ob določenih indikacijah potrebuje profilaktično zdravljenje ali pa je bolnik ogrožen s pnevmocistično pljučnico. Deli se na vrstno specifično, kot je npr. direktna imunofluorescenca in molekularno-biološke preiskave, ter nespecifično, kot je določanje β-(1-3)-D-glukana in LDH. *In vitro* kultivacija pnevmocist

na selektivnih gojiščih ni možna. Zaradi zelo visoke občutljivosti je najbolj primerna diagnostična metoda kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (angl. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) v realnem času, saj je količina gliv v invazivno odvzetih vzorcih zelo različna glede na osnovno obolenje bolnika. Najbolj primeren vzorec je bronhoalveolarna lavaža (BAL). Induciran sputum odvzamemo le pri HIV-pozitivnih bolnikih, ki imajo v dihalih visoko količino povzročitelja. V redkih primerih lahko odvzamemo tudi tkivo, pridobljeno s transbronhialno biopsijo, odprto torakalno biopsijo ali z bronhialnim krtačenjem. V poštev lahko pride tudi spiranje ust, bris nosu ali aspirat ustnožrelnega prostora, vendar moramo ob tem upoštevati, da se zaradi zorenja pnevmocist na alveolarnih pnevmocitih tipa 1 gostota glive in s tem tudi občutljivost detekcije, bolj ko se približujemo vzorcem zgornjega respiratornega sistema, postopoma znižujeta *(11)*.

Klasična mikrobiološka diagnostika pnevmocistične pljučnice je temeljila na različnih barvanjih razmazov respiratornih vzorcev – barvanje po Giemsi, s toluidinskim modrilom, s kalkofluor belim ali Gomorijevim srebrenjem. V 90. letih prejšnjega stoletja se je v mikrobiološki diagnostiki pnevmocistične pljučnice začela uporabljati direktna imunofluorescenca z uporabo monoklonskih protiteles proti *P. jirovecii*, ki se vežejo le na cistične, ne pa tudi na trofozoitne oblike glive *(4)*.

Najvišjo občutljivost in specifičnost dosežemo z uporabo enostopenjskega qPCR v realnem času s pomnoževanjem velike podenote mitohondrijske ribosomalne RNA (*mtLSU rRNA*); sekundarne tarče pomnoževanja v reakciji qPCR so lahko še *msg* (gen za veliki površinski glikoprotein), *hsp70* (gen za protein toplotnega šoka 70) in *dhps* (gen za dihidropteorat sintetazo). Za diagnosticiranje pnevmocistične pljučnice je občutljivost qPCR pri HIV-pozitivnih osebah 99 %, specifičnost pa 91 % in je primerljiva s specifičnostjo in občutljivostjo pri HIV-negativnih osebah z imunsko oslabelostjo. S pomočjo qPCR je možno ločiti med pnevmocistično pljučnico in kolonizacijo s *P. jirovecii* glede na interpretiranje vrednosti Ct (angl. *cycle treshold*). Ob upoštevanju celotne populacije bolnikov (HIV-pozitivne in HIV-negativne) in pri HIV-negativnih bolnikih je pnevmocistična pljučnica prisotna pri vrednostih Ct manj kot 31. Vrednosti Ct, večje od 35, pomenijo kolonizacijo bolnika s *P. jirovecii*. Pri HIV-pozitivnih bolnikih so vrednosti Ct zaradi višje količine gliv v BAL nižje (pnevmocistična pljučnica – Ct manj kot 27, kolonizacija – Ct več kot 30). Upoštevati je treba tudi sivo cono med dejansko pnevmocistično pljučnico in kolonizacijo; v slednjem primeru se lahko opremo na rezultate serumskih vrednosti β-(1-3)-D-glukana in direktne imunofluorescence *(14, 15)*.

qPCR preiskava BAL-a je zlati standard v diagnostiki pnevmocistične pljučnice. Ker pri hudo prizadetih bolnikih odvzem invazivnih vzorcev pogosto ni možen, se ob molekularnih diagnostičnih metodah opiramo tudi na določanje vrednosti β-(1-3)-D-glukana v serumu bolnika. β-(1-3)-D-glukan je komponenta glivne stene pri večini medicinsko pomembnih gliv, prisoten je pri rodovih *Candida, Aspergillus, Fusarium, Acremonium, Scedosporium, Pneumocystis*, odsoten pa pri redu *Mucorales* in rodu *Criptococcus (16, 17)*.

V rutinski diagnostiki določanja vrednosti β-(1-3)-D-glukana v serumu bolnika se najpogosteje uporablja test Fungitell` družbe Cape Cod, ZDA. Preiskava se uporablja kot panglivni diagnostični test. Zaradi možnosti lažno pozitivnih rezultatov je treba upoštevati široko diferencialno diagnostiko. Do lažno pozitivnih rezultatov lahko pride, kadar bolniki prejemajo intravensko humani albumin, imunoglobuline, faktorje koagulacije ali plazemske

Tabela 2. Pregled proizvajalcev testov β-(1-3)-D-glukana in njihove pražne vrednosti. FDA – Agencija za hrano in zdravila (angl. *Food and Drug Administration*), / – test ni validiran za klinične vzorce.

Test	Proizvajalec	FDA	Vrsta raka	Pražna vrednost (pg/ml)
Fungitell	Associates of Cape Cod ZDA	DA (kolorimetrični test)	*Limulus polyphemus*	80
Glucatell	Associates of Cape Cod ZDA	NE (kolorimetrični test)	*Limulus polyphemus*	/
Endosafe-PTS glucan	Charles River Lab. ZDA	NE (kolorimetrični test)	*Limulus polyphemus*	/ (območje 10–1.000)
FUNGITEC G-MK	Seikagaku Biobusiness Japonska	NE (kolorimetrični test – odobren na Japonskem)	*Tachypleus tridentatus*	20
Beta glucan test	Waco Pure Chemical Ind. Japonska	NE (turbidimetrični test)	*Tachypleus tridentatus*	11
BGSTAR	Maruha Japonska	NE (turbidimetrični test)	*Tachypleus tridentatus*	11
GKT assay	Gold Mountain River Tech Kitajska	NE (odobren na Kitajskem)	*Tachypleus tridentatus*	14
Fungus beta glucan	Dynamiker Biotechnology Kitajska	NE	*Tachypleus tridentatus*	70

proteine. Pogosto je preiskava lažno pozitivna pri bolnikih, ki prejmejo ledvično nadomestno zdravljenje s hemodializo (dializne membrane), ali so septični (po Gramu pozitivna in po Gramu negativna sepsa). Preiskava določanja β-(1-3)-D-glukana je validirana le za serumske vzorce *(18, 19)*. V tabeli 2 so predstavljeni različni komercialni testi za določanje vrednosti β-(1-3)-D-glukana v serumu bolnikov ali v nekliničnih vzorcih.

Evropska konferenca o okužbah pri levkemičnih bolnikih je nedavno izdala priporočila o mikrobiološki diagnostiki pri hematoloških bolnikih s pnevmocisitčno pljučnico. Najbolj reprezentativen vzorec je BAL, alternativni vzorci so induciran sputum ali vzorci zgornjega respiratornega sistema (bris nosu ali izpirek ustnožrelnega prostora). Zaradi subkliničnе slike pnevmocistične pljučnice je obvezno treba odvzeti serum za določevanje serumske vrednosti β-(1-3)-D-glukana. Zlati standard dokazovanja pnevmocistične pljučnice je molekularna diagnostika – qPCR v realnem času in direktna imunofluorescenca. Serumska koncentracija β-(1-3)-D-glukana potrdi diagnozo, saj se koncentracija β-(1-3)-D-glukana pri bolnikih s pnevmocistično pljučnico bistveno višja kot pri koloniziranih osebah in negativnih kontrolah *(11, 20)*.

Pnevmocistično pljučnico zanesljivo izključimo ob negativnem rezultatu β-(1-3)-D-glukana, pozitiven izvid β-(1-3)-D-glukana pa zaradi panglivne narave preiskave pomeni, da moramo upoštevati tudi druge glivne povzročitelje pljučnic *(11, 21)*.

V Sloveniji se izvaja stopenjska diagnostika okužb s *P. jirovecii* v Laboratoriju za parazitologijo in Laboratoriju za humoralno imunologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Univerze v Ljubljani. V tabeli 3 so predstavljeni rezultati preiskav 74 bolnikov s sumom na

pnevmocistično pljučnico. Glede na Ct--vrednosti qPCR v realnem času in vrednosti β-(1-3)-D-glukana se določi, ali je bolnik koloniziran ali ima pnevmocistično pljučnico. Večina bolnikov (n = 56) je imelo vrednost β-(1-3)-D-glukana v serumu med 300 in 500 pg/ml in nizek Ct (29–35), kar nakazuje, da gre za pnevmocistično pljučnico. Ostalih 18 bolnikov ima visoke vrednosti Ct (34–37) in povišane vrednosti β-(1-3)-D-glukana (100–300 pg/ml). Glede na te podatke, je pri slednjih težko določiti, ali gre dejansko za pnevmocistično pljučnico ali za kolonizacijo s *P. jirovecii*. V takem primeru je potrebna dosledna anamnestična, klinična obravnava in široka diferencialna diagnostika, saj lahko tudi drugi glivni povzročitelji povzročajo visoke vrednosti β-(1-3)-D-glukana.

PREPREČEVANJE OKUŽBE S *PNEUMOCYSTIS JIROVECII*

Kolonizacija respiratornega sistema zdravih ljudi in otrok s *P. jirovecii* je pogosta, zato prihaja do prenosa pnevmociste na občutljive bolnike. Z namenom preprečevanja prenosa je v zdravstvenih ustanovah, posebno na oddelkih, kjer se zdravijo imunsko oslabljeni bolniki, potrebno uvesti stroge higienske ukrepe in smernice za profilaktično zdravljenje.

Bolnike, okužene s *P. jirovecii*, je treba izolirati v enoposteljne sobe, ki imajo možnost ustvarjanja negativnega tlaka. Ostale imunsko oslabele bolnike brez znakov pnevmocistične pljučnice je treba hospitalizirati ločeno od bolnikov s pnevmocistično pljučnico. Zdravstveno osebje mora biti poučeno o načinih prenosa pnevmociste, saj so lahko vir prenosa. Ob delu z imunsko oslabljenimi bolniki se mora obvezno nositi kirurška maska *(7)*.

Osnovna profilaktična zaščita je s trimetoprim/sulfametoksazolom. Trajanje le-te je glede na priporočila Nemškega združenja hematologov in onkologov do zaključka hematološke terapije oziroma dokler se nivo celic T-pomagalk ne vrne na vrednost večjo od 200/µl. Pri bolnikih, ki so bili dlje časa na profilaktičnem zdravljenju, so se razvile različne mutacije v genu za dihidropteorat sintazo. Kljub temu je učinkovitost profilakse in zdravljenja s trimetoprim/sulfametoksazolom dobra, saj so opisani primeri, ko je bila odkrita mutacija, ki naj bi vodila v neuspeh terapije, a so bolniki kljub temu ozdraveli *(10)*. Trimetoprim/sulfametoksazol se uporablja kot fungistatično sredstvo v zdravljenju pnevmocistične pljučnice. Zaradi težkega poteka pnevmocistične pljučnice se kot adjuvantna terapija zraven trimetoprim/sulfametoksazola uporabljajo še kortikosteroidi in ehinokandini *(10, 11, 22)*.

Tabela 3. Vrednosti β-(1-3)-D-glukana in srednje vrednosti Ct ciklov verižne reakcije s polimerazo pri 74 bolnikih s sumom na pnevmocistično pljučnico. Ct – vrednost Ct (angl. *cycle of treshold*), N – število bolnikov.

β-(1-3)-D-glukana (pg/ml)	N	Ct	Standardni odklon
< 100	3	34,77	5,42
100–200	11	34,82	3,65
200–300	4	37,33	2,36
300–400	7	35,27	2,75
400–500	7	29,41	6,25
> 500	42	28,90	5,18

ZAKLJUČEK

Pnevmocistična pljučnica je resna, hitro potekajoča okužba z visoko stopnjo smrtnosti pri HIV-negativnih imunsko oslabljenih bolnikih. Zato spada mikrobiološka diagnostika med urgentne preiskave, saj zamujanje s ciljno terapijo (trimetoprim/sulfametoksazol) močno poveča stopnjo smrtnosti, predvsem pri bolnikih, ki potrebujejo intubacijo in podporno dihalno terapijo. Zlati standard mikrobiološke diagnostike je qPCR v realnem času, ki je najbolj občutljiva in specifična metoda. Zaradi potrebe po ločevanju med kolonizacijo dihal s *P. jirovecii* in pnevmocistično pljučnico je treba določiti tudi serumski β-(1-3)-D-glukan, ki je visoko občutljiv test za pnevmocistično pljučnico.

LITERATURA

1. Sokulska M, Kicia M, Wesołowska M, et al. Pneumocystis jirovecii – from a commensal to pathogen: clinical and diagnostic review. Parasitology Research. Parasitol Res. 2015; 114 (10): 3577–85.
2. Tasaka S, Tokuda H. Pneumocystis jirovecii pneumonia in non-HIV-infected patients in the era of novel immunosuppressive therapies. J Infect Chemother. 2012; 18 (6): 793–806.
3. Roux A, Gonzalez F, Roux M, et al. Update on pulmonary Pneumocystis jirovecii infection in non-HIV patients. Med Mal Infect. 2014; 44 (5): 185–98.
4. Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, et al., eds. Manual of clinical microbiology. 11th ed. Washington D.C.: American Society of Microbiology; 2015.
5. Erwig LP, Gow NA. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. Nat Rev Microbiol. 2016; 14 (3): 163–76.
6. Morris A, Norris KA. Colonization by Pneumocystis jirovecii and its role in disease. Clin Microbiol Rev. 2012; 25 (2): 297–317.
7. Yiannakis EP, Boswell TC. Systematic review of outbreaks of Pneumocystis jirovecii pneumonia: evidence that P. jirovecii is a transmissible organism and the implications for healthcare infection control. J Hosp Infect. 2016; 93 (1): 1–8.
8. Le Gal S, Pougnet L, Damiani C, et al. Pneumocystis jirovecii in the air surrounding patients with Pneumocystis pulmonary colonization. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015; 82 (2): 137–42.
9. Avino LJ, Naylor SM, Roecker AM. Pneumocystis jirovecii pneumonia in the non-HIV-infected population. Ann Pharmacother. 2016; 50 (8): 673–9.
10. Maschmeyer G, Helweg-Larsen J, Pagano L, et al. ECIL guidelines for treatment of Pneumocystis jirovecii pneumonia in non-HIV-infected haematology patients. J Antimicrob Chemother. 2016; 22; 71 (9): 2405–13.
11. Alanio A, Hauser PM, Lagrou K, et al. ECIL guidelines for the diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. J Antimicrob Chemother. 2016; 71 (9): 2386–96.
12. Esteves F, Calé SS, Badura R, et al. Diagnosis of Pneumocystis pneumonia: evaluation of four serologic biomarkers. Clin Microbiol Infect. 2015; 21 (4): 379.e1–10.
13. Thomas CF Jr, Limper AH. Pneumocystis pneumonia. N Engl J Med. 2004; 350 (24): 2487–98.
14. Fauchier T, Hasseine L, Gari-Toussaint M, et al. Detection of Pneumocystis jirovecii by Quantitative PCR to differentiate colonization and pneumonia in immunocompromised HIV-positive and HIV-negative patients. J Clin Microbiol. 2016; 54 (6): 1487–95.
15. Damiani C, Le Gal S, Da Costa C, et al. Combined quantification of pulmonary Pneumocystis jirovecii DNA and serum (1->3)-β-D-glucan for differential diagnosis of pneumocystis pneumonia and Pneumocystis colonization. J Clin Microbiol. 2013; 51 (10): 3380–8.
16. Pickering JW, Sant HW, Bowles CA, et al. Evaluation of a (1->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. J Clin Microbiol. 2005; 43 (12): 5957–62.
17. Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: diagnostic procedures. Clin Microbiol Infect. 2012; 18 Suppl 7: 9–18.

18. Karageorgopoulos DE, Qu JM, Korbila IP, et al. Accuracy of β-D-glucan for the diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia: a meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2014; 19 (1): 39–49.
19. Salerno D, Mushatt D, Myers L, et al. Serum and bal beta-D-glucan for the diagnosis of Pneumocystis pneumonia in HIV positive patients. Respir Med. 2014; 108 (11): 1688–95.
20. Tasaka S, Kobayashi S, Yagi K, et al. Serum (1 → 3) β-D-glucan assay for discrimination between Pneumocystis jirovecii pneumonia and colonization. J Infect Chemother. 2014; 20 (11): 678–81.
21. Damiani C, Le Gal S, Goin N, et al. Usefulness of (1,3) ß-D-glucan detection in bronchoalveolar lavage samples in Pneumocystis pneumonia and Pneumocystis pulmonary colonization. J Mycol Med. 2015; 25 (1): 36–43.
22. Kutty G, Davis AS, Ferreyra GA, et al. β-glucans are masked but contribute to pulmonary inflammation during Pneumocystis pneumonia. J Infect Dis. 2016; 214 (5): 782–91.
23. DPDx: Pneumocystis [internet]. Atlanta: Centers for disease control and prevention; 2013 [citirano 2016 Sep 29]. Dosegljivo na: http://www.cdc.gov/dpdx/pneumocystis/index.html

Tamara Kastrin[1], Metka Paragi[2], Marta Grgič - Vitek[3], Irena Grmek Košnik[4], Tjaša Žohar Čretnik[5]

Oslovski kašelj v Sloveniji – epidemiologija in novosti v mikrobiološki diagnostiki

Whooping Cough in Slovenia–Epidemiology and Updates in Microbiological Diagnostics

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: oslovski kašelj, epidemiologija, mikrobiološka diagnostika

Oslovski kašelj ostaja kljub visoki precepljenosti prebivalstva ena pomembnejših bolezni dihal. Kroženje bakterije v populaciji predstavlja grožnjo za dojenčke, ki še niso bili cepljeni in za katere je oslovski kašelj huda, smrtno nevarna bolezen. Več primerov zasledimo tudi v starostnih skupinah, v katerih je imunost po cepljenju že upadla. Za mikrobiološko potrjevanje oslovskega kašlja je ključna izbira prave metode: osamitev v kulturi, molekularna ali serološka diagnostika ter kombinacija le-teh predvsem glede na trajanje kliničnih znakov. Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni je zaradi potrebe po standardizaciji diagnostike izdal dva dokumenta za molekularno in serološko dokazovanje povzročitelja oslovskega kašlja. Pri molekularnih metodah je pomembna uporaba pravih tarčnih zaporedij, za dokaz *Bordetella pertussis* uporabljamo zaporedje IS481 in specifični odsek promotorske regije toksina oslovskega kašlja (angl. *pertussis toxin*, PT). Pri serološki diagnostiki je pomembno dokazovanje protiteles razreda IgG, usmerjenih samo proti PT, in možnost potrjevanja bolezni tudi na osnovi testiranja enega serumskega vzorca. Za načrtovanje in oceno nacionalnega programa cepljenja proti oslovskemu kašlju je pomembno čim boljše spremljanje bolezni, laboratorijsko potrjevanje pri vsakem sporadičnem bolniku z značilno klinično sliko, ob izbruhu pa potrjevanje oz. odvzem kužnin za osamitev povzročitelja pri vsaj enem bolniku.

[1] Dr. Tamara Kastrin, univ. dipl. mikr., Oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo Ljubljana, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Grabovičeva ulica 44, 1000 Ljubljana; tamara.kastrin@nlzoh.si

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

[3] Dr. Marta Grgič - Vitek, dr. med., Center za nalezljive bolezni, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Zaloška cesta 29, 1000 Ljubljana

[4] Dr. Irena Grmek Košnik, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj; Center za nalezljive bolezni, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Zaloška cesta 29, 1000 Ljubljana

[5] Mag. Tjaša Žohar Čretnik, dr. med., Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

ABSTRACT

KEY WORDS: pertussis, epidemiology, microbiological diagnostics

Whooping cough remains a major respiratory disease, despite high vaccination coverage. Circulation of the bacteria in the population presents a threat to infants who have not been vaccinated and for them whooping cough is severe, life-threatening disease. More cases can also be observed in the age groups with decreased immunity after vaccination. For microbiological diagnostics of whooping cough choosing the right method (isolation in culture, serology or molecular diagnostics) and a combination of these tests, in particular in conjunction with clinical information, is important. Because of the need for standardization of diagnostics, the European Centre for Disease Prevention and Control has released two documents for molecular and serological diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis*. Of major importance in molecular methods are the right target sequences (IS*481* and pertussis toxin promoter region), whereas in serology the detection of subclass IgG antibodies directed only against the pertussis toxin and the interpretation can be based on single-sample serology. For planning and evaluation of the national immunization program against pertussis it is important to optimize the surveillance of the disease, to obtain laboratory confirmation for each of sporadic case with a typical clinical picture, and to isolate the agent in the culture in case of an outbreak.

UVOD

Oslovski kašelj je zelo nalezljiva akutna bolezen dihal, ki jo povzroča bakterija *Bordetella pertussis*, redkeje *Bordetella parapertussis*. Oslovski kašelj preprečujemo s cepljenjem, ki je bilo v Sloveniji uvedeno leta 1959, od leta 1999 dalje so otroci cepljeni proti oslovskemu kašlju z neceličnim cepivom *(1)*. Imunost po cepljenju ni trajna, temveč traja od 4–12 let, po preboleli bolezni pa 4–20 let *(2)*. Edini rezervoar so ljudje, bolezen se prenaša kapljično *(3)*. Bolezen je pri mladostnikih in odraslih osebah precej blažja in zato lahko nosijo in širijo bakterijo več tednov ter so glavni vir okužbe za nezaščitene posameznike *(4)*. V tipični obliki se bolezen pojavi pri nezaščitenih (delno zaščitenih) dojenčkih, za katere je zelo nevarna in se lahko konča celo s smrtjo. Kljub visoki precepljenosti, ki je bila v letu 2014 v Sloveniji 94,9 %, ostaja oslovski kašelj endemičen in je ena od najslabše obvladovanih bolezni, ki jih preprečujemo s cepljenjem *(5)*. Bolezen se pojavlja ciklično z višjo pogostostjo vsakih 2–5 let. Bolezen je v Evropi v porastu in je leta 2012 dosegla najvišjo stopnjo pojavnosti (10,93 primerov na 100.000 prebivalcev) *(4)*. Dejavniki, ki so lahko prispevali k večji pojavnosti oslovskega kašlja v zadnjem desetletju vključujejo izboljšan nacionalni epidemiološki nadzor, uvedbo bolj občutljivih molekularnih diagnostičnih metod, genetske spremembe bakterije in razhajanje s cepilnimi antigeni, pomanjkanje obnovitvenih cepljenj ter spremembe v sestavi cepiv ali shem cepljenja *(6, 7)*. Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. *European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) si prizadeva izboljšati epidemiološko spremljanje bolezni in poenotiti laboratorijsko diagnostiko za boljši nadzor oslovskega kašlja v Evropi in spremljanje učinkov cepljenja ter učinkovitosti cepiv. Ocenjujejo, da je oslovski kašelj še vedno premalo prepoznana in posledično premalo diagnosticirana bolezen,

zlasti pri odraslih, in vidijo potrebo po boljši ozaveščenosti zdravstvenih delavcev in javnosti *(8)*.

EPIDEMIOLOGIJA OSLOVSKEGA KAŠLJA V SLOVENIJI

Pred uvedbo cepljenja proti oslovskemu kašlju v letu 1959 je bilo v Sloveniji prijavljenih več tisoč bolnikov z oslovskim kašljem letno (v letu 1957 skoraj 7.000). Po uvedbi poživitvenih odmerkov v drugem letu in v starosti štirih let (v letih 1961 in 1969), se je število bolnikov hitro zniževalo in v 90-ih letih prejšnjega stoletja padlo pod 100 prijavljenih letno. V letu 1990 je bil drugi poživitveni odmerek (pri starosti 4 let) opuščen, predvsem zato, da se je znižalo število odmerkov proti davici in tetanusu (z 8 na 7 odmerkov) in ker takrat ni bilo pričakovati povečanja pojavnosti oslovskega kašlja. Poleg tega so v letu 1999 celično cepivo zamenjali z necelicnim *(9)*. Zaradi opaznega povečanja pojavnosti oslovskega kašlja od leta 2003 dalje, predvsem v letih 2006 in 2007, je bil v letu 2009 uveden dodaten poživitveni odmerek proti oslovskemu kašlju za otroke v starosti 8 let (v tretjem razredu osnovne šole), in sicer tako, da so cepivo proti davici in tetanusu, ki se je do takrat uporabljalo pri otrocih v tej starostni skupini, zamenjali s trivalentnim cepivom, ki vključuje tudi komponento proti oslovskemu kašlju.

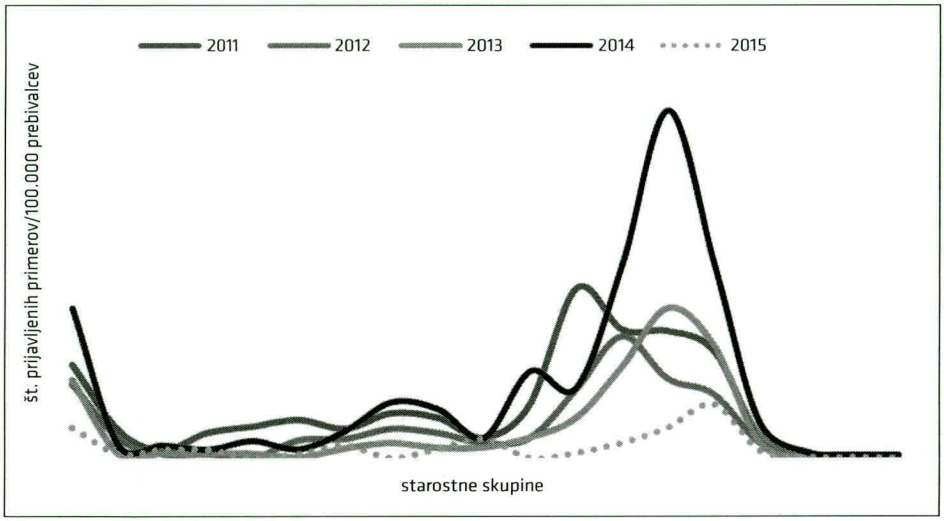
Podatki epidemiološkega spremljanja kažejo, da so bile v Sloveniji v zadnjih desetih letih najvišje incidenčne stopnje oslovskega kašlja zabeležene v letih 2007 (35,4/100.000 prebivalcev) in 2010 (29,8/100.000 prebivalcev) (tabela 1). Visoke incidenčne stopnje se izmenjujejo z nižjimi vsakih 2–4 let. V tem obdobju je bilo prijavljenih skupno 3.591 bolnikov z oslovskim kašljem, od tega 54,4 % žensk in 45,6 % moških. Skoraj 6 % (209) bolnikov je bilo mlajših od enega leta, skoraj polovica prijavljenih (47,2 %) je bila starih 10–14 let. Največ zbolelih v tem obdobju je bilo starih 12 let (404–11,3 %), nekaj manj pa 13 (387) in 11 let (323). V zadnjem petletju je bilo največ prijavljenih bolnikov starih 13 let (13,9 %).

Najvišje stopnje obolevanja se v zadnjih letih pomikajo proti višjim starostim, od 11 let v letu 2011 na 14 let v letu 2015 (slika 1), kar bi utegnilo biti posledica dodatnega poživitvenega odmerka v starosti 8 let (pred uvedbo – v letih 2006 do 2008 – so imeli največjo starostno-specifično incidenco otroci, stari od devet do enajst let).

Po podatkih s prijavnic je bilo v tem obdobju laboratorijsko potrjenih 71 % primerov oslovskega kašlja. Med zbolelimi je bila dobra polovica (53 %) popolno cepljenih proti oslovskemu kašlju. Bolnišnično zdravljenje je potrebovalo 22 % zbolelih, med mlajšimi od enega leta jih je bolnišnično zdravljenje potrebovalo kar 79 % (166 od 209). Največja incidenčna stopnja oslovskega kašlja se seli iz ene regije v drugo: v letu 2015 je bila najvišja obolevnost na Gorenjskem

Tabela 1. Prijavljeni primeri in incidenčne stopnje oslovskega kašlja, Slovenija 2006–2015 *(10)*.

Leto	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Število prijavljenih primerov	551	708	181	442	611	284	178	169	399	68
Število primerov/ 100.000 preb.	27,5	35,4	9,0	21,6	29,8	13,8	8,7	8,2	19,4	3,3



Slika 1. Starostno specifične incidenčne stopnje oslovskega kašlja, Slovenija, 2011–2015 *(10)*.

(7,4/100.000 prebivalcev), v 2014 na Koroškem (136/100.000), v 2013 v novomeški regiji (52/100.000), v 2012 v goriški regiji (30/100.000) in v 2011 v mariborski regiji (33/100.000 prebivalcev). Zadnja smrt zaradi oslovskega kašlja je bila zabeležena v letu 2004 pri dojenčku, mlajšem od dveh mesecev *(10)*.

V Sloveniji zabeležimo 1–4 izbruhe oslovskega kašlja letno. Zanimiv je bil izbruh letos poleti na Gorenjskem, kjer je za oslovskim kašljem zbolel pediater, ki je bil njegov prenašalec *(11)*. Tekom izbruha so dokazali, da je od 221 izpostavljenih oseb, od tega 64 tesnih kontaktov, poleg pediatra zbolelo še sedem oseb. Primeri so bili med seboj povezani, kar so epidemiologi ugotovili z anketiranjem in iskanjem kontaktov, zato so jih dodali pod obravnavani izbruh. V literaturi poročajo, da se izbruhi oslovskega kašlja kljub veliki precepljenosti prebivalstva nadaljujejo v neonatalnih enotah. Ti izbruhi so pogosto povezani z zdravstvenimi delavci. Za zgodnjo prepoznavo in posledično izolacijo obolelih pacientov kot zdravstvenih delavcev je potrebna visoka stopnja pozornosti ne glede na cepilni status *(12)*.

V letu 2014 je 29 držav iz območja Evropske unije (EU) in Evropskega gospodarskega prostora (angl. *European Economic Area*, EAA) poročalo na ECDC preko Evropskega sistema spremljanja (angl. *The European Surveillance System*). Takrat je bila prijavljena incidenčna stopnja oslovskega kašlja v evropskem prostoru 9,1 na 100.000 prebivalcev. Največja je bila v starostni skupini mlajših od enega leta (51,6/100.000), sledijo mladi 10–14 let (24,4/100.000) in 15–19 let (19,7/100.000). Državam priporočajo ponoven pregled strategij cepljenja, da bi zagotovile zaščito dojenčkov; možni pristopi so cepljenje nosečnic ali poživitvena cepljenja mladostnikov in odraslih *(4)*.

MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA OSLOVSKEGA KAŠLJA

Mikrobiološko potrjevanje oslovskega kašlja je zahtevno zaradi različne specifičnosti in občutljivosti posameznih metod. Države znotraj EU uporabljajo različne metodologije, zato si ECDC prizadeva standardizirati in izboljšati diagnostiko ter tako zagotoviti kakovost in primerljivost podatkov. V letu 2011 je ECDC začel

projekt Usklajevanje dejavnosti za laboratorijsko spremljanje oslovskega kašlja v državah članicah. Eden od glavnih ciljev tega projekta je bil pripraviti protokol za metodo dokazovanja DNA-povzročitelja z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (angl. *real-time polymerase chain reaction*, RT-PCR) in s serološko metodo za dokazovanje protiteles razreda IgG, usmerjenih proti PT, pri bolnikih s sumom na oslovski kašelj *(13,14)*.

Laboratorijska merila za dokazovanje oslovskega kašlja so: osamitev bakterije *B. pertussis* iz kliničnega vzorca, dokaz nukleinske kisline *B. pertussis* v kliničnem vzorcu in specifičen protitelesni odziv proti bakteriji *B. pertussis*. Samo ob izpolnjevanju kliničnih in laboratorijskih meril lahko opredelimo primer oslovskega kašlja kot potrjen. Če gre za bolnika, ki izpolnjuje klinična merila in je bil v stiku s potrjenim primerom oslovskega kašlja, nimamo pa laboratorijske potrditve, tak primer razvrstimo kot verjeten primer oslovskega kašlja *(3)*.

V laboratoriju Oddelka za javnozdravstveno mikrobiologijo Ljubljana (OJZ-ML) Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) smo razvili in za mikrobiološko diagnostiko oslovskega kašlja uporabljamo vse tri metode: osamitev bakterije iz kužnine, dokazovanje bakterijske DNA z metodo RT-PCR in serološko diagnostiko. Med seboj se razlikujejo po specifičnosti, občutljivosti in ustreznosti glede na to, v katerem obdobju bolezni je bil vzorec odvzet. Tako sta v prvih dveh tednih od začetka kliničnih znakov primerna kultura in RT-PCR. RT-PCR ostaja zaradi boljše občutljivosti primeren do četrtega tedna od začetkov kliničnih znakov. Od četrtega tedna naprej je najprimernejša serološka diagnostika.

Najprimernejše mesto za odvzem kužnine za namene osamitve bakterije in RT-PCR je bris ali aspirat nosno žrelnega predela, pri čemer je zelo pomembno, da je kužnina odvzeta pravilno. Nazoren prikaz pravilnega odvzema kužnine najdemo na spletu *(15)*. Za odvzem brisa so primerne konice iz dakrona ali rajona. Bombažne in alginatne konice niso primerne, saj lahko zavirajo proces RT-PCR *(16)*. Za transport priporočajo transportna gojišča (Amies z ogljem ali Regan/Lowe) in metodo osamitve bakterije ter predvsem čim hitrejši transport na sobni temperaturi v laboratorij (transport, krajši od štirih ur) *(13, 17)*.

Osamitev bakterije iz kužnine še vedno ostaja zlati standard, vendar se zaradi slabše občutljivosti (manj od 60 %), počasne rasti in občutljivosti bakterije na transport uporablja redkeje in v ospredje prihajajo molekularne metode *(18)*. Kljub temu je metoda osamitve bakterije primerna za diagnostiko v začetni fazi bolezni (prva dva tedna od začetkov kliničnih znakov) in v primeru, da bolnik še ni prejemal antibiotika, ter ob zagotavljanju pravilnega in hitrega transporta vzorca do laboratorija. Osamitev bakterije je priporočljiva tudi v primeru epidemije. *B. pertussis* je po Gramu negativen kokobacil in za rast potrebuje posebna gojišča (gojišče Bordet Gengou s cefaleksinom ali Regan/Lowe z ogljem). Bakterija raste počasi; po nekaj dnevih so pri tipični morfologiji kolonij/bakterijske kulture potrebni nadaljnji biokemični testi, mikroskopiranje in aglutinacija s specifičnimi antiserumi. Skupen čas do končnega rezultata traja sedem dni, lahko tudi več. Metoda osamitve *B. pertussis* v kulturi je podrobneje opisana v prispevku, pripravljenem za strokovno srečanje Sekcije za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe – Okužbe dihal, leta 2008 *(19)*. Čeprav zdravnika zanima predvsem rezultat testa, je za javnozdravstveno mikrobiologijo izrednega pomena pridobivanje kultur. Le tako lahko bakterijo natančneje opredelimo, po potrebi tipiziramo, potrjujemo izbruhe ter ugotavlja-

mo ustreznost cepiv na podlagi študij antigenov.

V zadnjem času je za dokaz prisotnosti *B. pertussis* v vzorcih najbolj uveljavljena metoda PCR, še posebej njena različica RT-PCR *(20)*. Metodo lahko izvaja le laboratorij, ki upošteva pogoje dobre laboratorijske prakse za molekularno diagnostiko, saj se tako izogne napakam pri interpretaciji in možnosti kontaminacije vzorca (http://www.hpa.org.uk/SMI). V primerjavi s kulturo je metoda PCR hitra (rezultat v nekaj urah), zelo občutljiva (70–99 %) in specifična (86–100 %) *(18)*. Zazna tudi mrtve bakterije v vzorcu, tako da zmanjša problem transporta in morebitne predhodne antibiotične terapije. Zaradi vseh naštetih prednosti lahko potrdimo bolezen že zelo zgodaj, tako pripomoremo k zdravljenju ter zlasti k preprečevanju prenosa bakterije na ne-imune posameznike.

Metoda PCR je primerna za diagnostiko v prvih treh tednih po nastopu prvih znakov bolezni, kasneje se količina bakterijske DNA v nosno žrelnem predelu hitro zmanjša *(21)*. Večina laboratorijev uporablja za tarčno nukleotidno zaporedje za dokaz *B. pertussis* insercijsko sekvenco IS481, ki je v genomu bakterije prisotna v velikem številu kopij. Zaporedje IS481 imata lahko tudi *B. holmesii* in *B. bronchiseptica (17)*. Zato je za potrjevanje pozitivnih rezultatov potrebno dodati za *B. pertussis* bolj specifično tarčo, najprimernejša je promotorska regija PT (ptxA-Pr) *(13, 22)*. Ker je ta tarča v bakterijskem genomu bakterije *B. pertussis* prisotna samo v eni kopiji, je zato ta PCR manj občutljiv od PCR, ki pomnožuje IS481. Ob hkratnem dokazu IS481 in ptxA-Pr, lahko zanesljivo potrdimo prisotnost *B. pertussis* v kužnini. Tarčni odsek DNA za dokazovanje *B. parapertussis* je insercijsko zaporedje IS1001, ki ga imajo lahko tudi nekateri sevi *B. bronchiseptica*. Iz praktičnih razlogov lahko pozitivno IS481 PCR štejemo kot verjetno okužbo z *B. pertussis*, ko po kliničnih znakih sumimo na oslovski kašelj. Podobno lahko pozitiven PCR na IS1001 štejemo kot verjetno okužbo z *B. parapertussis*. V primeru nepoznanih kliničnih podatkov pa pozitiven PCR na IS481 obravnavamo le kot dokaz okužbe z bakterijo iz rodu *Bordetella*. Metodologija je podrobno opisana v priporočilih ECDC *(13)*. Objavljenih je veliko protokolov z različnimi tarčnimi zaporedji DNA za dokazovanje *B. pertussis*, prav tako je za ta namen na voljo več različnih komercialnih kompletov *(17)*. Najpomembnejše je, da poznamo, katero tarčno zaporedje dokazujemo, saj bomo le tako pravilno razlagali naše rezultate.

Serološko testiranje je indicirano pri bolnikih, kjer znaki bolezni trajajo že več kot dva do tri tedne. Pri posameznikih, ki kašljajo manj od treh tednov, je priporočljiva kombinacija obeh metod: RT-PCR in serološka diagnostika. Pri starejših otrocih, mladostnikih in odraslih oslovski kašelj v večini primerov nima tipične klinične slike, temveč se bolezen pojavlja kot dolgotrajen kašelj. Serološka diagnostika ni primerna za otroke, mlajše od dveh let, in za osebe, pri katerih je od zadnjega cepljenja minilo manj kot eno leto *(23)*. Ker PT vsebujejo vsa necelična cepiva, ne moremo razlikovati med imunskim odzivom, ki je posledica okužbe, in med imunskim odzivom, ki je posledica cepljenja. Zato je pri interpretaciji seroloških rezultatov potrebno upoštevati tudi pretekla cepljenja.

Za serološko diagnostiko oslovskega kašlja najpogosteje uporabljamo encimsko imunski test, s katerim kvantitativno določimo količino specifičnih protiteles. Po priporočilih ECDC so to protitelesa razreda IgG, ki so usmerjena proti PT. V priporočilih je podana tudi potreba po poenotenju vrednosti, rezultat je potrebno podati v internacionalnih enotah (IU/ml). Kot referenčni reagent za ovrednotenje metode priporočajo uporabo standardnega seruma 1st WHO International Refe-

rence Reagent NIBSC 06/142. Protitelesa razreda IgA proti-PT določamo kvantitativno samo v primeru mejne vrednostih protiteles IgG proti-PT ter si tako pomagamo vrednotiti rezultat *(14, 23, 24)*. Na tržišču več proizvajalcev ponuja komercialne encimsko imunske diagnostične komplete za dokaz protiteles proti povzročitelju oslovskega kašlja. Pri izbiri je pomembno, da je kot antigen uporabljen samo PT, da je rezultat podan v IU/ml in da preko procesa ovrednotenja v laboratoriju preverimo ustreznost komercialnega kompleta.

Za interpretacijo seroloških rezultatov je najprimernejši parni vzorec serumov, odvzetih v razmiku 2 do 4 tednov. V primeru serokonverzije ali 100 % zvišanja ali znižanja koncentracije protiteles lahko zanesljivo potrdimo diagnozo oslovskega kašlja. Vendar dinamika protiteles pri posameznikih ni enaka in količine protiteles ne naraščajo oz. padajo vedno skladno z literaturo. Poleg tega imamo v praksi največkrat na razpolago samo en vzorec seruma. Zato so na podlagi različnih študij določili mejno količino IgG proti-PT, ki naj bi bila med 50 IU/ml in 120 IU/ml *(14, 23)*. Tako lahko že z enim serumskim vzorcem z ustrezno visoko količino protiteles IgG proti-PT potrdimo oslovski kašelj. Pri evropski serološki raziskavi, ki je bila izpeljana v letu 2016 v 25 evropskih referenčnih laboratorijih, je 18 laboratorijev uporabljalo komercialne diagnostične komplete. Raziskava je pokazala na dobre rezultate komercialnih kompletov, ki določajo samo protitelesa IgG proti-PT.

ZAKLJUČEK

Oslovski kašelj ostaja kljub visoki precepljenosti populacije endemičen z višjimi stopnjami pojavnosti na tri do pet let ter značilnim pojavljanjem izbruhov. Je bolezen, zaradi katere lahko tudi v razvitem svetu umirajo dojenčki. Najbolj učinkovit način preprečevanja oslovskega kašlja je cepljenje. V večini držav so celična cepiva zamenjali z neceličnimi. V zadnjih dvajsetih letih se je pojavnost oslovskega kašlja povečala in zasledili so premik v starejše starostne skupine, hkrati pa tudi več primerov pri nezaščitenih dojenčkih. Vzrok bi lahko bili izboljšano spremljanje in diagnostika (uvedba PCR), boljša osveščenost zdravnikov, hitrejši upad zaščitnih protiteles po cepljenju z neceličnimi cepivi in prilagoditev same bakterije. Dokazane so spremembe v bakterijskem genomu, ki nakazujejo na prilagoditev bakterije na cepivo *(23, 24)*. Tudi zmanjšanje števila antigenov v neceličnih cepivih bi lahko vplivalo na lažjo prilagoditev bakterije *(25)*. Zaradi vsega naštetega je potrebno oslovski kašelj spremljati tako epidemiološko kot laboratorijsko na nacionalnem nivoju. O prisotnosti bolezni je treba osveščati zdravnike, da ob značilni klinični sliki pomislijo na bolezen in vzamejo kužnine za mikrobiološko potrjevanje. Zgodnja diagnostika omogoča učinkovito zdravljenje, ki prepreči širjenje bakterije v populaciji in hudo bolezen pri nezaščitenih dojenčkih. Z laboratorijskega vidika je pomembno poudariti pomen standardizacije diagnostike, predvsem uporabo pravih tarčnih zaporedij pri molekularnih metodah za pravilno ovrednotenje rezultatov in možnost uporabe serološke diagnostike z določanjem protiteles razreda IgG proti PT v enem serumskem vzorcu. Pomembno je tudi ohranjanje klasične diagnostike z osamitvijo *B. pertussis* zaradi možnosti tipizacije in spremljanja bakterijske evolucije ter ugotavljanja ustreznosti cepiv.

LITERATURA

1. Kraigher A, Ihan A, Avčin T. Cepljenje in cepiva. Ljubljana: SZD, Inštitut za varovanje zdravja; 2011.
2. Wendelboe AM, Van Rie A, Salmaso S, et al. Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. Pediatr Infect Dis J. 2005; 24 (5 Suppl): S58–61.
3. NIJZ: Oslovski kašelj – algoritem ukrepanja [internet]. 2016. [citirano 2016 Oct 3]. Dosegljivo na: http://www.nijz.si/sl/oslovski-kaselj
4. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2016 – Pertussis. Stockholm: ECDC [internet]. 2016 [citirano 2016 Oct 3]. Dosegljivo na: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/Pertussis/Pages/Annual-epidemiological-report-2016.aspx in http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/pertussis/Pages/Annual-epidemiological-report-2016.aspx#sthash.MRj5AXIU.dpuf
5. NIJZ: Zdravstveni statistični letopis 2014: 4 Preventivni programi [internet]. [citirano 2016 Oct 3]. Dosegljivo na: http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/publikacije/letopisi/2014/4.1_precepljenost_2014.pdf
6. Tan T, Dalby T, Forsyth K, et al. Pertussis across the globe: recent epidemiologic trends from 2000 to 2013. Pediatr Infect Dis J. 2015; 34 (9): e222–32.
7. Heininger U, Andre P, Chlibek R, et al. Comparative epidemiologic characteristics of pertussis in 10 central and Eastern European countries, 2000–2013. PLoS One. 2016; 11 (6): e0155949.
8. European Centre for Disease Prevention and Control. Expert consultation on pertussis – Barcelona, 20 November 2012. Stockholm: ECDC; 2014.
9. Grgič-Vitek M, Klavs I, Kraigher A. Re-emergence of pertussis in Slovenia: time to change immunization policy. Vaccine. 2008; 26 (15): 1874–8.
10. NIJZ. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji. Letna poročila. [internet]. 2016 [citirano 2016 Oct 3]. Dosegljivo na: http://www.nijz.si/sl/epidemiolosko-spremljanje-nalezljivih-bolezni-letna-porocila
11. Grmek Košnik I, Orožen K, Meglič V, et al. Tudi zdravstveni delavci smo lahko prenašalci oslovskega kašlja. Enboz. 2016; 7: 4–7.
12. Maltezou HC, Ftika L, Theodoridou M. Nosocomial pertussis in neonatal units. J Hosp Infect. 2013; 85 (4): 243–8.
13. European Centre for Disease Prevention and Control. Guidance and protocol for the use of realtime PCR in laboratory diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis* or *Bordetella parapertussis*. Stockholm: ECDC; 2012.
14. European Centre for Disease Prevention and Control. Guidance and protocol for the serological diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis*. Stockholm: ECDC; 2012.
15. prelevcoqueluche-desktop.m4v [internet]. 2016 [video]; [citirano 2016 Oct 3]. [3 min 53 sec] Dosegljivo na: http://youtu.be/d6d-y7SX_dY
16. Cloud JL, Hymas W, Carroll KC. Impact of nasopharyngeal swab types on detection of *Bordetella pertussis* by PCR and culture. J Clin Microbiol. 2002; 40 (10): 3838–40.
17. He Q, Barkoff AM, Mertsola J, et al. High heterogeneity in methods used for the laboratory confirmation of pertussis diagnosis among European countries, 2010: integration of epidemiological and laboratory surveillance must include standardisation of methodologies and quality assurance. Euro Surveill. 2012; 17 (32): pii=20239.
18. Wendelboe AM, Van Rie A. Diagnosis of pertussis: a historical review and recent developments. Expert Rev Mol Diagn. 2006; 6 (6): 857–64.
19. Seme K. Oslovski kašelj: novosti v epidemiologiji, diagnostiki in preprečevanju. Med Razgl. 2008; 47 Suppl 3: 101–8.
20. Dalby T, Fry NK, Krogfelt KA, et al. Evaluation of PCR methods for the diagnosis of pertussis by the European surveillance network for vaccine-preventable diseases (EUVAC.NET). Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013; 32 (10): 1285–9.
21. CDC. Pertussis (Whooping cough). [internet]. 2015 [citirano 2016 Oct 3]. Dosegljivo na: http://www.cdc.gov/pertussis/clinical/diagnostic-testing/diagnosis-confirmation.html
22. Fry NK, Duncan J, Wagner K, et al. Role of PCR in the diagnosis of pertussis infection in infants: 5 years' experience of provision of a same-day real-time PCR service in England and Wales from 2002 to 2007. J Med Microbiol. 2009; 58: 1023–9.
23. Guiso N, Berbers G, Fry NK, et al. What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011; 30: 307–12.

24. Dalby T, Sorensen C, Pedersen JW, et al. Pertussis serology: Assessment of a quantitative IgG-anti-PT ELISA for replacement of the CHO cell assay. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand. 2010; 118: 968–72.
25. Mooi FR, Van Der Maas NA, De Melker HE. Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation - two sides of the same coin. Epidemiol Infect. 2014; 142 (4): 685–94.
26. Elomaa A, Advani A, Donnelly D, et al. Strain variation among Bordetella pertussis isolates in Finland, where the whole-cell pertussis vaccine has been used for 50 years. J Clin Microbiol. 2005; 43 (8): 3681–7.
27. van Gent M, Heuvelman CJ, van der Heide HG, et al. Analysis of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in European countries during the period 1998-2012. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015; 34 (4): 821–30.

Metka Paragi[1], Verica Mioč[2], Tamara Kastrin[3], Alenka Kraigher[4], Tjaša Žohar Čretnik[5], Slovenska skupina za meningitise

Invazivne pnevmokokne okužbe po uvedbi cepljenja s konjugiranim cepivom v nacionalni program cepljenja

Invasive Pneumococcal Diseases After the Introduction of Conjugate Vaccine in the National Immunization Program

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Streptococcus pneumoniae*, invazivne pnevmokokne okužbe, konjugirana pnevmokokna cepiva, cepljenje

IZHODIŠČA. Slovenija je bila pred uvedbo cepljenja po podatkih Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni ena od držav z najvišjo incidenco invazivnih pnevmokoknih okužb z naraščanjem incidence pri odraslih. Hkrati smo beležili visoko stopnjo odpornosti proti makrolidom pri otrocih. Z uvedbo neobveznega cepljenja po podatkih iz literature pričakujemo zmanjšanje incidence teh obolenj, zmanjšanje odpornosti proti antibiotikom in zmanjšanje nosilstva v populaciji. METODE. V okviru nacionalnega spremljanja invazivnih obolenj, povzročenih s *Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis* in *Streptococcus pneumoniae,* v Sloveniji na Oddelku za javno zdravstveno mikrobiologijo Ljubljana Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano od leta 1993 zbiramo invazivne izolate pnevmokokov. Od leta 1993 do septembra 2016 smo tako prejeli 4.032 izolatov. Vsem smo potrdili identifikacijo, določili občutljivost za antibiotike, jih tipizirali in zamrznili na –70 °C. V prispevku smo primerjali dve obdobji: obdobje pred uvedbo konjugiranega pnevmokoknega cepiva v nacionalno cepilno shemo (do leta 2014) in obdobje po uvedbi 10-valentnega cepiva (leto 2015 do septembra 2016). REZULTATI. Incidenca invazivnih pnevmokoknih okužb v letu 2014 je bila 26,2/100.000 otrok, v letu 2015 pa 15,6/100.000 (ob 48,8 % precepljenosti), kar je še vedno v mejah incidence zadnjih opazovanih let in o vplivu cepljenja še ne moremo govoriti. Zaskrbljujoča je situacija pri odraslih, ki kaže največjo incidenco do sedaj ravno v letu 2015, in sicer kar 16,1/100.000 odraslih. ZAKLJUČKI. Ker je cepljenje neobvezno,

[1] Dr. Metka Paragi, univ. dipl. biol., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Grabovičeva ulica 44, 1000 Ljubljana; metka.paragi@nlzoh.si

[2] Verica Mioč, univ. dipl. mikrobiol., Oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo Ljubljana, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Grabovičeva ulica 44, 1000 Ljubljana

[3] Dr. Tamara Kastrin, univ. dipl. mikrobiol., Oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo Ljubljana, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Grabovičeva ulica 44, 1000 Ljubljana

[4] Izr. prof. dr. Alenka Kraigher, dr. med., Center za nalezljive bolezni, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Trubarjeva ulica 2, 1000 Ljubljana

[5] Asist. mag. Tjaša Žohar Čretnik, dr. med., Oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo Ljubljana, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Grabovičeva ulica 44, 1000 Ljubljana

bo za jasno vidne rezultate potrebno počakati. Za hitrejše zmanjšanje javnozdravstvene problematike pnevmokoknih okužb v tem času bi bilo potrebno boljše osveščanje javnosti o pomenu cepljenja otrok, kakor tudi cepljenja odraslih s 13-valentnim konjugiranim cepivom.

ABSTRACT

KEY WORDS: *Streptococcus pneumoniae*, invasive pneumococcal diseases, conjugate pneumococcal vaccines, vaccination

BACKGROUNDS. According to the European Centre for Disease Prevention and Control, Slovenia was one of the countries with the highest incidence of invasive pneumococcal diseases before the introduction of vaccination. At the same time we had a high degree of macrolide resistance in children and an increasing incidence of pneumococcal invasive diseases in adults. With the introduction of the optional pneumococcal vaccination, according to the data from the literature, a decrease of incidence, reduction of the level of antibiotic resistance and carriage should be expected. METHODS. Within the National suirveillance of invasive diseases caused by *Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae* in Slovenia, at the Department for Public Health Microbiology Ljubljana of the National Laboratory of Health, Environment and Food, we have been collecting pneumococcal isolates since 1993. Until September 2016, we have received in total 4,032 pneumococcal isolates. All isolates were identified, tested for antibiotic resistance, typed and frozen at -70 °C. In this paper, we compared two periods: the period before the introduction of pneumococcal conjugate vaccine in national vaccination scheme (until 2014) and the period after the introduction of the vaccine (2015 to September 2016). RESULTS. The incidence of invasive pneumococcal diseases was 26.2/100,000 children in 2014 and 15.6/100,000 in 2015 (at 48.8% immunization coverage), which is still within the recent observed incidences, so the impact of vaccination can not be detected yet. Worrying is the situation in adults, showing the higher incidence in 2015, 16.1/100,000 adults. CONCLUSIONS. Considering that the vaccination is optional, more time is needed for the relevant results of vaccine impact. In the mean time, a greater promotion of childhood vaccination as well as of adult vaccination with 13-valent conjugate vaccine needs to be done for a faster reduction of pneumococcal diseases.

IZHODIŠČA

Bakterija *Streptococcus pneumoniae* predstavlja glede na pogostost in resnost okužb velik javnozdravstveni problem tako pri nas, v Evropi, kot tudi v svetu. Je najpogostejši bakterijski povzročitelj neinvazivnih okužb zgornjih in spodnjih dihal in hkrati najpogostejši povzročitelj invazivnih okužb, ki imajo izvor v dihalih pri nas, zlasti po uvedbi cepljenja proti *Haemophilus influenzae* b (Hib). Smrtnost pri odraslih bolnikih s pljučnico, ki jo spremlja bakteriemija in z meningitisom, je v Sloveniji med 20–30 %, pri otrocih pa je nižja *(1)*. Velik problem pri zdravljenju pnevmokoknih okužb predstavlja vse večji delež proti enemu ali več antibiotikom odpornih izolatov. Pojav pnevmokokov, odpornih proti penicilinu in drugim betalaktamskim antibiotikom, je privedel

do povečane rabe makrolidov, fluorokinolonov in drugih nebetalaktamskih antibiotikov, kar je imelo za posledico pojav odpornosti tudi proti tem antibiotikom. Poseben problem so tudi večkratno odporni izolati, ki se pojavljajo vedno pogosteje *(2)*.

Od vseh bakterijskih okužb, ki jih lahko preprečimo s cepljenjem, imajo pnevmokokne največjo smrtnost *(3)*. Tako je cepljenje pridobilo na pomenu pri obvladovanju teh okužb, zlasti z uvedbo pnevmokoknih konjugiranih cepiv *(4–6)*. Številne države po uvedbi cepljenja poročajo o občutno znižani incidenci invazivnih pnevmokoknih okužb, zlasti pri otrocih pod 2 leti *(7–9)*. Enako poročajo o zniževanju nosilstva v cepljeni populaciji otrok, kar je ena od prednosti konjugiranih cepiv *(10, 11)*. Beležijo tudi zmanjšano število hospitalizacij zaradi pnevmokoknih pljučnic kakor tudi nižjo incidenco akutnega vnetja srednjega ušesa *(12, 13)*. Glede na nižjo incidenco serotipov, ki so v cepivih in ki so hkrati tudi najpogosteje nosilci odpornosti, poročajo po uvedbi cepljenja tudi o zmanjšanju le-te *(14, 15)*.

Z letom 2015 smo s Programom cepljenja v Sloveniji za vse otroke, rojene po 1. 10. 2014, uvedli neobvezno cepljenje proti pnevmokoknim okužbam s konjugiranim 10-valentnim cepivom. Ker na Oddelku za javnozdravstveno mikrobiologijo Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) spremljanje invazivnih pnevmokoknih okužb poteka že od leta 1993, smo pripravili pregled pomembnih epidemioloških in mikrobioloških podatkov pred in po uvedbi cepljenja *(4)*.

METODE

V okviru nacionalnega spremljanja invazivnih obolenj, povzročenih s *H. influenzae, Neisseria meningitidis* in *S. pneumoniae*, v Sloveniji na Oddelku za javno zdravstveno mikrobiologijo Ljubljana NLZOH, okolje in hrano že od leta 1993 zbiramo izolate pnevmokokov. S spremljanjem smo začeli pri otrocih (< 15 let) in ga nato 1996 leta razširili še na odrasle. Izolate prejemamo iz osmih oddelkov Centra za medicinsko mikrobiologijo NLZOH (Maribor, Celje, Kranj, Novo mesto, Nova Gorica, Murska Sobota, Koper), Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, Splošnih bolnišnic Nova Gorica, Slovenj Gradec in Golnik. Od leta 1993 do septembra 2016 smo tako prejeli 4.032 izolatov. Vsem smo potrdili identifikacijo, določili občutljivost za antibiotike, jih tipizirali in zamrznili na –70 °C. Serotip pnevmokokov smo določili z reakcijo nabrekanja kapsule ali Neufeld Quellung-ovo reakcijo z monoklonskimi protitelesi proizvajalca Statens Serum Institut, Danska. V prispevku smo zajeli in primerjali dve obdobji: obdobje pred uvedbo konjugiranega pnevmokoknega cepiva v nacionalno cepilno shemo (do leta 2014) in obdobje po uvedbi cepiva (leto 2015 do septembra 2016).

Občutljivost za antibiotike smo testirali z metodo difuzije v agarju z diski in z določanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) z E-testi (Biomérieux). Podatke smo interpretirali v skladu s standardi CLSI (angl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*), po letu 2014 pa v skladu s standardi EUCAST (angl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). V prispevku smo zajeli podatke o odpornosti izolatov od leta 2005 do 2015.

Vzroke za odpornost proti makrolidom smo na molekularnem nivoju določili 158 izolatom pnevmokokov, odpornim proti eritromicinu, ki so bili izolirani v letih 2010–2012. Z metodo verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) smo dokazovali prisotnost genov *erm*(B), *erm*(TR), *mef*(A) in *mef*(E) *(16, 17)*.

Z metodo gelske elektroforeze v pulzirajočem polju (angl. *pulsed-field gel elec-*

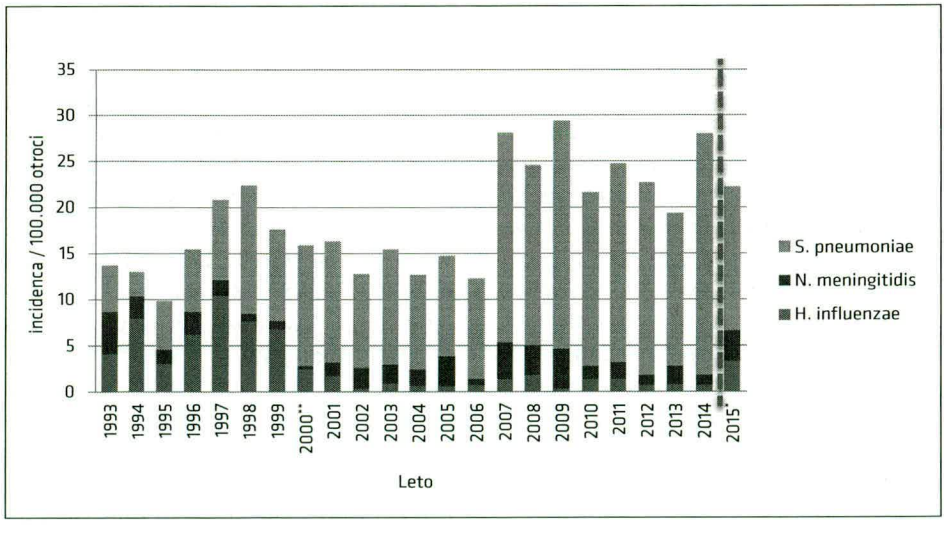
trophoresis, PFGE) smo tipizirali 71 izolatov pnevmokokov, pri katerih smo dokazali prisotnost gena *mef*(A). Restrikcijo smo izvedli z restrikcijskim encimom *Sma*I, elektroforezo na aparatu Gene Path@System na programu 12 s pogoji elektroforeze: 6 V/cm, naraščajoč pulzni čas od 1–17 s, trajanje 18,5 ur. Rezultate smo analizirali s programom Bionumerics (Applied-Maths, Saint-Martens-Latem, Belgium) in izrisali UPGMA dendrograme s koeficientom Dice (optimizacija 1 %, toleranca 1,5 %). Skupine sorodnih izolatov na podlagi restrikcijskih vzorcev (pulzotipov) smo opredelili kot izolate z ≥ 80 % sorodnostjo.

REZULTATI

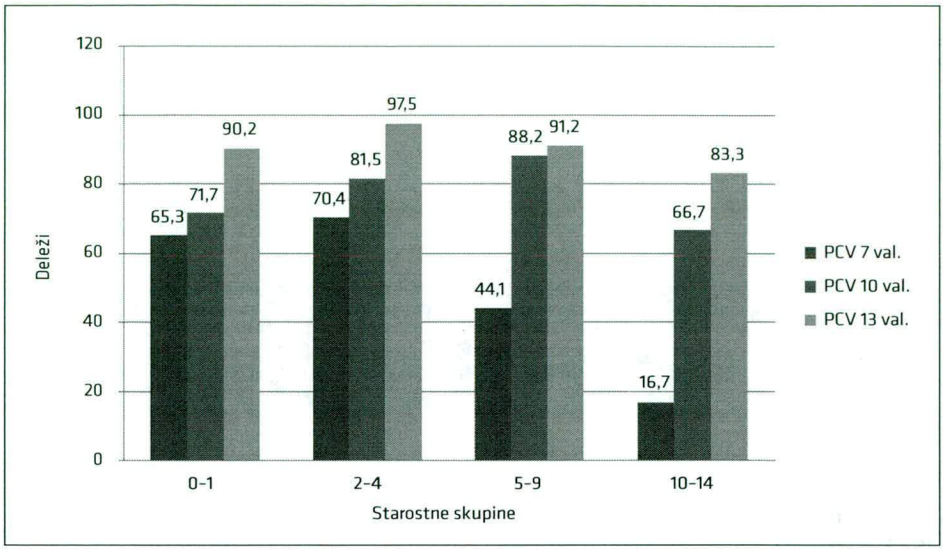
Pregled incidence invazivnih obolenj otrok po letih kaže (slika 1), da se je po vpeljavi cepljenja proti Hib incidenca invazivnih pnevmokoknih obolenj povečala in dosegla vrhove v letih 2009 (24,8/100.000 otrok) in 2014 (26,2/100.000 otrok). V letu 2015 je bilo uvedeno neobvezno cepljenje otrok s konjugiranim 10-valentnim cepivom (angl. *pneumococcal conjugate vaccine*, PCV 10), ki se je po takratni epidemiološki situaciji ujemalo z 71,7 % krožečih serotipov invazivnih izolatov otrok pod dvemi leti, za razliko od 13-valentnega (PCV 13), ki se je takrat ujemalo z 90,2 % teh izolatov (slika 2).

Leto po uvedbi cepljenja s konjugiranim pnevmokoknim cepivom še ne beležimo večjega padca teh invazivnih obolenj v letu 2015 (slika 1). Enako incidenca invazivnih obolenj otrok pod dvemi leti v letu 2015 ne kaže padca (slika 3).

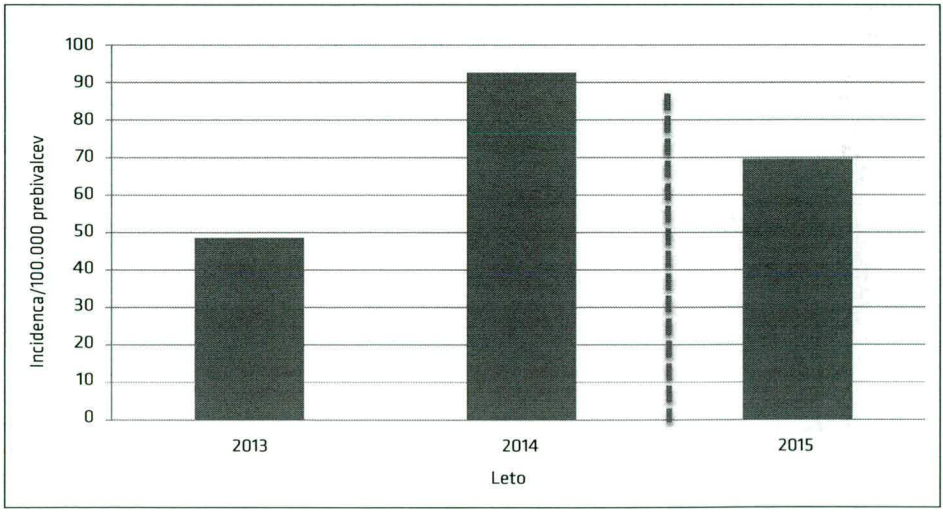
Pri odraslih pnevmokokna invazivna obolenja prevladujejo glede na ostala dva povzročitelja v vseh opazovanih letih (slika 4). Incidenca narašča. Največjo incidenco v vseh opazovanih letih so dosegla v letu 2015 (16,1/100.000 odraslih).



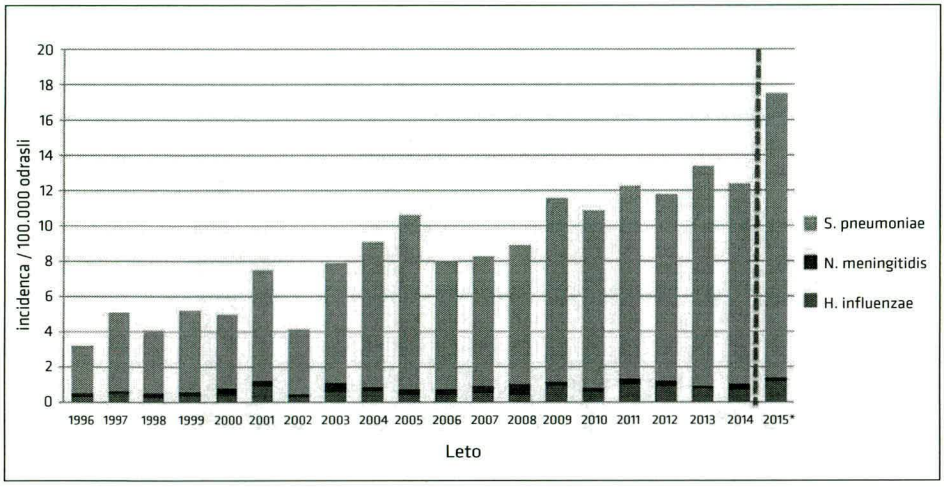
Slika 1. Kumulativna incidenca invazivnih obolenj, povzročenih z bakterijami *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, pri otrocih (0–14 let) od leta 1993 do 2015 v Sloveniji. * – uvedba neobveznega 10-valentnega konjugiranega pnevmokoknega cepiva v nacionalni program cepljenja,** – uvedba cepljenja proti *Haemophilus influenzae* b.



Slika 2. Odstotek ujemanja krožečih serotipov invazivnih pnevmokokov pri otrocih, po starostnih skupinah, z zaščitnimi serotipi v 7-, 10- in 13-valentnem konjugiranem cepivu v Sloveniji (2010–2014). PCV – konjugirano pnevmokokno cepivo (angl. *pneumococcal conjugate vaccine*).

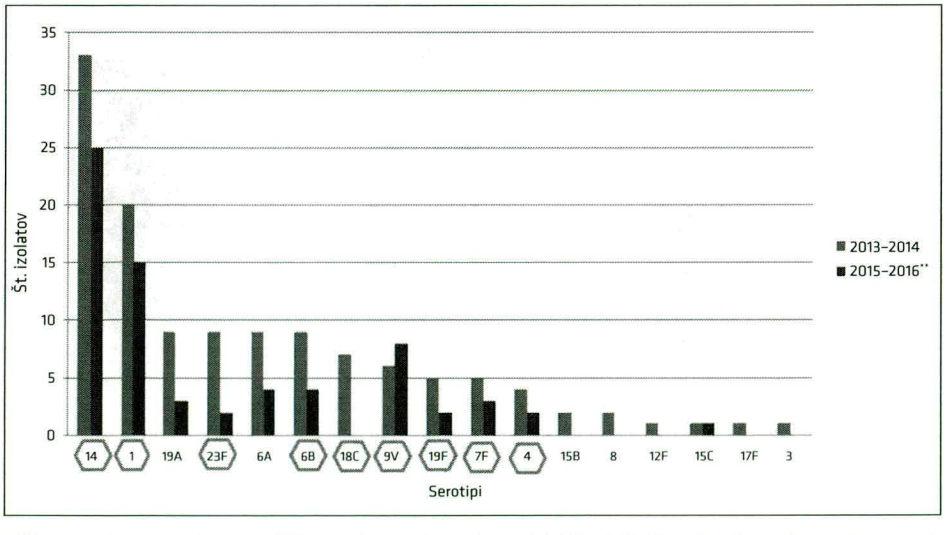


Slika 3. Incidenca invazivnih obolenj povzročenih z bakterijo *Streptococcus pneumoniae* pri otrocih, mlajših od dveh let, od leta 2013 do 2015 v Sloveniji.



Slika 4. Kumulativna incidenca invazivnih obolenj povzročenih z bakterijami *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* pri odraslih od leta 1996 do 2015 v Sloveniji.

Frekvenca najpogostejših serotipov pred in po uvedbi cepljenja (slika 5) kaže, da cepilnega serotipa 18C po uvedbi cepljenja zaenkrat ne zasledimo, ravno tako opazimo več kot 50 % padec prisotnosti cepilnih serotipov 23F in 6B, kar pa še ni moč pripisati vplivu cepljenja zaradi prekratkega opazovanega obdobja po cepljenju.



Slika 5. Frekvenca najpogostejših serotipov pri otrocih v obdobju 2013–2014 (pred uvedbo cepiva v nacionalno cepilno shemo) in v obdobju 2015–2016 (po uvedbi cepljenja). ⬡ – serotipi zajeti v 10-valentnem konjugiranem cepivu (PCV 10), ** – do konca septembra 2016.

Tabela 1. Deleži odpornosti (odporni in vmesno odporni) invazivnih izolatov pnevmokokov pri otrocih po letih v Sloveniji.

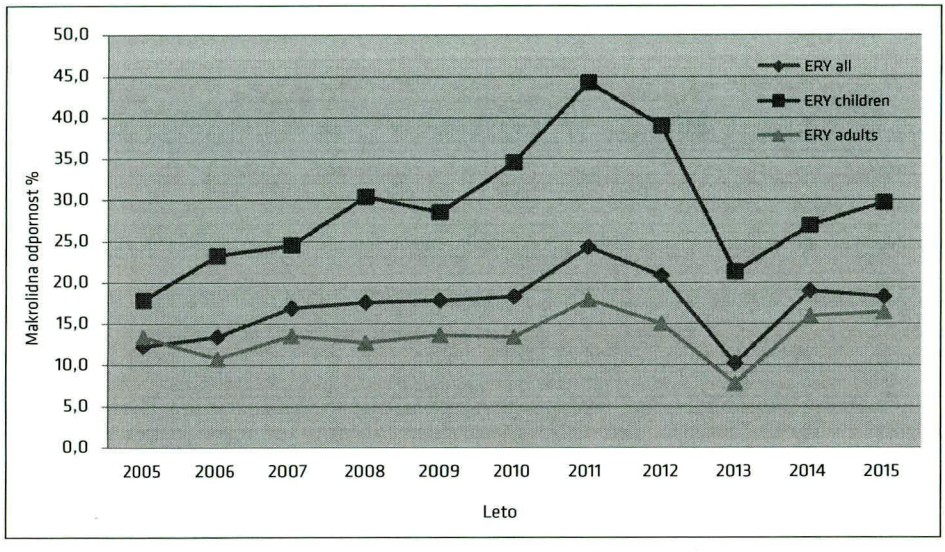
Otroci		Penicilin		Cefotaksim		Cefuroksim		Eritromicin	
Leto	Število	S (%)	I+R (%)	S (%)	I+R (%)	S (%)	I+R (%)	S (%)	I+R (%)
2005	**39**	79,5	20,5	94,9	5,1	87,2	12,8	82,1	17,9
2006	**31**	56,7	43,3	93,3	6,7	76,7	23,3	76,7	23,3
2007	**65**	70,8	29,2	96,9	3,1	86,2	13,8	75,4	24,6
2008	**59**	67,8	32,2	83,1	16,9	81,4	18,6	69,5	30,5
2009	**70**	85,7	14,3	94,3	5,7	90,0	10,0	71,4	28,6
2010	**52**	80,0	20,0	92,3	7,7	90,2	9,8	65,4	34,6
2011	**61**	82,0	18,0	91,8	8,2	90,2	9,8	55,7	44,3
2012	**59**	89,8	10,2	93,2	6,8	93,2	6,8	61,0	39,0
2013	**47**	91,5	8,5	95,7	4,3	93,6	6,4	78,7	21,3
2014	**74**	83,8	16,2	97,3	2,7	91,9	8,1	73	27
2015[a]	**47**	87,2	12,8	97,9	2,1	93,6	6,4	70,2	29,8

[a] EUCAST standard (angl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

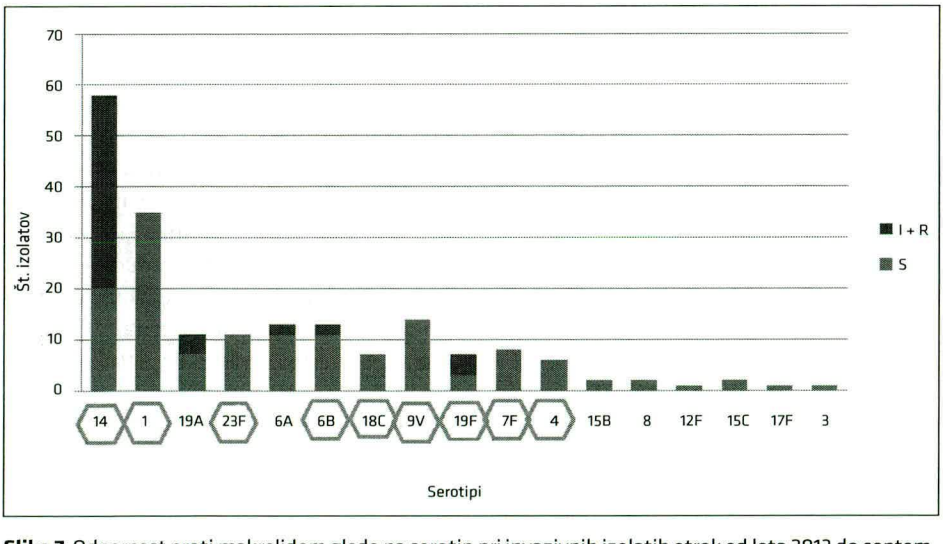
V tabeli 1 je prikazana občutljivost na antibiotike invazivnih izolatov pnevmokokov pri otrocih v obdobju od leta 2005 do leta 2015.

V opazovanem obdobju se je izkazala odpornost na antibiotike problematična zlasti pri otrocih, saj je bila v letu 2011 odpornost proti eritromicinu kar 44,3 % (tabela 1, slika 6). Zato smo v letih 2010–2012, ko je bila najvišja (slika 6), pri 158 izolatih odraslih in otrok z metodo PCR molekularno opredelili prisotnost genov, odgovornih za odpornost proti makrolidom: *erm*(B), *erm*(TR), *mef*(A) in *mef*(E). Pri 71 izolatih smo dokazali prisotnost gena *mef*(A), pri 61 izolatih gen *erm*(B), pri 18 izolatih gen *mef*(E). Prisotnost gena *erm*(TR) nismo dokazali pri nobenem izolatu, pri 8 izolatih nismo našli nobenega izmed teh genov.

Z metodo PFGE smo tem 71 *mef*(A) izolatom določili stopnjo sorodnosti v primerjavi z mednarodnimi kloni (Pneumococcal Molecular Epidemiology Network). Od tega je bilo 63 (88,7 %) med seboj genetsko sorodnih in hkrati sorodnih z mednarodnim klonom England[14]-9 serotipa 14, ki je najpogostejši pri otrocih (slika 5). Poleg serotipa 14 so bili med najpogostejšimi nosilci odpornosti še serotipi 19A, 19F, 6A in 6B (slika 7).



Slika 6. Deleži odpornosti invazivnih izolatov pnevmokokov proti makrolidom pri otrocih (ERY children) in odraslih (ERY adults) po letih v Sloveniji.



Slika 7. Odpornost proti makrolidom glede na serotip pri invazivnih izolatih otrok od leta 2013 do septembra 2016 v Sloveniji. ⬡ – serotipi zajeti v 10-valentnem konjugiranem cepivu (PCV 10), I+R – intermediarno odporni in odporni, S – občutljivi.

RAZPRAVA

Glede na evropske podatke zbrane pri Evropskem centru za preprečevanje in obvladovanje bolezni je bila Slovenija pred uvedbo cepljenja ena od držav z najvišjo incidenco invazivnih pnevmokoknih obolenj, saj so številne druge evropske države že pred nami uvedle cepljenje v nacionalne programe *(18, 19)*. Prav tako smo beležili zelo visoke odstotke odpornosti zlasti

proti makrolidom pri otrocih *(2, 20, 24)*. V letu 2013 smo celo beležili prvi pojav epidemije pljučnic, povzročene s serotipom 6A, pri odraslih v DSO *(21)*. Incidenca pri odraslih je v vsem opazovanem času nakazovala trend naraščanja (slika 4) *(24)*. Vpeljava konjugiranega cepiva je bila zato pomemben javnozdravstveni ukrep, ki bo pomagal obvladovati pnevmokokne okužbe ob primerni precepljenosti *(22)*. Precepljenost proti pnevmokoknim okužbam pomeni delež otrok, ki so bili do 12. meseca starosti cepljeni z dvema odmerkoma cepiva. Precepljenost proti pnevmokokom je v Sloveniji v letu 2015 znašala 48,8 % (najnižja v mariborski – 34,9 % in celjski – 38,2 % zdravstveni regiji ter najvišja v kranjski – 64,6 % in ljubljanski – 54,7 % zdravstveni regiji; podatki NIJZ).

Incidenca invazivnih pnevmokoknih okužb v letu 2014 je bila 26,2/100.000 otrok, v letu 2015 pa 15,6/100.000 (ob 48,8 % precepljenosti), kar je še vedno v mejah incidence v zadnjih opazovanih letih (npr. leta 2013 je bila 16,6/100.000) in o učinku cepljenja še ne moremo govoriti. V primerjavi z uvedbo obveznega cepljenja proti Hib v letu 2000 vidimo, da je takrat incidenca v enem letu padla s 6,8 na 2,5/100.000 otrok (ob 97,7 % precepljenosti), kar je bila takrat najnižja opazovana incidenca v vseh letih (slika 1). Te razlike v padcu incidence po enem letu po uvedbi cepljenja pripisujemo manjši precepljenosti s pnevmokoknim cepivom, ker je cepljenje za razliko od cepljenja proti Hib neobvezno.

Zaskrbljujoča je situacija pri odraslih, ki kaže največjo incidenco do sedaj ravno v letu 2015 (slika 4), in sicer kar 16,1/100.000 odraslih. Torej bi morali resno razmisliti o večjih možnostih uporabe 13-valentenga konjugiranega cepiva za odrasle (PCV 13), saj bo cepljenje otrok vplivalo na zmanjšanje incidence pri odraslih kasneje, kot se je sprva morda zdelo *(23)*.

Zastopanost serotipov, ki so v cepivu in med krožečimi, bo potrebno še nadalje spremljati, da bomo lahko govorili o zmanjšanih incidencah cepilnih in o možnih »nadomestnih necepilnih« serotipih s statistično gotovostjo.

Problem odpornosti proti makrolidom pri otrocih je posledica večje rabe tega antibiotika *(20, 25, 26)*. Za tako visoko stopnjo odpornosti proti eritromicinu v letih 2010 do 2012 v Sloveniji je bila odgovorna tudi razširitev skupine sorodnih izolatov seroskupine 14, sorodnih angleškemu klonu England^{14}-9. Z osveščanjem strokovne in laične javnosti o smotrni rabi antibiotikov se odpornost proti makrolidom pri otrocih od leta 2011 zmanjšuje (tabela 1). Dodatno pa lahko pričakujemo zmanjšanje deleža odpornosti tudi po vpeljavi cepljenja za otroke, saj so cepilni serotipi v glavnem tudi nosilci odpornosti (slika 5, slika 7) *(27, 28)*. Pomemben je tudi vpliv konjugiranih cepiv na nosilstvo, saj ta cepiva za razliko od ostalih zmanjšujejo nosilstvo v precepljeni populaciji in s tem širjenje najpogostejših serotipov, ki vplivajo na incidenco invazivnih obolenj *(29)*.

ZAKLJUČEK

Slovenija je bila pred uvedbo cepljenja po podatkih Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni ena od držav z najvišjo incidenco invazivnih pnevmokoknih okužb z naraščanjem incidence pri odraslih. Hkrati smo beležili visoko stopnjo odpornosti proti makrolidom pri otrocih. Z uvedbo neobveznega cepljenja po podatkih iz literature pričakujemo zmanjšanje incidence teh obolenj, zmanjšanje odpornosti proti antibiotikom in zmanjšanje nosilstva v populaciji.

Ker je cepljenje neobvezno, bo za jasno vidne rezultate potrebno počakati. Za hitrejše zmanjšanje javnozdravstvene problematike pnevmokoknih obolenj v tem času bi bilo potrebno boljše osveščanje javnosti o pomenu cepljenja otrok (prece-

pljenost je le 48,8 %), kakor tudi cepljenja odraslih s 13-valentnim konjugiranim cepivom. Za nadaljnje javnozdravstvene ukrepe je enako potreben laboratorijski nadzor nad serotipi zaradi možnosti povečanja incidence necepilnih serotipov in možnosti razširjanja mednarodnih klonov kot nosilcev odpornosti.

LITERATURA

1. Čižman M, Paragi M, Gubina M, et al. Epidemiologija invazivnih pnevmokoknih okužb v Sloveniji, 1997–1998. Zdrav Vestn. 2000; 69: 587–92.
2. Paragi M, Čižman M, Kastrin T, et al. Občutljivost pnevmokokov za antibiotike v Sloveniji in pristop k zdravljenju. In: Beović B, Strle F, Tomažič J, eds. Problemi protimikrobne odpornosti v Sloveniji: ali znamo odgovoriti?. Nalezljive izpuščajne bolezni. Ljubljana: Sekcija za protimikrobno zdravljenje, SZD; 2011. p. 11–20.
3. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, et al. Burden of disease caused by *Streptococccus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. Lancet. 2009; 374 (9693): 893–902.
4. De Carvalho Gomes H, Muscat M, Monnet DL, et al. Use of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) in Europe, 2001-2007. Euro Surveill. 2009; 14 (12): 1–6.
5. Paragi M, Kastrin T, Mioč V, et al. Epidemiologic situation (from 2004 to 2008) and origins for the introduction of PCV in childhood vaccination program in Slovenia. In: 7th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases: book of abstracts. 2010 March 14–18; Tel Aviv, Israel. [S. l.: s. n.]; 2010. p. 110–11.
6. Yeh SH, Gurtman A, Hurley DC, et. al. Immunogenicity and safety of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in infants and toddlers. Pediatrics. 2010; 126 (3): e493–505.
7. Waight PA, Andrews NJ, Ladhani SN, et al. Effect of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on invasive pneumococcal disease in England and Wales 4 years after its introduction: an observational cohort study. Lancet Infect Dis. 2015; 15 (5): 535–43.
8. Moore CE, Paul J, Foster D, et al. Reduction of invasive pneumococcal disease 3 years after the introduction of the 13-valent conjugate vaccine in the Oxfordshire region of England. J Infect Dis. 2014; 210 (7): 1001–11.
9. Lepoutre A, Varon E, Georges S, et al. Impact of the pneumococcal conjugate vaccines on invasive pneumococcal disease in France, 2001-2012. Vaccine. 2015; 33 (2): 359–66.
10. Valente C, Hinds J, Gould KA, et al. Impact of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on *Streptococcus pneumoniae* multiple serotype carriage. Vaccine. 2016; 34 (34): 4072–8.
11. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of pneumococcal conjugate vaccines. Replacement of WHO Technical Report Series, No. 927, Annex 2. WHO Technical Report Series. 2009.
12. Baldo V, Cocchio S, Gallo T, et al. Impact of pneumococcal conjugate vaccination: a retrospective study of hospitalization for pneumonia in North-East Italy. J Prev Med Hyg. 2016; 57 (2): E61–8.
13. Littorin N, Ahl J, Uddén F, et al. Reduction of *Streptococcus pneumoniae* in upper respiratory tract cultures and a decreased incidence of related acute otitis media following introduction of childhood pneumococcal conjugate vaccines in a Swedish county. BMC Infect Dis. 2016; 16 (1): 407.
14. Imöhl M, Reinert RR, van der Linden M. Antibiotic susceptibility rates of invasive pneumococci before and after the introduction of pneumococcal conjugate vaccination in Germany. Int J Med Microbiol. 2015; 305 (7): 776–83.
15. Picazo JJ. Management of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infections and the use of pneumococcal conjugate vaccines. Clin Microbiol Infect. 2009; 15 (Suppl 3): 4–6.
16. Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, et. al. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40 (11): 2562–6.
17. Del Grosso M, Iannelli F, Messina C, et al. Macrolide efflux genes *mef*(A) and *mef*(E) are carried by different genetic elements in *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol. 2002; 40 (3): 774–8.
18. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2014 – Vaccine-preventable diseases – invasive bacterial diseases. Stockholm: ECDC; 2015.
19. Paragi M. Pnevmokokne okužbe in njihova razširjenost v Evropi in Sloveniji. In: Strokovno posvetovanje zdravnikov in medicinskih sester, ki izvajajo cepljenje v zdravstveni regiji Novo mesto; 2013 Oct 16; Novo mesto, Slovenija. [S. l.: s. n.]; 2013.

20. Kastrin T, Paragi M, Kolman J, et al. Increase of the serotype 14 and m-phenotype among macrolide resistant invasive pneumococci in Slovenia, 2000-2008. In: 7th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases: book of abstracts. 2010 March 14–18; Tel Aviv, Israel. [S. l.: s. n.]; 2010. p. 87–8.
21. Prebil K, Beović B, Paragi M, et al. First report of an outbreak of pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 6A. Wien Klin Wochenschr. 2016; 128 (1–2): 68–70.
22. Pravilnik o določitvi Programa cepljenja in zaščite z zdravili za leto 2016. Uradni list RS št. 35/2016.
23. Paragi M, Čižman M, Kastrin T, et al. Možnosti uporabe pnevmokoknih cepiv pri odraslih. In: Kraigher A, Skaza A, eds. Javno zdravje - priložnost za spreminjajočo se družbo: zbornik izvlečkov, 5. slovenski kongres preventivne medicine. 2012 Nov 15.–17.; Portorož, Slovenija. Ljubljana: Sekcija za preventivno medicino Slovenskega zdravniškega društva; 2013. p. 55.
24. Paragi M. Epidemiološka situacija invazivnih pnevmokoknih okužb v Sloveniji in Evropi. In: Strokovni posvet – Prve izkušnje ob uvedbi pnevmokoknega cepljenja za otroke. 2015 May 22; Ljubljana, Slovenia. [S. l.: s. n.]; 2015.
25. Čižman M, Vrečar V, Starašinič N, et al. Regional variation in antibiotic use in children in Slovenia. J Pediatric Infect Dis. 2014; 9 (3): 139–45.
26. Čižman M., Nacionalna komisija za smiselno porabo antibiotikov v Sloveniji. Poraba antibiotikov v slovenskih bolnišnicah v letu 2011. ISIS. 2012; 11: 64–6.
27. Jokinen J, Rinta-Kokko H, Siira L, et al. Impact of ten-valent pneumococcal conjugate vaccination on invasive pneumococcal disease in Finnish children--a population-based study. PloS One. 2015; 10 (3): e0120290.
28. Van der Linden M, Falkenhorst G, Perniciaro S, et al. Effects of Infant Pneumococcal Conjugate Vaccination on Serotype Distribution in Invasive Pneumococcal Disease among Children and Adults in Germany. PLoS One. 2015; 10 (7): e0131494.
29. Mameli C, Fabiano V, Daprai L, et al. A longitudinal study of Streptococcus pneumoniae carriage in healthy children in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine era. Hum Vaccin Immunother. 2015; 11 (4): 811–7.

Maja Gošnjak[1], Andrej Rojnik[2], Alenka Štorman[3], Darja Keše[4]

Legionele iz vzorcev okolja v povezavi z okužbami pri ljudeh

Legionella from Environmental Samples in Relation to Human Infections

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Legionella* spp., vzorci okolja, klinični vzorci, metode ugotavljanja legionel

IZHODIŠČA. Legionele so zelo razširjene v vodnem okolju in lahko povzročijo hude okužbe pri ljudeh, dovzetnih za okužbo. Skoraj polovica vseh znanih vrst legionel lahko povzroča okužbe pri ljudeh, med njimi je v Evropi in Severni Ameriki najpogostejša *Legionella pneumophila* serološke skupine 1. METODE. Za uspešen in neizpodbiten dokaz izvora okužbe je potrebno legionele osamiti iz vzorca dihal pri bolniku in iz vzorca bolnikovega okolja ter nato s tipizacijo ugotoviti ujemanje izolatov. Le na ta način lahko potrdimo izvor okužbe in ustrezno ukrepamo v smislu preprečevanja novih okužb. REZULTATI. V primeru izvedene raziskave smo v obdobju od 2012 do 2015 opravili 6.322 preiskav na legionele v vzorcih pitnih in kopalnih vod in 4.880 preiskav kliničnih vzorcev. V istem obdobju smo od 77 na legionelo pozitivnih bolnikov (antigen v urinu in/ali verižna reakcija s polimerazo) prejeli 25 vzorcev sputuma (32 %); od tega smo iz 15 (60 %) vzorcev po metodi kultivacije osamili legionele. ZAKLJUČKI. Povezavo med izolati vzorcev okolja in bolniki je pogosto težko dokazati. V naši raziskavi smo jo uspeli dokazati v treh primerih.

ABSTRACT

KEY WORDS: *Legionella* spp., environmental samples, clinical samples, Legionella detection methods

BACKGROUNDS. Legionella is wide spread in water environment and can cause serious human infections in susceptible hosts. Nearly half of known *Legionella* species cause infections in humans, among those *Legionella pneumophila* serogroup 1 is most common in Europe and North America. METHODS. For a successful and definite proof of the source of *Legionella* infection it is necessary to cultivate the bacteria from

[1] Mag. Maja Gošnjak, dr. vet. med., Oddelek za mikrobiološke preiskave živil, vod in drugih vzorcev okolja Celje, Center za mikrobiološke preiskave živil, vod in drugih vzorcev okolja, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Gregorčičeva ulica 5, 3000 Celje; maja.gosnjak@nlzoh.si

[2] Andrej Rojnik, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Celje, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Gregorčičeva ulica 5, 3000 Celje; andrej.rojnik@nlzoh.si

[3] Alenka Štorman, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Celje, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Gregorčičeva ulica 5, 3000 Celje; alenka.storman@nlzoh.si

[4] Doc. dr. Darja Keše, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; darja.kese@mf.uni-lj.si

patient's respiratory tract sample and from environmental sample and confirm matching with typing tools. This is the only available way to confirm the source of infection and take appropriate infection control measures. RESULTS. In our study performed between 2012 and 2015, we tested 6,322 environmental samples and 4,880 human samples for *Legionella* spp. In the same period, we had 77 *Legionella* positive samples (urine antigen and/or polymerase chain reaction). From the positive patients, we received 25 (32%) sputum samples for cultivation out of which 15 were *Legionella* positive (60%). CONCLUSIONS. The source of infection is often hard to confirm. In our study matching between patient's samples and environmental samples was confirmed with typing methods in three cases.

UVOD

Izbruh hude pljučnice med udeleženci zborovanja ameriških legionarjev v Filadelfiji leta 1976 je vodil v odkritje novega rodu bakterij, *Legionella* species *(1)*. Legionele so v naravi, kjer je njihov glavni rezervoar voda, redkeje vlažna zemlja, precej razširjene, vendar so naravna okolja le redko povezana z okužbo, legionelozo, saj pogoji v naravi večinoma niso ustrezni za intenzivno rast in razmnoževanje teh bakterij *(2)*. Iz naravnega okolja legionele preidejo v umetne vodne sisteme, kjer se v ugodnih pogojih namnožijo. Najugodnejše razmere so v toplovodnih sistemih, ohlajevalnih sistemih in termalnih kopališčih, kjer so prisotni tudi drugi faktorji, ki pospešujejo rast in razmnoževanje legionel, kot so zastajanje vode v sistemih, prisotnost železa in organskih ostankov v vodi, poškodbe cevi in posledično nastanek biofilmov *(3, 4)*.

Skoraj polovica do sedaj znanih vrst je povezana z legionelozami, čeprav je daleč najpogostejši povzročitelj v Evropi in Severni Ameriki *Legionella pneumophila* serološke skupine 1 (*L. p.* sg. 1) *(5)*.

Vzorci okolja, v katerih iščemo legionele, so poleg vzorcev vode še brisi površin, usedline in sluzne obloge *(6, 7)*. Zlati standard je metoda kultivacije legionel iz vzorcev okolja *(3)*. Legionele za rast *in vitro* zahtevajo posebne pogoje, kot je prisotnost železovih soli in aminokislin (L-cistein), zato so za metode kultivacije potrebna posebna selektivna gojišča *(2, 8)*. Vzorci se po obdelavi s toploto in kislino nasadijo in inkubirajo pri 35–37 °C *(7)*. Prednosti metode so, da z veliko občutljivostjo zazna večino vrst legionel, da je števna in da pri pozitivnem izidu dobimo material (kulturo) za nadaljnje preiskave. Pomanjkljivosti metode so, da je počasna (3–10 dni) in zaznava samo žive bakterije, laboratorijsko osebje pa mora biti za izvedbo metode in interpretacijo rezultatov ustrezno usposobljeno. Zaradi navedenih omejitev metod kultivacije se tudi za ugotavljanje legionel v vzorcih okolja razvijajo molekularne metode, katerih poglavitna prednost je hiter rezultat (v nekaj urah); metoda pomnoževanja z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (angl. *real-time polymerase chain reaction, real-time* PCR) zazna DNA legionel, vendar ne loči med mrtvimi in živimi bakterijami *(6, 9)*. Za vzorce okolja, kjer je v nizkem številu legionela pogosto prisotna, prisotnost DNA legionel ni dovolj uporaben podatek. Razvili so tudi števne PCR-metode vendar interpretacija rezultata ostaja izziv *(9, 10)*.

Tudi pri kliničnih vzorcih je zlati standard kultivacija legionel. Izolirane seve lahko tipiziramo in jih med seboj primerjamo. S primerjavo izolatov iz kliničnih vzorcev in iz vzorcev okolja lahko ugotovimo izvor okužbe, okužbo lahko spremljamo in načrtujemo preventivne ukre-

pe za preprečevanje nadaljnjih okužb *(11, 12)*. V zadnjem času je daleč najpogosteje uporabljena metoda dokaz topnega antigena (Ag) v urinu, v Evropi in ZDA se uporabi v 70–80 % primerov *(2, 11)*. Uporabnost seroloških testov za ugotavljanje specifičnih protiteles je omejena zaradi časa, ki je potreben za imunski odgovor, zato v akutni fazi legioneloze ti testi niso uporabni *(13)*. Z metodo pomnoževanja nukleinskih kislin dokazujemo legionelno DNA predvsem v vzorcih spodnjih dihal in v brisu nazofarinksa *(9)*.

METODE

V Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) na Oddelku za mikrobiologijo živil, vod in vzorcev okolja (OMA) ter Oddelku za medicinsko mikrobiologijo (OMM) Celje smo izvedli retrospektivno raziskavo rezultatov vzorcev vod in kliničnih vzorcev na prisotnost legionel. Vse preiskave so bile opravljene v okviru rednega dela.

V prvem delu raziskave smo zajeli vzorce pitnih in kopalnih vod v štiri letnem obdobju (1. 1. 2012–31. 12. 2015), ki smo jih analizirali po metodi ISO 11731 oziroma ISO 11731-2 *(7, 14)*. Primerjali smo delež pozitivnih vzorcev v posameznem letu ter delež pozitivnih vzorcev iz različnih vrst lokacij (zdravstvene ustanove, domovi upokojencev in varstveni zavodi, turistični objekti, šole, vrtci in športni objekti ter ostalo). Vzorce smo glede na število najdenih legionel razporedili v štiri razrede: 1–100 (CFU/l), 101–1.000 (CFU/l), 1001–10.000 (CFU/l) ter > 10.000 CFU/l. Primerjali smo tudi vrste legionel in serološke skupine pri vrsti *L. pneumophila* (*L. p.* sg. 1 in *L. p.* sg. 2–15).

V drugem delu raziskave smo analizirali rezultate preiskav kliničnih vzorcev na legionelo, prejetih v obdobju od 1. 1. 2012 do 30. 9. 2016, pri katerih smo izvedli vsaj eno izmed diagnostičnih metod: dokaz topnega Ag v urinu (Alere BinaxNow Legionella Urinary Antigen Card, Scarborough, ZDA), molekularne metode za dokaz legionelne DNA (Seeplex PneumoBacter ACE Detection, Seegene Inc., Seul, Koreja in Argene Legio pneumo/Cc r-gene, bioMerieux SA, Mary l'Etoile, Francija), izvedene skladno z navodili proizvajalca, kultivacijo iz vzorcev spodnjih dihal po metodi, opisani v *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, v kombinaciji z metodo ISO 11731 *(7, 15)*. Vse izolate, sumljive za legionelo, smo identificirali z metodo MALDI-TOF MS (angl. *matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*; Bruker, Billerica, ZDA) in z aglutinacijskim testom Legionella Latex Rapid Test Kit (Mascia Brunelli S.p.A., Milano, Italija).

V tretjem delu smo naredili pregled kliničnih vzorcev v povezavi z vzorci okolja, pridobljenimi v namen ugotovitve vira okužbe. V primeru pozitivnega testa Ag v urinu ali pozitivnega testa PCR na legionelo smo rezultat takoj sporočili naročniku ter se dogovorili za odvzem vzorca spodnjih dihal za izolacijo bakterije. Hkrati smo pozitiven rezultat sporočili tudi na Nacionalni inštitut za javno zdravje, ki je v nekaterih primerih ukrepal z odvzemom vzorcev okolja v povezavi z bolnikom. V ta namen dobljeni vzorci okolja so bili izključno vzorci vod, ki smo jih nato preiskali po metodi ISO 11731 *(7)*.

V primeru, ko smo dobili kulturo legionel iz vzorca bolnika ter kulture legionel iz vzorcev okolja v povezavi s tem bolnikom, smo jih poslali na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, kjer so uporabili tipizacijske metode za potrjevanje vira okužbe.

Tabela 1. Število preiskovanih vzorcev vod na legionelo in delež pozitivnih v obdobju 2012–2015.

	PITNE VODE		KOPALNE VODE	
	preiskovani vzorci	delež (%) pozitivnih	preiskovani vzorci	delež (%) pozitivnih
2012	1.707	36	153	20
2013	1.982	36	146	21
2014	902	29	128	13
2015	1.160	31	144	9

REZULTATI

Raziskava vzorcev pitnih in kopalnih vod

V štiri letnem obdobju smo opravili 6.322 preiskav na legionele v vzorcih pitnih in kopalnih vod. Delež pozitivnih vzorcev za celotno obdobje je bil 32 %: pri vzorcih pitnih vod 34 % in pri kopalnih vodah 16 % (tabela 1).

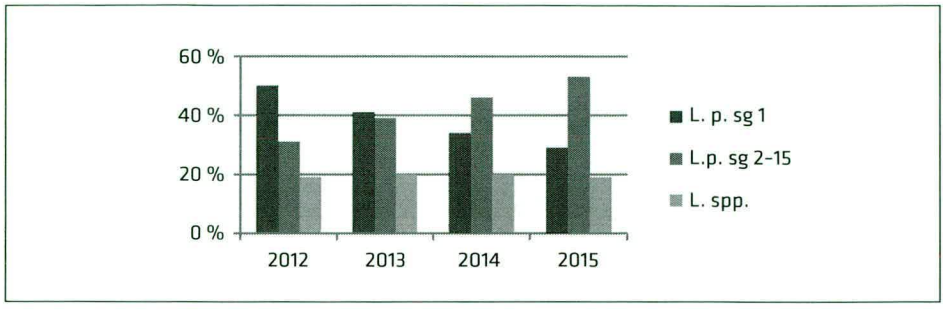
Delež pozitivnih vzorcev v opazovanem štiriletnem obdobju je bil v zdravstvenih ustanovah ter domovih upokojencev in varstvenih zavodih 42 %, v šolah, vrtcih in športnih objektih 29 %, v turističnih objektih 26 %. Deleži pozitivnih vzorcev po letih po posameznih vrstah lokacij so prikazani v tabeli 2.

Legionelo smo osamili v 2.267 od 6.322 vzorcev pitnih in kopalnih vod. *Legionella pneumophila* je predstavljala 80 % izolatov legionel (*L. p.* sg. 1 40 %; *L. p.* sg. 2–15 40 %), 20 % izolatov je pripadalo drugim vrstam legionel (*L.* spp.), kjer je bila najpogostejša *L. anisa* (37 %), sledijo *L. cherrii* (8 %), *L. rubrilucens* (5 %) ter v manj kot 5 % izolatov še *L. sainthelensis, L. erythra, L. gormanii, L. bozemanii, L. jamestowniensis, L. feeleii* in *L. santicrucis*. Razmerja med deleži *L. p.* sg. 1 in 2–15 ter *Legionella* spp. po letih so prikazana na sliki 1.

Dovoljene oz. priporočene zgornje meje koncentracije legionel v vodovodnih omrežjih se razlikujejo v različnih evropskih državah *(3)*. V Sloveniji velja priporočilo, da so v domovih upokojencev in bolnišnicah dovoljene koncentracije do 100 CFU/l, na oddelkih z bolniki z večjim tveganjem za okužbo (onkološki oddelki, oddelki za transplantacije, oddelki intenzivne nege) pa celo brez legionel *(16)*. V ostalih vodovodnih omrežjih je ta kriterij višji (nizko tveganje pri 1.000–10.000 CFU/l, srednje 10.000–100.000 CFU/l ter visoko nad 100.000 CFU/l) *(17)*. Rezultate na legionelo pozitivnih vzorcev okolja iz obdobja 2012–2015 smo razporedili glede na koncentracijo legionel v štiri razrede. V razredu 1–100 (CFU/l) je bilo

Tabela 2. Deleži pozitivnih vzorcev pitnih in kopalnih vod, preiskovanih na legionelo, po letih in posameznih vrstah lokacij.

	DELEŽ POZITIVNIH VZORCEV (%)			
VRSTA LOKACIJE/LETO	**2012**	**2013**	**2014**	**2015**
Zdravstvene ustanove	42	42	45	35
Turizem (terme, hoteli, gostišča ...)	32	28	23	24
Domovi upokojencev, varstveni zavodi ...	49	47	35	36
Šole, vrtci, športni objekti	40	29	19	18



Slika 1. Deleži *Leginonella pneumophila* serološke skupine 1, *Legionella. pneumophila* serološke skupine 2–15 in *Legionella* spp. v vzorcih pitnih in kopalnih vod pozitivnih na legionele (2012–2015).

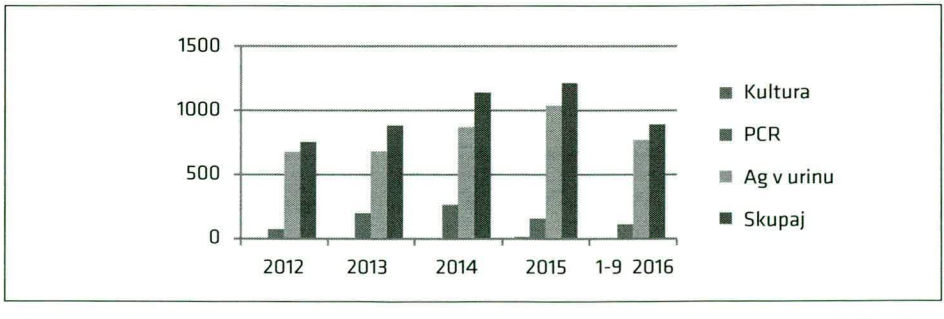
45 % vseh pozitivnih vzorcev, v razredu 101–1000 (CFU/l) 29 %, v razredu 1.001–10.000 (CFU/l) 19 % ter v razredu > 10.000 CFU/l 7 %.

Raziskava kliničnih vzorcev

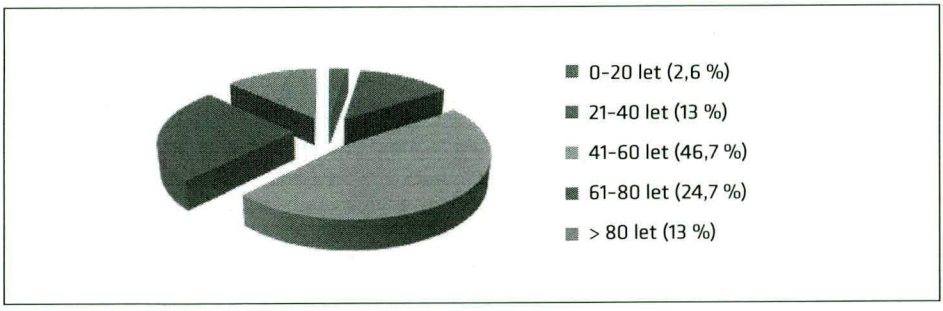
V opazovanem obdobju (januar 2012–september 2016) smo od skupno 4.880 preiskav kliničnih vzorcev na legionelo opravili 4.038 (82,7 %) preiskav za dokaz Ag v urinu, 815 (16,7 %) preiskav po metodah PCR in 27 (0,6 %) preiskav z metodo kultivacije (kultura). Število preiskav se je povečalo s 755 v letu 2012 na 1214 v letu 2015 (slika 2), medtem ko je število bolnikov z vsaj enim pozitivnim rezultatom nihalo, in sicer 21 v 2012, 11 v letu 2013, 12 v letu 2014 in 45 v letu 2015.

Z metodo dokazovanja Ag v urinu je bil rezultat pozitiven v 1,81 % (73/4.038 preiskav), z metodo PCR v 1,9 % (16/815) in s kultivacijo 60 % (15/27). Med 77 bolniki z najmanj enim pozitivnim testom je bilo 56 moških in 21 žensk, razmerje med spoloma je bilo 2,6:1 v prid moškim. Bolnike smo razdelili tudi v pet starostnih skupin, kot je prikazano na sliki 6. Največ bolnikov je bilo v skupini 41–60 let (46,7 %), v skupinah nad 60 let 37,7 %, v skupinah pod 40 let pa 25,6 % bolnikov.

Od 77 na legionelo pozitivnih bolnikov (Ag v urinu in/ali PCR) smo prejeli 25 vzorcev sputuma (32 %) na kultivacijo; iz 15 (60 %) vzorcev smo osamili legionele. V letu 2015, ko smo dosledno v vseh primerih pozitivnega rezultata testa na legionelo zaprosili naročnika za vzorec za kultivacijo, smo od 45 pozitivnih bolnikov prejeli 18 vzorcev sputuma



Slika 2. Število preiskav na legionelo v kliničnih vzorcih v obdobju januar 2012–september 2016. PCR – verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*), Ag – antigen.



Slika 3. Delež bolnikov z najmanj eno pozitivno preiskavo na legionelo glede na starost

(40 %); od tega smo legionele osamili iz 12 (60 %) vzorcev.

Rezultati ugotavljanja vira okužbe

V tabeli 4 so zbrani rezultati tipizacije kultur legionel, ki smo jih osamili iz vzorcev bolnikov in/ali vzorcev okolja v povezavi z bolniki. Lokacije 1, 2 in 5 smo kot vir okužbe uspeli povezati z bolniki. Pri lokacijah 3 in 4 smo tipizirali samo kulture legionel iz vzorcev okolja, vzorcev bolnikov v povezavi z okoljem nismo prejeli.

RAZPRAVA

Visok delež na legionelo pozitivnih vzorcev pitnih vod (34 %) v primerjavi z bazenskimi kopalnimi vodami (16 %) gre verjetno predvsem na račun kloriranja bazenskih kopalnih vod. Legionele so sicer slabo občutljive na dezinfekcijo s klorom, ob visokih koncentracijah pa jih vsaj delno zavre v rasti. Redno vzorčenje kopalnih vod na prisotnost legionel predpisuje Pravilnik o minimalnih higienskih zahtevah, ki jih morajo izpolnjevati kopališča

Tabela 4. Rezultati tipizacije kultur legionel, ki smo jih osamili iz vzorcev bolnikov in/ali vzorcev okolja v povezavi z bolniki. Ag – antigen, PCR – verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*), L. p. sg. 1 – *Leginonella pneumophila* serološke skupine 1.

Lokacija/ vzorci okolja	Serološka skupina	Fenotip	Genotip	Bolnik	Ag v urinu	PCR	Kultura	Serološka skupina	Fenotip	Genotip
1a	*L. p.* sg. 1	Knoxville	ST23	1	pozitiven	/	pozitivna	*L. p.* sg. 1	Knoxville	ST23
1b	*L. p.* sg. 1	Knoxville	ST23	2	pozitiven	/	pozitivna	*L. p.* sg. 1	Knoxville	ST23
1c	*L. p.* sg. 1	Knoxville	ST23							
2a	*L. p.* sg. 1	Oxford	ST1	1	pozitiven	/	pozitivna	*L. p.* sg. 1	Oxford	ST1
2b	*L. p.* sg. 1	Oxford	ST1							
3	*L. p.* sg. 1	Portland	ST1362	/						
4a	*L. p.* sg. 1	Benidorm	/	/						
4b	*L. p.* sg. 1	Oxford	/							
5a	*L. p.* sg. 1	Benidorm	ST1299	1	pozitiven	/	pozitivna	*L. p.* sg. 1	Benidorm	ST1299
5b	*L. p.* sg. 1	Oxford	ST1							
5c	*L. p.* sg. 1	Oxford	ST1							
5d	*L. p.* sg. 1	Oxford	ST1							

in kopalna voda v bazenih *(18)*. Pri pitnih vodah se za preiskave na legionele večinoma odloči upravljalec stavbe skladno s HACCP (angl. *Hazard Analysis Critical Control Point*) načrtom ustanove ali v primeru težav.

V skupini *L. pneumophila* so bakterije *L. p.* sg. 1 in *L. p.* sg. 2–15 v letu 2012 zastopane v razmerju približno 3:2, do leta 2015 pa se to razmerje obrne v prid *L. p.* sg. 2–15 (2:3). Vzrok so številni ponovni odvzemi vzorcev odvzeti za namen preverjanja uspešnosti uvedenih ukrepov v objektih, pri katerih smo iz vzorcev okolja večinoma osamili *L. p.* sg. 1.

Najvišji ugotovljen delež pozitivnih vzorcev je bil v domovih upokojencev in varstvenih zavodih (35–49 %) ter v zdravstvenih ustanovah (35–45 %) (tabela 2). To so pogosto velike zgradbe, kjer so možni mrtvi rokavi v vodovodni napeljavi in večje število manj uporabljanih izlivk. Zaradi dolžine napeljav je pogosto neustrezen temperaturni režim (previsoka temperatura hladne vode in prenizka tople vode). Delež pozitivnih vzorcev v šolah, vrtcih in športnih objektih izstopa v letu 2012. Tudi tu so vzrok številni ponovni odvzemi vzorcev v problematičnih objektih za namen preverjanja uspešnosti uvedenih ukrepov.

Glede na priporočila kriterijev za oceno tveganja skoraj polovica pozitivnih vzorcev (45 %) spada v skupino, ko ukrepanje še ni potrebno, razen, če so to vzorci iz bolnišničnih oddelkov z bolniki z večjim tveganjem za okužbo *(16, 17)*. Ne glede na postavljene kriterije tveganja, je za ukrepanje bistvenega pomena, kdo so ciljni uporabniki vode, kako je omrežje vzdrževano ter kakšni so pogoji za nadaljnje razmnoževanje legionel (temperaturni režim, mrtvi rokavi, malo uporabljane izlivke).

V naši raziskavi je ugotovljen delež *L. pneumophila* v vzorcih vod, pozitivnih na legionelo, 80 % od tega polovica *L. p.* sg. 1, kar je primerljivo z objavljenimi podatki za Evropo, in sicer *L. pneumophila* v približno 75 %, *L. p.* sg. 1 pa v 30–56 % pozitivnih vzorcev *(19, 20)*. Iz kliničnih vzorcev so v 90–96 % izolirali *L. pneumophila* od tega v največjem deležu *L. p.* sg. 1 (88 %) *(21)*. V naši raziskavi je bila izolirana izključno *L. p.* sg. 1. Eden od razlogov je zagotovo razmeroma majhen vzorec in pa dejstvo, da smo metodo osamitve izvedli na respiratornih vzorcih bolnikov, pri katerih smo pred tem prisotnost legionel zaznali s testom dokaza antigena v urinu, ki zazna le *L. p.* sg. 1.

Eden od dokazov, da se zavedanje pomena okužb z legionelo krepi, je stalen porast števila naročenih preiskav na legionelo. Pri kliničnih vzorcih se je število povečalo s 755 v 2012 na 1.214 v letu 2015. Najpogosteje naročena preiskava ob sumu na legionelozo je dokaz Ag v urinu. Preiskava je hitra, zanesljiva in razmeroma poceni. Zavedati pa se moramo njene omejitve. Ker z njo ugotavljamo le okužbo z *L. p.* sg. 1, moramo ob negativnemu rezultatu opraviti še dodatne preiskave, s katerimi ugotavljamo tudi druge legionele.

Razmerje spolov pri bolnikih z najmanj enim pozitivnim testom na legionelo je 2,6:1 v prid moškemu spolu, kar je enako kot poroča ECDC (angl. *European Centre for Disease Prevention and Control*) za leto 2014 *(22)*. Po podatkih ECDC je največ potrjenih primerov legioneloz v starostni skupini > 80 let, v naši raziskavi pa je največ primerov v starostni skupini 40–60 let.

Zavedanje o epidemiološkem pomenu osamitve legionel se sicer krepi, kljub temu je včasih težko pridobiti vzorce za metodo kultivacije. Najboljše je, da se vzorec odvzame pred uvedbo antibiotične terapije ali največ 48 ur po uvedbi. Antibiotična terapija zmanjša število legionel, maloštevilne bakterije pa potem na gojiščih preraste saprofitna

flora *(23)*. Ker smo v letih 2012–2014 prejeli zelo malo vzorcev za kultivacijo legionel, smo v letu 2015 dosledno v vseh primerih pozitivnega rezultata testa na legionelo (45) zaprosili naročnika za vzorec, primeren za kultivacijo. Prejeli smo 18 vzorcev sputumov (40 % vseh pozitivnih vzorcev) in iz dvanajstih (60 %) vzorcev osamili legionele.

Kritična točka je tudi odvzem vzorcev okolja. Pomembna je hitra reakcija epidemiologov, ki glede na pridobljene podatke o gibanju bolnika odredijo odvzeme vzorcev okolja. Za uspešen in neizpodbiten dokaz izvora okužbe je potrebno osamiti legionele iz vzorca dihal pri bolniku in iz vzorcev bolnikovega okolja ter nato s tipizacijo ugotoviti ujemanje izolatov. Le na ta način lahko potrdimo izvor okužbe in ustrezno ukrepamo v smislu preprečevanja novih okužb. Po podatkih ECDC so v letu 2014 od 666 kultur legionel iz vzorcev okolja, odvzetih v primerih izbruhov legioneloz, uspeli povezati z bolniki 59 kultur (9 %) *(22)*. V naši raziskavi smo povezave med izolati vzorcev okolja in bolniki v povezavi s tem okoljem ugotovili v treh primerih. Izolate legionel iz vzorcev okolja lokacij 1, 2 in 5 (tabela 4) ter izolate iz vzorcev bolnikov v povezavi s temi lokacijami smo s tipizacijo povezali ter na ta način dokazali vir okužbe. Zaradi velike raznolikosti legionel v okolju večkrat dobimo iz vzorcev iste lokacije več različnih fenotipov in/ali genotipov (kot npr. na lokacijah 4 in 5, tabela 4), in je zato potrebno tipizirati večje število izoliranih legionel, da ugotovimo povezavo z bolnikom (lokacija 5 v tabeli 4) *(21)*. Kulture iz vzorcev okolja lokacij 3 in 4 smo poslali na tipizacijo, vendar vzorca bolnika za izolacijo bakterij nismo prejeli.

ZAKLJUČEK

Legionelne pljučnice so v Evropi in svetu podcenjene, kliniki redko odvzamejo kužnine na legionelo pred uvedbo antibiotika *(2)*. Tudi v našem okolju ugotavljamo, da kliniki le izjemoma pošljejo vzorce za kultivacijo legionel, čeprav je osamitev mikroorganizma nujno potrebna za epidemiološke raziskave, ugotavljanje izvora okužbe in preprečevanja nadaljnjih primerov. Metode kultivacije so premalo uporabljene v diagnostične namene tudi v primerih, ko je test na Ag v urinu negativen.

LITERATURA

1. Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, et al. Legionnaires' disease. Description of an epidemic of pneumonia. N Engl J Med. 1977; 297 (22): 1189–97.
2. Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev. 2002; 15 (3): 506–26.
3. Bartram J, Chartier Y, Lee JV, et al., eds. *Legionella* and the Prevention of Legionellosis. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2007.
4. Declerck P. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. Environ Microbiol. 2010; 12 (3): 557–66.
5. Diederen BM. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. J Infect. 2008; 56 (1): 1–12.
6. ECDC: Legionnaires' disease outbreak investigation toolbox [internet]. 2016 [citirano 2016 Sept 30]. Dosegljivo na: https://legionnaires.ecdc.europa.eu/
7. International Organization for Standardization: Water quality -- Detection and enumeration of *Legionella*. ISO 11731:1998. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 1998.

8. Muder RR, Yu VL. Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*. Clin Infect Dis. 2002; 35 (8): 990–8.
9. Mérault N, Rusniok C, Jarraud S, et al. Specific real-Time PCR for simultaneous detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in water and clinical samples. Appl Environ Microbiol. 2011; 77 (5): 1708–17.
10. Krøjgaard L, Krogfelt K, Albrechtsen HJ, et al. Detection of Legionella by quantitative-polymerase chain reaction (qPCR) for monitoring and risk assessment. BMC Microbiol. 2011; 11: 254.
11. Phin N, Parry-Ford F, Harrison T, et al. Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. Lancet Infect Dis. 2014; 14 (10): 1011–21.
12. Jarraud S, Descours G, Ginevra C, et al. Identification of legionella in clinical samples. Methods Mol Biol. 2013; 954: 27–56.
13. Luck PC. Diagnostics and Clinical Disease Treatment. In: Heuner K, Swanson M, eds. Legionella Molecular Microbiology. Norfolk: Caister Academic Press; 2008. p. 19–34.
14. International Organization for Standardization: Water quality-- detection and enumeration of *Legionella* -- Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts. ISO 11731-2:2004. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2004.
15. York MK, ed. Aerobic Bacteriology. Legionella cultures. In: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. Vol. 1. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2004. p. 3.11.4.1–9.
16. Musič D. Preprečevanje legioneloz v bolnišničnem okolju. Sterilizacija ni igra. Ljubljana: Zbornica zdravstvene in babiške nege Slovenije; 2007. p. 40–7.
17. Hojs A, Petrovič A, Furlan N. Preprečevanje legioneloz v javnih objektih. Zdrav Var. 2002; 41: 299–304.
18. Pravilnik o minimalnih higienskih zahtevah, ki jih morajo izpolnjevati kopališča in kopalna voda v bazenih. Uradni list RS št. 59/15 in 86/15 – popr.
19. Doleans A, Aurell H, Reyrolle M, et al. Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. J Clin Microbiol. 2004; 42 (1): 458–60.
20. Harrison TG, Afshar B, Doshi N, et al. Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups, monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales (2000-2008). Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009; 28 (7): 781–91.
21. Harrison TG, Doshi N, Fry NK, et al. Comparison of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* obtained in the UK over 19 years. Clin Microbiol Infect. 2007; 13 (1): 78–85.
22. European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease in Europe, 2014. Stockholm: ECDC; 2016.
23. Mentasti M, Fry NK, Afshar B, et al. Application of *Legionella pneumophila*-specific quantitative real-time PCR combined with direct amplification and sequence-based typing in the diagnosis and epidemiological investigation of Legionnaires' disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012; 31 (8): 2017–28.

Katarina Prosenc Trilar[1], Nataša Berginc[2], Maja Sočan[3]

Spremljanje gripe v Sloveniji v sezonah 2000/2001 do 2015/2016

Influenza Surveillance in Slovenia Between Seasons 2000/2001 and 2015/2016

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: spremljanje gripe, influenca A, influenca B, podtipi influence, genotipizacija

IZHODIŠČA. Globalno breme okužb z virusi gripe je precejšnje. Prepoznan je pomen pravočasnega in stalnega spremljanja. V Sloveniji poteka sistematično spremljanje gripe od leta 1999. METODE. Preučili smo zadnjih petnajst sezon in jih primerjali s sezonami v sosednjih državah in v Evropi. REZULTATI. V šestih sezonah se je razmerje med tipoma influence A in B ter podtipi v Sloveniji pomembno razlikovalo od kumulativnih evropskih podatkov. V nekaterih od teh sezon so bili slovenski virološki podatki skladni s podatki, zbranimi v sosednjih državah; razmerje med tipi in/ali podtipi influence je bilo podobno kot v Italiji, Avstriji, Hrvaški ali na Madžarskem. V treh sezonah so bile hkratne razlike v razmerjih tipov in podtipov influence. Na podlagi podatkov iz sezone 2015/16 smo primerjali genotipe virusov iz Slovenije z evropskimi. Bistvenih razlik ni bilo. ZAKLJUČKI. Potek kroženja virusov influence je bil v več kot polovici sezon lokalno specifičen in se je razlikoval od poteka v sosednjih državah.

ABSTRACT

KEY WORDS: influenza surveillance, influenza A, influenza B, influenza subtypes, genotyping

BACKGROUNDS. Influenza represents a high healthcare burden globally. The importance of timely and sustainable surveillance is well recognized. In Slovenia, systematic surveillance started in 1999. METHODS The data from the last 15 influenza seasons were analyzed and compared to the data from neighboring countries and to cumulative European data. RESULTS. In six influenza seasons, a significant difference was found in proportion of influenza A and B types and subtypes in Slovenia compared to cumulative European data. In some of the above mentioned seasons, Slovenian virological surveillance data were in accordance with data gathered in neighboring countries—the percentage of influenza types and/or subtypes was similar as in Italy, Austria, Croatia or Hungary. In three seasons, differences were observed on the type and subtype

[1] Mag. Katarina Prosenc Trilar, Laboratorij za javnozdravstveno virologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje okolje in hrano, Bohoričeva ulica 15, 1000 Ljubljana; katarina.prosenc@nlzoh.si

[2] Nataša Berginc, Laboratorij za javnozdravstveno virologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje okolje in hrano, Bohoričeva ulica 15, 1000 Ljubljana; natasa.berginc@nlzoh.si

[3] Izr. prof. dr. Maja Sočan, dr. med., Center za nalezljive bolezni, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Zaloška cesta 29, 1000 Ljubljana; maja.socan@nijz.si

level. Genotypes of influenza viruses isolated from Slovenian patients in season 2015/16 were compared to those from Europe. No major deviation has been observed on this level. CONCLUSIONS. In more than half of the analyzed seasons, the spread of influenza had local specificity and it differed from the spread in neighbouring countries.

UVOD

Gripa je akutna okužba dihal, ki se pojavlja v hladnejših mesecih leta. Sezone gripe so po začetku, obsegu, poteku in intenziteti različne. Pojav virusa influence v kratkem času poveča obolevnost v vseh starostnih skupinah, obremeni zdravstveni sistem in ne nazadnje poveča umrljivost *(1, 2)*. Potek sezone gripe je potrebno skrbno spremljati. Poglaviten cilj spremljanja je zmanjševanje bremena gripe z zagotavljanjem kvalitetne informacije splošni in strokovni javnosti, pravočasno načrtovanje intervencijskih ukrepov (npr. povečanje posteljnih kapacitet, prerazporeditev zdravstvenih delavcev) in priporočil za obravnavo bolnikov (npr. predpisovanje zaviralcev nevraminidaze).

V mednarodnem okolju je bil Program spremljanja gripe zasnovan že leta 1947, še pred ustanovitvijo Svetovne zdravstvene organizacije (SZO). Globalni podatki o gripi se zbirajo preko spletne aplikacije FluNet *(3)*. Za zbiranje podatkov o gripi v Evropski regiji sta zadolžena Evropski center za nadzor in spremljanje bolezni (angl. *European Center for Disease Control and Prevention*, ECDC) in Regionalna pisarna SZO za Evropo (WHO/Euro) *(4)*. SZO je izdala več priporočil za spremljanje gripe. V letu 2014 je objavila publikacijo *Global epidemiological surveillance standards for influenza*, ki je zasnovana na dolgoletnih izkušnjah številnih strokovnjakov *(5, 6)*. V Sloveniji smo mrežni pristop spremljanja gripe in akutnih okužb dihal uvedli leta 1999. V prispevku predstavljamo rezultate spremljanja in primerjavo z dostopnimi podatki spremljanja gripe v EU s poudarkom na državah, ki mejijo na Slovenijo.

METODE

Epidemiološki in laboratorijski del smo koordinirali ter izvajali v okviru Nacionalnega programa spremljanja gripe in drugih akutnih okužb dihal na Inštitutu za varovanje zdravja, danes razdeljenem na Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ) in Nacionalni laboratorij za zdravje okolje in hrano (NLZOH). Ocena poteka, obsega in vpliva sezone na zdravje v Sloveniji je temeljila na spremljanju števila obiskov zaradi gripi podobne bolezni (GPB) in akutnih okužb dihal (AOD) v mrežnih ambulantah osnovnega zdravstvenega varstva in analizi določenega števila kužnin zgornjih dihal v vzorčni populaciji. V mrežo je vsako leto vključenih 45 do 47 splošnih zdravnikov, družinskih zdravnikov, pediatrov in šolskih zdravnikov. Tak vzorec zajame okoli 4 % populacije v Sloveniji. Vsak teden sporočajo podatek o številu bolnikov z GPB, mikrobiološko potrjeno ali brez potrditve (MKB-10 koda J10 ali J11) in o številu bolnikov z AOD. Bolniki so razdeljeni v starostne skupine (0–3, 4–7, 8–14, 15–19, 20–64 in 65 in več). Kužnine zgornjih dihal (večinoma bris nosu in žrela, redkeje bris nosno-žrelnega prostora), ki so odvzete v okviru Nacionalnega programa spremljanja gripe in drugih akutnih okužb dihal, so poslane iz mrežnih ambulant osnovnega zdravstvenega varstva in iz dveh splošnih bolnišnic, ki sta vključeni v mrežno spremljanje, ter testirane na prisotnost virusov influence in drugih respiratornih virusov. Vzorce, odvzete v Nacionalnem programu spremljanja gripe, spremljajo poleg osnovnih podatkov o bolniku tudi dodatne informacije o kliničnih znakih.

Pri vzorcih, ki prihajajo iz bolnišnic, pa so na voljo tudi podatki o predhodnih boleznih bolnika ter o zdravljenju. Podrobnejši opis mrežnega spremljanja, nabor podatkov in pristop k vzorčenju je opisan v članku Meerhoff in sod. *(7)*.

Podatke o virusih influence, ki smo jih potrdili v Laboratoriju za javno-zdravstveno virologijo NLZOH (prej Laboratorij za virologijo, IVZ) od 2001/2002 do 2015/2016, smo pridobili iz elektronske podatkovne zbirke namenjene vodenju virooloških in kliničnih podatkov Nacionalnega programa spremljanja gripe in drugih akutnih okužb dihal. Naše ugotovitve smo primerjali z javno dostopnimi podatki virološkega spremljanja influence, ki so na voljo na spletnih straneh SZO in ECDC za sezone od 2001/02 do 2015/16 *(3, 4)*.

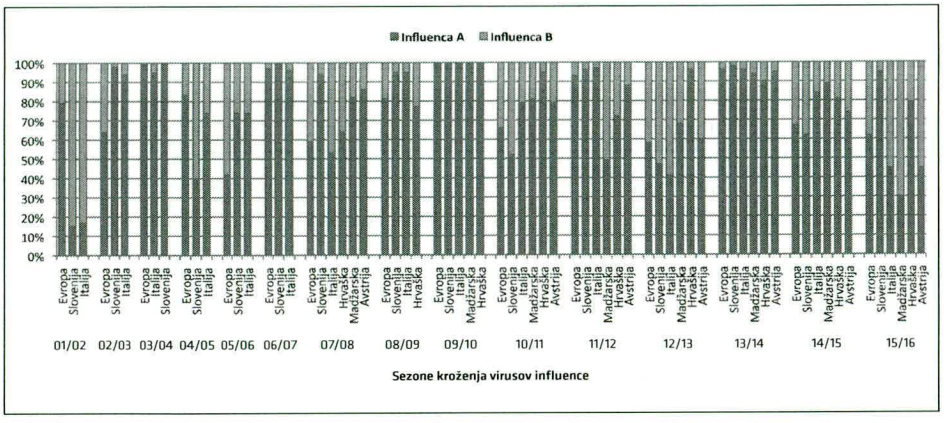
Primerjali smo razporeditev deležev virusov influence A in B v Sloveniji z deleži posameznih tipov virusov influence v sosednjih državah in s kumulativnimi deleži v Evropi. Nadalje smo primerjali še pojavljanje podtipov influence A, in sicer A(H1), ki je krožil do sezone 2008/09, podtipa A(H1)pdm 09 in podtipa A(H3). Za določanje tipov in podtipov influence smo v Sloveniji uporabili verižno reakcijo s polimerazo z reverznim prepisom. Od sezone 2007/08 smo uporabljali verižno reakcijo s polimerazo z reverznim prepisom v realnem času. Večinoma so države WHO/Europe regije uporabljale identičen pristop za detekcijo virusov influence.

Za primerjavo tipov in podtipov influence v Sloveniji, v sosednjih državah in v Evropi smo analizirali podatke petnajstih sezon. Do sezone 2006/07 so bili za primerjavo na voljo skupni evropski podatki in podatki za Italijo in Slovenijo. Od sezone 2007/08 naprej so bili na voljo skupni evropski podatki in podatki za Slovenijo in vse sosednje države, le v sezoni 2008/09 manjkajo podatki za Avstrijo in Madžarsko (slika 1, slika 2).

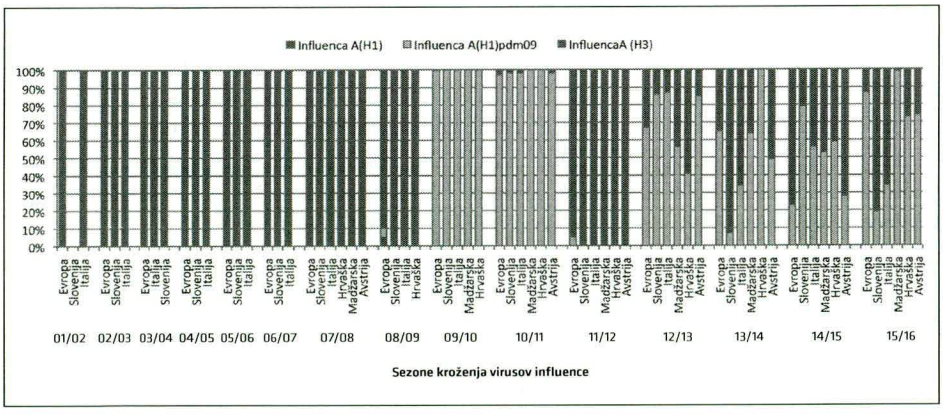
Za sezono 2015/16 smo primerjali gensko podobnost sevov influence A(H1N1) pdm09, A(H3N2) in influence B, ki so krožili v Sloveniji z referenčnimi sevi in sevi v sosednjih državah. Primerjali smo gen HA, ki nosi zapis za hemaglutinin. Gensko podobnost sevov influence A(H1N1) pdm09, A(H3N2) in influence B, ki so krožili v Sloveniji v sezoni 2015/16, smo primerjali z referenčnimi sevi in sevi, ki so bili dokazani v sosednjih državah. Sekvence referenčnih in drugih sevov smo pridobili iz baze GISAID (angl. *Global Initiative on Sharing All Influenza Data*) *(5)*. Primerjali smo gen HA, ki nosi zapis za hemaglutinin. Informacijo o genskem zapisu smo pridobili s sekveniranjem po Sangerju. Sekvence smo analizirali s programom BioEdit 7.2.5. *(9)*. Za izdelavo filogenetskih dreves smo uporabili program Mega 7 in statistični metodi največje verjetnosti *(10, 11)*.

REZULTATI

Analiza petnajstih sezon kroženja virusov influence je pokazala, da se je Slovenija v razmerju deležev influence A in B (slika 1) močno razlikovala od skupnega evropskega razmerja v šestih sezonah (2001/02, 2002/03, 2004/05, 2005/06, 2007/08 in 2015/16), vendar je bilo razmerje kar v treh od teh sezon v Sloveniji zelo podobno kot v Italiji (2001/02, 2002/02 in 2005/06) in v enem primeru podobno kot v Avstriji in na Madžarskem (2007/08). Prav tako v šestih sezonah se je Slovenija razlikovala od evropskega povprečja glede razmerja med krožečimi podtipi influence tipa A (2004/05, 2005/06, 2012/13, 2013/14, 2014/15 in 2015/16) (slika 2), od tega je bilo razmerje med podtipoma v sezoni 2012/13 podobno kot v Italiji in Avstriji. V sezonah od 2013/14 do 2015/16 je bilo razmerje med deleži podtipov A(H1)pdm09 in A(H3) sicer različno kot v Italiji, a vendar manj različno od skupnega razmerja v



Slika 1. Deleži influence tipa A in tipa B v Sloveniji, v sosednjih državah in v Evropi v petnajstih sezonah.



Slika 2. Deleži influence podtipov A(H1), A(H1)pdm09 in A(H3) v Sloveniji, v sosednjih državah in v Evropi v petnajstih sezonah.

Evropi. V treh sezonah smo opazili razlike v razmerjih tipov in podtipov influence hkrati (2004/05, 2005/06 in 2015/16). Zelo očitna je velika uniformnost sezone, ko se je pričela pandemija (2008/09), in še treh sezon za njo.

Genotipizirali smo 20 virusov A(H1N1)pdm09 iz Slovenije in vsi so se uvrstili v genotip A/South Africa/3626/2013. Vsi sekvenirani virusi so imeli v genu za hemaglutinin tudi mutacije značilne za skupino 6B.1, ki se je pojavila ob koncu sezone 2014/15 in je bila v sezoni 2015/16 prevladujoča v Evropi. Genotipi slovenskih virusov iz skupine 6B.1 so bili enaki genotipom virusov te skupine iz sosednjih držav. V Sloveniji in na Hrvaškem smo dokazali le viruse iz te skupine, medtem ko so v Italiji, Avstriji in na Madžarskem dokazali še posamezne viruse iz skupine 6B.2.

Pregledali smo sekvence genov za hemaglutinin 67 virusov A(H3N2) in vsi virusi razen enega spadajo v skupino 3C.2a, katere predstavnik je A/Hong Kong/5738/2014. Slovenski in virusi iz nekaterih drugih držav iz skupine 3C.2a imajo na genu za hemaglutinin še doda-

tne mutacije, ki jih razvrščajo v štiri podskupine. Le en virus podtipa A(H3N2) je spadal v skupino 3C.3a, katere predstavnik je A/Switzerland/9715293/2013. Tudi velika večina virusov A(H3N2) iz sosednjih držav spada v skupino 3C.2a, le v Avstriji so določili nekaj več virusov, ki spadajo v skupino 3C.3a.

Analizirali smo sekvence genov za hemaglutinin osemnajstih virusov tipa B. Vsi razen enega so bili uvrščeni v linijo Victoria. Vseh sedemnajst virusov influence B iz linije Victoria se je uvrstilo v gensko skupino 1A. Prav tako so se v to skupino uvrstili tudi vsi virusi influence B iz linije Victoria iz sosednjih držav. Edini virus influence B iz linije Yamagata spada v gensko skupino 3, katere predstavnik je B/Phuket/3073/2013. V isto skupino se uvrščajo tudi virusi influence B iz linije Yamagata iz sosednjih držav.

RAZPRAVA

Slovenija je ena manjših držav Evrope z dnevnimi delovnimi migracijami med sosednjimi državami, potovanji znotraj Evrope in izven nje, zato načeloma ni pričakovati, da bodo sezone gripe bistveno drugačne kot v sosednjih državah ali v Evropi nasploh. Kljub temu pa smo ugotovili v šestih od petnajstih sezon gripe velike razlike v razmerju deležev tipov influence A in B med Slovenijo in Evropo, v treh sezonah od teh sezon pa tudi ni bilo podobnosti s katero od sosednjih držav. V šestih sezonah smo ugotovili tudi razlike v deležih podtipov influence A.

Intenzivnost sezone in pojavnost tipov/podtipov krožečih virusov influence je med državami različna, zato je izjemno pomembno, da pridobimo kvalitetne podatke iz lokalnega okolja *(12)*. Rezultati spremljanja so v podporo izoblikovanju z dokazi podprte informacije in javno-zdravstvenih priporočil glede cepljenja. Kot primer lahko navedemo sezono 2014/15, ko sta se cepilni sev influence A(H3N2) in sev, ki je krožil v populaciji, slabo ujemala in ni bilo pričakovati učinkovitosti cepiva proti gripi za omenjeno komponento. V Evropi, kjer je bilo kar 77 % virusov tega podtipa, je slabo ujemanje precej vplivalo na celokupno učinkovitost cepljenja. Te ugotovitve nikakor nismo mogli ekstrapolirati na Slovenijo, saj je bil pri nas delež podtipa A(H3N2) le 21 %. Podoben primer je bila sezona 2015/16, ko je v Evropi z 87 % prevladoval podtip A(H1N1)pdm z gensko različico 6B.1, ki se verjetno ni najbolje ujemala s sevom virusa vključenega v cepivu, a to na stanje v Sloveniji ni bistveno vplivalo, saj smo ga zaznali le v 19 %.

Za sezono 2015/16 smo natančno preučili še genske različice virusov influence, ki so krožili pri nas in v drugih evropskih državah. Ugotovili smo, da so bili genotipi pri obeh podtipih influence A in pri influenci B enaki kot genotipi, ki so v tem času krožili po Evropi. Za sezono 2015/16 lahko rečemo, da smo ugotovili dobro ujemanje virusov influence v Sloveniji z virusi influence iz Evrope na genskem nivoju, vendar je bilo razmerje med posameznimi podtipi bistveno različno.

ZAKLJUČEK

Pomen spremljanja sezon gripe globalno in lokalno je dobro prepoznan. To smo potrdili tudi z analizo poteka petnajstih sezon v Sloveniji. Ne le, da so čim zgodnejši lokalni podatki nujni za pravočasno načrtovanje intervencijskih ukrepov in priporočil za obravnavo bolnikov, temveč ugotavljamo tudi, da je bil potek kroženja virusov influence v več kot polovici sezon lokalno specifičen in se je razlikoval celo od poteka v sosednjih državah.

LITERATURA

1. Nair H, Brooks WA, Katz M, et al. Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. Lancet. 2011; 378 (9807): 1917–30.
2. Matias G, Taylor RJ, Haguinet F, et al. Modelling estimates of age-specific influenza-related hospitalisation and mortality in the United Kingdom. BMC Public Health. 2016; 16: 481.
3. FluNet [internet]. [Citirano 2016 Okt 5] Dosegljivo na: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/flunet/en/
4. Flu News Europe [internet]. ECDC and WHO/Europe [Citirano 2016 Oct 5]. Dosegljivo na: https://flunewseurope.org/
5. WHO Regional Office for Europe. Guidance for Sentinel Influenza Surveillance in Humans [internet] Copenhagen [Citirano 2016 Oct 5]. Dosegljivo na: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0020/90443/E92738.pdf
6. World Health Organization. WHO Global Epidemiological Surveillance Standards for Influenza [internet]. WHO Press, Geneva, Swizerland; 2013 [Citirano 2016 Oct 5]. Dosegljivo na: http://www.who.int/influenza/resources/documents/WHO_Epidemiological_Influenza_Surveillance_Standards_2014.pdf
7. Meerhoff TJ, Meijer A, Paget WJ, et al. Methods for sentinel virological surveillance of influenza in Europe - an 18-country survey. Euro Surveill. 2004; 9 (1): 34–8.
8. GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data) [internet]. [Citirano 2016 Oct 5]. Dosegljivo na: http://platform.gisaid.org/epi3/frontend#5a1d06
9. BioEdit 7.2.5, Biological Sequence Alignment Aditor [internet]. [Citirano 2016 Oct 5]. Dosegljivo na: http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html
10. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol. 2016; 33 (7): 1870–4.
11. Mount D. Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis. 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2004.
12. Paget WJ, Meerhoff TJ, Rebelo de Andrade H; EISS. Heterogeneous influenza activity across Europe during the winter of 2002-2003. Euro Surveill. 2003; 8 (12): 230–9.

Tatjana Lejko Zupanc[1]

Cepljenje zdravstvenih delavcev proti gripi – miti in resnice

Influenza Vaccination of Healthcare Workers–Myths and Truths

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: gripa, cepljenje, zdravstveni delavci

Cepljenje zdravstvenih delavcev (ZD) proti gripi je še posebej pomembno, saj je poleg nevarnosti za okužbo zdravstvenega delavca v bolnišničnem okolju večja tudi nevarnost prenosa okužbe na paciente. Kljub številnim argumentom, ki govorijo v prid cepljenja ZD proti gripi, pa je precepljenost ZD proti gripi nizka. Razlogi za to so številni in marsikateri ne dovolj dobro definirani, povezani s kulturnimi posebnostmi okolja. Politike cepljenja ZD se med državami razlikujejo. Po podatkih iz let 2008/2009 in 2009/2010, kjer ni podatkov za Slovenijo, je bila precepljenost ZD v evropskih državah od 10 do preko 90 % (Romunija, Belorusija). V večini evropskih držav se je gibala med 10 in 40 %. V Sloveniji je cepljenje proti gripi za ZD priporočljivo glede na oceno tveganja na delovnem mestu, precepljenost ZD pa je pod 10 %. Brez dvoma je dokazano, da je breme gripe in delež hudih oblik in umrljivosti največji pri kronično bolnih in pri starostnikih. Podatki o tem, ali cepljenje ZD zmanjša pojavnost gripe pri bolnikih in oskrbovancih domov za ostarele, so na videz nasprotujoči. Glede na hude posledice izbruha gripe v bolnišnici ali domu za ostarele, glede na znano učinkovitost in varnost cepiva in na dokaze, da cepljenje določenega segmenta populacije lahko prepreči gripo pri necepljenih osebah, pa se večina avtorjev nagiba k mnenju, da je treba cepljenje ZD priporočiti tudi zaradi izboljšanja varnosti bolnikov in oskrbovancev. Odgovor na vprašanje, kako izboljšati precepljenost ZD, pa ni enostaven. Pri načrtovanju promocijskih kampanj je nujna angažiranost profesionalnih organizacij in vodilnih v zdravstvenih organizacijah.

ABSTRACT

KEY WORDS: influenza, vaccination, healthcare workers

Influenza vaccination of health care workers (HCW) is especially important, because in addition to the risk of infection for the healthcare worker there is also great risk of transmission of infection to patients in hospital environment. Despite many arguments that speak in favour of vaccination of HCW against influenza, there is low vaccination coverage of HCW against influenza. The reasons for this are numerous and many of them are not well defined; they are mostly associated with the cultural specificities of the

[1] Doc. dr. Tatjana Lejko Zupanc, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1000 Ljubljana; tatjana.lejko@kclj.si

environment. The policies of vaccination of HCW vary between countries. According to the data from the years 2008/2009 and 2009/2010, which do not include the data for Slovenia, vaccination coverage of HCW against influenza in European countries varied from 10 to over 90% (Romania, Belarus). In most European countries, it ranged between 10 and 40%. In Slovenia, vaccination against influenza for HCW is recommended depending on risk assessment at the workplace, nevertheless vaccination coverage of HCW is below 10%. Without a doubt, it is proven that the burden of influenza and the proportion of severe forms and mortality are highest in the chronically ill and the elderly. However, the data on whether the vaccination of HCW reduces the incidence of flu in patients and nursing home residents do not offer the same straightforward conclusion. Given the severe consequences of an outbreak of flu in a hospital or a nursing home, known efficacy and safety of vaccines, and the evidence that vaccination of a particular segment of the population can prevent the flu in unvaccinated persons, most of the authors are inclined to recommend vaccination of HCW also for improvement of patient safety and care. The answer to the question of how to improve the vaccination coverage of HCW, however, is not simple. It is important to engage professional organisations and leaders in health care organizations in the planning of promotional campaigns.

UVOD

Cepljenje proti gripi se smatra za pomemben ukrep preprečevanja obolevnosti za gripo in širjenja te bolezni. Cepljenje zdravstvenih delavcev (ZD) je še posebej pomembno, saj je poleg nevarnosti za okužbo zdravstvenega delavca v bolnišničnem okolju večja tudi nevarnost prenosa okužbe na paciente. To je še posebej neugodno za paciente s kroničnimi boleznimi in okvaro imunskega sistema. Preprečevanje zbolevanja zdravstvenega osebja je zelo pomembno tudi za delovanje zdravstvenega sistema v primeru večjih izbruhov nalezljivih bolezni, ki jih preprečujemo s cepljenjem. Kljub številnim argumentom, ki govorijo v prid cepljenja ZD proti gripi, pa je precepljenost ZD proti gripi nizka. Razlogi za to so številni in marsikateri ne dovolj dobro definirani, povezani s kulturnimi posebnostmi okolja. V prispevku bomo obravnavali precepljenost proti gripi ZD v posameznih državah, strokovne argumente, ki govorijo v prid večje precepljenosti, ter razloge ZD, da se ne odločijo za cepljenje.

PRECEPLJENOST ZDRAVSTVENIH DELAVCEV PROTI GRIPI

Politike cepljenja ZD se med državami razlikujejo. Evropska zakonodaja sicer dopušča izvajanje obveznega cepljenja proti vsem povzročiteljem na podlagi izdelanih ocen tveganja. Večinoma evropske države cepljenje urejajo s priporočili, ki se nanašajo na posamezne skupine zaposlenih. Priporočilo cepljenja je v primerjavi z obveznim cepljenjem nekoliko blažji in manj oster pristop v smeri doseganja cepljenosti ZD. Številne države in strokovne organizacije priporočajo cepljenje proti sezonski gripi vsem ZD, ki delajo neposredno z bolniki. Kljub temu je le malokateri državi uspelo doseči zaželeni cilj, in sicer 75 % precepljenost ZD. Precepljenost ZD proti gripi v sezoni 2015/16 je bila v ZDA ocenjena na 79 %, kar je podobno kot v sezoni 2014/15 (77, 3 %). Precepljenost je najvišja med zaposlenimi v bolnišnicah (91,2 %) in nižja med ZD, zaposlenimi v ambulantni dejavnosti (79,8 %) in negovalnih ustanovah (69,5 %). Najbolje so bili precepljeni zdravniki

(95,6 %). Veliko delodajalcev v ZDA zahteva obvezno cepljenje zaposlenih in v teh primerih je precepljenost najvišja (96,5 %). V okoljih, kjer cepljenje ni obvezno oz. ga zaposlenim niti ne ponudijo, pa je precepljenost bistveno nižja (44,9 %) *(1)*. Globalnih podatkov o precepljenosti ZD v Evropi ni; približno polovica držav teh podatkov nima. Po podatkih iz let 2008/2009 in 2009/2010, kjer ni podatkov za Slovenijo, je bila precepljenost ZD v evropskih državah od 10 do preko 90 % (Romunija, Belorusija). V večini evropskih držav se je gibala med 10 in 40 % *(2)*.

V Sloveniji je cepljenje proti gripi za ZD priporočljivo glede na oceno tveganja na delovnem mestu *(3)*. Slovenija je, kar se tiče precepljenosti prebivalstva proti gripi, med evropskimi državami na dnu lestvice. Nič boljše ni s precepljenostjo ZD, ki v zadnjih letih ne dosega 10 % kljub številnim kampanjam, dostopnosti in brezplačnosti cepljenja. V Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana je je bila leta 2014 precepljenost 9,4 %, leta 2015 je bila le nekoliko nad 10 % (podatki Službe za preprečevanje bolnišničnih okužb v UKC Ljubljana – SPOBO) *(4)*.

UČINKOVITOST CEPLJENJA ZDRAVSTVENIH DELAVCEV ZA PREPREČEVANJE GRIPE PRI BOLNIKIH

Pred uvedbo programa za cepljenje ZD bi bilo zaželeno, da imamo dokaze iz kliničnih raziskav, da je tak program učinkovit pri zaščiti ranljivih bolnikov in oskrbovancev ustanov za dolgotrajno oskrbo. Smiselno je vprašanje, kakšne dokaze potrebujemo, če priporočamo ali zahtevamo redno letno cepljenje ZD proti sezonski gripi kot pomoč pri preprečevanju prenosa gripe na ranljive hospitalizirane bolnike in oskrbovance ustanov za kronično nego. Za to potrebujemo podatke o tveganjih in posledicah gripe pri bolnikih, podatke o varnosti in učinkovitosti cepiva za preprečevanje gripe pri ZD ter dokaze, da s tem preprečimo okužbe pri pacientih in varovancih ustanov za kronično nego. Brez dvoma je dokazano, da je breme gripe in delež hudih oblik in umrljivosti največji pri kronično bolnih in pri starostnikih *(5, 6)*. Taki posamezniki so še posebej dovzetni za okužbo z gripo in njene zaplete, ko so hospitalizirani ali institucionalizirani. Res pa je tudi, da cepljenje zdravih odraslih ljudi prepreči okrog 60 % laboratorijsko potrjene gripe *(7)*. Čeprav nepopolna, je zaščita s cepivom vseeno dobra in varna ter se smatra kot najbolj učinkovita obstoječa strategija za preprečevanje gripe.

Podatki o tem, ali cepljenje ZD zmanjša pojavnost gripe pri bolnikih in oskrbovancih domov za ostarele, so na videz nasprotujoči. Medtem ko posamezne raziskave kažejo jasno dobrobit cepljenja zaposlenih pri zmanjšanju prenosov gripe v zdravstvenih ustanovah, pa meta-analize tega vedno ne potrjujejo. V meta-analizi štirih randomiziranih kontroliranih raziskav so Ahmed in sodelavci našeli dokaze, da cepljenje ZD zmanjša celokupno smrtnost in pogostost gripi podobne bolezni pri pacientih. Smrtnost zaradi katerihkoli vzrokov je bila nižja za 29 %. Intervencije za povečanje precepljenosti ZD so zmanjšale mortaliteto za 0,8 % do 8 %. Statistično pomembno se je znižala pogostost gripi podobnih bolezni (42 % zmanjšanje), med tem ko zmanjšanje laboratorijsko potrjene gripe ni bilo statistično pomembno *(8)*. Problemi raziskav, ki ocenjujejo zaščitni učinek cepljenja, so mnogoteri: razlike v precepljenosti med ustanovami, nezmožnost doseči velike razlike v precepljenosti, vključitev let, ko je bila incidenca gripe nizka. Pogosto manjka laboratorijska potrditev gripe ali pa se uporablja teste z izrazito nizko občutljivostjo pri starejši populaciji (npr. nekateri hitri testi). Ocena kvalitete večine raziskav je slaba, tako da je v meta-analize

vključenih le malo raziskav. Od štirih raziskav, vključenih v pričujočo meta-analizo, sta obe zgodnejši raziskavi imeli metodološke napake, ena od raziskav pa je imela premajhno razliko v precepljenosti *(9–11)*. Carman in sodelavci so sledili 50 % bolnikov s testi za dokaz gripe. Precepljenost ZD je bila 50,9 % v ustanovah, kjer so cepljenje aktivno ponudili, in 4,9 % v ustanovah brez intervencije. Celokupna mortaliteta je bila nižja v ustanovah z dobro precepljenostjo, obe skupini pa se nista razlikovali v pogostosti gripe. Zanimivo pa je, da v ustanovah z boljšo precepljenostjo niso dokazali gripe pri umrlih pacientih za razliko od ustanov, ki niso imele dobre precepljenosti (p = 0,055) *(9)*. Raziskava Haywarda in sodelavcev pa je bila metodološko močna in je dosegla pomembno razliko v precepljenosti pred intervencijo in po njej. Raziskava je trajala dve leti in vsaj ena od sezon je bila relativno huda. Vendar pa ta študija ni ocenjevala izhoda laboratorijsko potrjene gripe. Razlike v mortaliteti so bile le v času kroženja virusa gripe, izven sezone gripe je bila mortaliteta podobna v posameznih ustanovah ne glede na precepljenost ZD *(12)*. Ne glede na zaključke Ahmeda in sodelavcev je kasnejša Cochranova meta-analiza zaključila, da ni dovolj dokazov za priporočilo obveznega cepljenja ZD proti gripi, ker so iz analize izključili raziskave, ki niso upoštevale samo laboratorijsko potrjene gripe *(13)*. Zadnja posodobljena Cochranova analiza je bila objavljena pred kratkim. V tej analizi so ocenjevali vpliv cepljenja ZD na incidenco laboratorijsko dokazane gripe, pljučnice, smrti zaradi pljučnice in sprejema v bolnišnico zaradi okužbe dihal pri oskrbovancih domov za ostarele, starih 60 let in več. Tudi ta analiza je zaključila, da ni zadosti dokazov, da cepljenje ZD, zaposlenih v domovih za ostarele, pomembno vpliva na pojavnost gripe pri oskrbovancih in na sprejeme v bolnišnico *(14)*. V eni od zadnjih objavljenih raziskav so avtorji upoštevali tri glavne vidike koristi cepljenja ZD, in sicer: perspektivo varstva pri delu, perspektivo delodajalcev in perspektivo varnosti bolnikov. Raziskave kažejo stalen pozitiven učinek cepiva glede preprečevanja bolezni, delno zavajajoč učinek glede zmanjšanja absentizma in precej nasprotujoče si informacije glede varnosti bolnikov *(15)*. Indirektno (čredno) imunost proti gripi potrjuje raziskava iz Kanade, kjer so dokazali, da cepljenje 3–15 let starih otrok ni zaščitilo samo otrok, ampak je tudi zmanjšalo pojavnost gripe za 61 % pri necepljenih članih skupnosti *(16)*. Ta in podobne raziskave dejansko služijo kot pomembne dokaz indirektne zaščite, ki jo nudi cepljenje proti gripi. Pozitiven učinek na zmanjšanje bolnišnično pridobljene gripe so dokazali Frenzel in sodelavci, ki so v osmih letih po uvedbi obveznega cepljenja ZD v onkološki bolnišnici ugotavljali statistično pomembno zmanjšanje pojava gripe pri pacientih (p = 0,045), pri čemer je precepljenost ZD dosegla 94 % *(17)*.

Glede na hude posledice izbruha gripe v bolnišnici ali domu za ostarele, glede na znano učinkovitost in varnost cepiva in na dokaze, da cepljenje določenega segmenta populacije lahko prepreči gripo pri necepljenih osebah, se večina avtorjev nagiba k mnenju, da je treba cepljenje ZD priporočiti tudi zaradi izboljšanja varnosti bolnikov in oskrbovancev *(18, 19)*.

RAZLOGI ZA ODKLANJANJE CEPLJENJA

Kljub številnim raziskavam, opravljenih v različnih okoljih, glavne razloge za odklanjanje cepljenja ni tako lahko izluščiti. Starejša raziskava s pregledom literature, objavljena leta 2006, je vključila 32 člankov iz 32 raziskav. Največjo precepljenost so dosegle kampanje za cepljenje, ki so vključevale enostaven dostop do cepljenja in brezplačno cepljenje, zlas-

ti v ZDA. Vendar tudi ta vrsta kampanj ni bila vedno uspešna. Dve glavni ovir za izboljšanje precepljenosti, ki sta se ponavljali v večini raziskav, sta bili napačno dojemanja pomena gripe, tveganja in vloge ZD pri prenosu gripe, pomena in tveganja cepljenja ter nedostopnost (oz. navidezna nedostopnost cepiva) *(20)*. Zanimiva je raziskava, opravljena v Podogorici (Črna gora), kjer so bili razlogi za odklanjanje cepljenja najbolj povezani z neprepoznavanjem tveganja za okužbo z virusom gripe. V tej državi, podobno kot pri nas, obstaja močno gibanje proti cepljenju. Načrt izboljšanja precepljenosti je imel več delov, med njimi tudi izrazito vključevanje profesionalnih organizacij in vodij *(21)*. Tudi v Sloveniji smo med ZD opravili več anket, ki naj bi pojasnile razloge za odklanjanje cepljenja proti gripi med ZD *(22)*. Zadnja anketa, izvedena med zdravniki, študenti in medicinskimi sestrami, je pokazala, da ZD večinoma podcenjujejo pogostost gripe in njene nevarnosti (npr. odgovori: »ne zbolim, ker sem mlad« ali »gripa zame ni nevarna«). Veliko je tudi strokovno povsem neutemeljenih trditev (npr. »zaradi cepiva proti gripi sem zbolel z respiratorno okužbo« ipd.) Videti je, da ZD pri nas podcenjujejo socialni pomen cepljenja oz. da ta v našem kulturnem okolju nima nobene vloge pri odločitvi za cepljenje (Petra Krt, SPOBO, UKCL, neobjavljeni podatki). Kakšen pomen ima znanje, so dokazali Martinello in sodelavci, ki so dokazali, da so bili ZD, ki so pravilno odgovorili na pet osnovnih vprašanj o gripi, statistično pomembno pogosteje cepljeni kot tisti, ki so na katerokoli vprašanje odgovoril napačno ($p = 0,002$). Vendar je bila ta razlika statistično pomembna le za negovalno osebje, ne pa tudi za zdravnike, kar kaže na to, da so razlogi za necepljenje različni med posameznimi poklicnimi skupinami *(23)*.

KAKO IZBOLJŠATI PRECEPLJENOST ZD PROTI GRIPI?

Odgovor na to vprašanje ni enoznačen in je odvisen od številnih kulturnih in drugih razlik med posameznimi okolji. Eden od načinov je nedvomno cepljenje proti gripi označiti kot prosocialno dejanje. V eni od raziskav so primerjali ZD iz Južne Koreje (kolektivistično kulturno ozadje) in ZDA (individualistično kulturo ozadje). Prosocialna motiviranost za cepljenje je bila bolj verjetna v Koreji kot v ZDA. Če pa so se morali udeleženci aktivno odločati za odklonitev cepljenja, je to povečalo pogostost cepljenja v ZDA *(24)*. Percepcija učinkovitosti cepiva in stranskih učinkov so običajni dejavniki, ki vplivajo na pogostost cepljenja. Ti dejavniki lahko delujejo na osebni in družbeni ravni in vplivajo na odnos in znanje ZD. Na stopnjo precepljenosti vpliva tudi pojav drugih oblike gripe npr. aviarne influence. Med pomembnimi uporabljenimi strategijami za izboljšanje precepljenosti so bili bolj strogo izvrševanje lokalnih priporočil, objavljanje jasnih zavezujočih smernic in politika obveznega cepljenja, ki se izvaja v nekaterih regijah v Severni Ameriki. Obvezno cepljenje je sicer pripeljalo do višje precepljenosti, vendar ni brez problemov. Konvencionalni izobraževalni programi in akcije imajo le zmeren vpliv. Vlogo ima dostopnost cepiva in zgled vodilnih oz. spoštovanih sodelavcev *(25)*. Z multimedijsko kampanjo so v večji italijanski bolnišnici skušali izboljšati stopnjo precepljenosti ZD in vplivati na dojemanje cepljenja. Stopnje odziva so bile 92,6 % (464/501) pred intervencijo in 83,2 % (417/501) po intervenciji. S kampanjo za promocijo cepljenja je bilo seznanjenih 93,8 % (391/417) ZD. Internetne videospote je videlo 59,6 % (233/391) ZD. Nekateri razlogi za odklanjanje cepiva: »ni verjel v učinkovitost cepiva« (zmanjšanje od 34,7 % na 14,9 %), »ne razmišlja o gripi kot o resnem proble-

mu« (od 24 % na 12,6 %), »ne zbolijo« (od 28,7 % na 18,2 %) ali »je proti cepljenju« (od 32,7 % na 21 %) so se statistično pomembno zmanjšali po akciji. »Namera, da se cepijo v naslednjem letu« se je povečala (od 13,1 % na 36,6 %). Stopnja precepljenosti je bila nizka, vendar se je statistično pomembno povečala (od 5,6 % na 7,6 %) ($p < 0,005$) *(26)*. Sprejemanje cepljenja pri ZD je kompleksno obnašanje, zato bodo verjetno imele največ učinka akcije, ki slonijo na teorijah vedenja, vendar je malo podatkov, kako te teorije uporabiti v praksi *(27)*. Kot koristno orodje bi se lahko izkazalo orodje Svetovne zdravstvene organizacije TIP FLU (angl. *Tailoring immunization programmes for seasonal influenza*), ki na osnovi analize dejanskega stanja in problemov predlaga rešitve, namenjene specifičnemu okolju, upoštevaje kulturne in druge razlike *(21)*.

ZAKLJUČEK

Cepljenje ZD proti gripi je še vedno kontroverzna tema. Kljub splošnemu prepričanju, da cepljenje ZD varuje ranljive paciente in oskrbovance domov za ostarele, manjka kvalitetnih raziskav, ki bi to nedvomno dokazale. Razlog za to so tudi problemi tehnične narave, s katerimi se te raziskave soočajo. Vedenje, verovanja in prepričanja ZD je težko spremeniti, saj dostikrat nimajo povsem racionalne razlage. Pri načrtovanju spremembe vedenja moramo upoštevati lokalno kulturo in druge posebnosti, obvezno pa moramo vključiti profesionalne organizacije in vodstva zdravstvenih ustanov.

LITERATURA

1. Black CL, Yue X, Ball SW, et al. Influenza vaccination coverage among health care personnel - United States, 2015-16 Influenza Season. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2016; 65: 1026–31.
2. World Health Organization. Evaluation of seasonal influenza vaccination policies and coverage in the WHO European Region [internet]. 2014 [citirano 2016 Oct 13]. Dosegljivo na: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0003/241644/Evaluation-of-seasonal-influenza-vaccination-policies-and-coverage-in-the-WHO-European-Region.pdf?ua=1
3. Nacionalni inštitut za javno zdravje. Program cepljenja in zaščite z zdravili za leto 2016 [internet]. 2016 [citirano 2016 Oct 13]. Dosegljivo na: http://www.nijz.si/sl/program-cepljenja-in-zascite-z-zdravili-za-leto-2016
4. Univerzitetni Klinični center Ljubljana. Strokovno poročilo 2014. 2014. p. 217.
5. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al. Influenza-associated hospitalizations in the United States. JAMA. 2004; 292: 1333–40.
6. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the united states. JAMA. 2003; 289: 179–86.
7. Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, et al. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2012; 12: 36–44.
8. Ahmed F, Lindley MC, Allred N, e tal. Effect of influenza vaccination of healthcare personnel on morbidity and mortality among patients: systematic review and grading of evidence. Clin Infect Dis. 2014; 58: 50–7.
9. Carman WF, Elder AG, Wallace LA, et al. Effects of influenza vaccination of health-care workers on mortality of elderly people in long-term care: a randomised controlled trial. Lancet. 2000; 355: 93–7.
10. Potter J, Stott DJ, Roberts MA, et al. Influenza vaccination of health care workers in long-term-care hospitals reduces the mortality of elderly patients. J Infect Dis. 1997; 175: 1–6.
11. Lemaitre M, Meret T, Rothan-Tondeur M, et al. Effect of influenza vaccination of nursing home staff on mortality of residents: a cluster-randomized trial. J Am Geriatr Soc. 2009; 57: 1580–6.
12. Hayward AC, Harling R, Wetten S, et al. Effectiveness of an influenza vaccine programme for care home staff to prevent death, morbidity, and health service use among residents: cluster randomised controlled trial. BMJ. 2006; 333: 1241–7.

13. Thomas RE, Jefferson T, Lasserson TJ. Influenza vaccination for healthcare workers who care for people aged 60 or older living in long-term care institutions. Cochrane Database Syst Rev. 2013; 7: CD005187.
14. Thomas RE, Jefferson T, Lasserson TJ. Influenza vaccination for healthcare workers who care for people aged 60 or older living in long-term care institutions. Cochrane Database Syst Rev. 2016; 6: CD005187.
15. Kliner M, Keenan A,Sinclair D, et al. Influenza vaccination for healthcare workers in the UK: appraisal of systematic reviews and policy options. BMJ Open. 2016; 6: e012149.
16. Loeb M, Russell ML, Moss L, et al. Effect of influenza vaccination of children on infection rates in Hutterite communities: a randomized trial. JAMA. 2010; 303: 943–50.
17. Frenzel E, Chemaly RF, Ariza-Heredia E, et al. Association of increased influenza vaccination in health care workers with a reduction in nosocomial influenza infections in cancer patients. Am J Infect Control. 2016; 44:1016–21.
18. Mrvič T, Pečavar B, Petrovec M. Bolnišnične okužbe z virusom gripe. In: Petrovec M, ed. 5. Baničevi dnevi: Okužbe, povezane z zdravstvom. Med Razgl. 2013; 52 (Suppl 6): 287–91.
19. Gorišek Miksič N, Uršič T, Simonović Z, et al. Gripa pri oskrbovancih domov starejših občanov. In: Petrovec M, ed. 5. Baničevi dnevi: Okužbe, povezane z zdravstvom. Med Razgl. 2013; 52 (Suppl 6): 299–307.
20. Hofmann F, Ferracin C, Marsh G, et al. Influenza vaccination of healthcare workers: a Literature review of attitudes and beliefs. Infection. 2006; 34: 142–7.
21. World Health Organization. Tailoring Immunization Programmes for Seasonal Influenza (TIP FLU). Understanding health care workers' uptake of seasonal influenza vaccination in Montenegro: a case study for policy-makers and programme managers [internet]. 2015 [Citirano 2016 Oct 13]. Dosegljivo na: http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/influenza/publications/2015/tailoring-immunization-programmes-for-seasonal-influenza-tip-flu.-understanding-health-care-workers-uptake-of-seasonal-influenza-vaccination-in-montenegro-a-case-study-for-policy-makers-and-programme-managers
22. Mrvič T, Sočan M. Cepljenje zdravstvenih delavcev proti gripi v Sloveniji. In: Petrovec M, ed. 5. Baničevi dnevi: Okužbe, povezane z zdravstvom. Med Razgl. 2013; 52 (Suppl 6): 293–8.
23. Martinello RA, Jones L, Topal JE. Correlation between healthcare workers' knowledge of Influenza vaccine and vaccine receipt. Infect Control Hosp Epidemiol. 2003; 24: 845–7.
24. Böhm R, Betsch C, Korn L, et al. Exploring and promoting prosocial vaccination: A Cross-cultural experiment on vaccination of health care personnel. Biomed Res Int. 2016; 2016: 6870984.
25. To KW, Lai A, Lee KC, et al. Increasing the coverage of influenza vaccination in healthcare workers: review of challenges and solutions. J Hosp Infect. 2016; 94: 133–42.
26. Conte A, Quattrin R, Filiputti E, et al. Promotion of flu vaccination among healthcare workers in an Italian academic hospital: An experience with tailored web tools. Hum Vaccin Immunother. 2016; 31: 1–6.
27. Corace KM, Srigley JA, Hargadon DP, et al. Using behavior change frameworks to improve healthcare worker influenza vaccination rates: A systematic review. Vaccine. 2016; 14: 3235–42.

Irena Grmek Košnik[1], Helena Ribič[2], Matej Dolenc[3], Jana Lavtižar[4], Tanja Cebin Skale[5], Metka Velušček[6]

Ukrepanje ob izbruhu gripe v zdravstveni ustanovi

Managment of an Influenza Outbreak in a Health Care Institution

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: gripa, izbruh, obravnava, ukrepi

V Sloveniji vsako leto zaradi gripe zboli več kot pet odstotkov prebivalstva. Gripa je zelo nalezljiva, zato se pogosto pojavlja v obliki epidemij. Običajno se v času intenzivnega širjenja gripe poveča število bolnikov s pljučnicami in število ljudi, ki morajo na bolnišnično zdravljenje zaradi poslabšanja gripe ali drugih kroničnih bolezni. Pri obvladovanju izbruha gripe in prekinitvi prenosa so poleg cepljenja in kemoprofilakse vsekakor pomembni tudi higienski ukrepi, ukrepi izolacije ter omejitve gibanja in stikov med zdravimi in bolnimi osebami. Na nacionalnem nivoju imamo plan ukrepanja za primer pandemije gripe in algoritem ukrepanja ob pojavu gripe v zdravstvenih ustanovah, ki so ga pripravili epidemiologi Nacionalnega inštituta za javno zdravje. Ukrepe ob izbruhu sezonske gripe v bolnišnicah bolj ali manj uspešno usmerja Komisija za obvladovanje bolnišničnih okužb. Pri tem je zelo pomembna pomoč epidemiologov kot tudi vsega negovalnega osebja. V danih situacijah, posebej v psihiatričnih bolnišnicah, je pri obvladovanju izbruha potrebno iskati kompromise oz. ves čas iskati manjšo škodo za bolnika.

ABSTRACT

KEY WORDS: flu, influenza, outbreak, treatment, measures

More than 5% of the population falls ill with influenza in Slovenia annually. Since influenza is very contagious, it often occurs in the form of an epidemic. During periods of rapid spread of the influenza, the number of patients with pneumonia and the number of patients who need hospitalization due to worsening of chronic diseases increases. Aside from vaccination and chemoprophylaxis, hygienic measures, patient isolati-

[1] Doc. dr. Irena Grmek Košnik, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj, Nacionalni laboratorij za zdravje okolje in hrano; Območna enota Kranj, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj; irena.grmek.kosnik@nlzoh.si

[2] Helena Ribič, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj, Nacionalni laboratorij za zdravje okolje in hrano, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj; helena.ribic@nlzoh.si

[3] Matej Dolenc, dr. med., Splošna bolnišnica Jesenice, Titova cesta 112, 4270 Jesenice; matej.dolenc@sb-jesenice.si

[4] Jana Lavtižar, dipl. med. sestra, Splošna bolnišnica Jesenice, Titova cesta 112, 4270 Jesenice; jana.lavtizar@sb-jesenice.si

[5] Tanja Cebin Skale, dr. med., Psihiatrična bolnišnica Begunje, Begunje na Gorenjskem 55, 4275 Begunje na Gorenjskem; tanja.cebin@pb-begunje.si

[6] Metka Velušček, dipl. med. sestra, Psihiatrična bolnišnica Begunje, Begunje na Gorenjskem 55, 4275 Begunje na Gorenjskem; metka.veluscek@pb-begunje.si

on as well as limiting of contact between healthy and affected individuals are important in managing an influenza outbreak. The algorithm designed by the National Institute of Public Health, which specifies the procedures in the case of occurrence of pandemic and influenza outbreaks in health care facilities, is in use in Slovenia. Measures taken in health care facilities during influenza outbreaks are more or less successfully directed by the Commission for the Infection Control. Involvement of epidemiologists and an active role of the nursing staff is an important aspect in dealing with the outbreaks in a proper manner. There are certain specifics depending on the health care facility involved (for example psychiatric institutions), where guidelines often cannot be followed completely, therefore compromises have to be sought.

UVOD

Gripa predstavlja veliko grožnjo za javno zdravje in ima velik vpliv na obolevnost in umrljivost. V Sloveniji vsako leto zaradi gripe zboli več kot pet odstotkov prebivalstva *(1)*. Gripa je zelo nalezljiva, zato se pogosto pojavlja v obliki epidemij. Virusi gripe se prenašajo s kužnimi kapljicami (razširjajo se po zraku s kihanjem, kašljanjem in govorjenjem), neposrednim stikom (poljubljanje) in posredno preko različnih okuženih predmetov (kljuke, telefonske slušalke itd.) *(2, 3)*.

Bolezen pri mladih bolnikih brez kroničnih bolezni večinoma poteka kot nekajdnevno vročinsko stanje z znaki okužbe dihal in bolečinami v mišicah in sklepih. Pri nosečnicah, bolnikih s kroničnimi boleznimi, dojenčkih in starejših bolnikih pa bolezen lahko poteka s težjo klinično sliko s pogostimi zapleti in višjo smrtnostjo. Običajno se v času intenzivnega širjenja gripe poveča število bolnikov s pljučnicami in število ljudi, ki morajo na bolnišnično zdravljenje zaradi poslabšanja drugih kroničnih bolezni, kot so astma, bronhitis ali srčno popuščanje. Med izbruhi je celotna obolevnost 3–76 % in umrljivost 0–20 % (3). Proti gripi se lahko najbolj učinkovito zaščitimo s pravočasnim cepljenjem. Cepljenje je potrebno opraviti vsako leto znova, najbolje še pred sezono prehladnih obolenj.

Za starejše ljudi je cepljenje v 30–40 % učinkovito pri preprečevanju pojava bolezni, v 50–60 % učinkovito pri preprečevanju hospitalizacij ali pljučnic, povezanih z gripo, in v 80 % učinkovito pri preprečevanju smrti zaradi gripe *(4, 6)*. Zaradi razmeroma slabe učinkovitosti se priporoča cepljenje ostalih družinskih članov.

Cepljenje proti gripi je priporočljivo za osebe, ki so pri svojem delu izpostavljene nevarnosti okužbe ali pa lahko prenesejo okužbo na druge osebe. Še posebno to velja za zdravstvene delavce in sodelavce ter druge nujne službe. Tudi drugi strokovnjaki ugotavljajo, da bi bilo potrebno zdravstvene delavce na vseh nivojih zdravstva motivirati za cepljenje proti gripi *(7)*. O cepljenju zaposlenih proti gripi moramo voditi evidenco za vsako leto posebej. V primeru izbruha mora biti dokumentacija o cepljenju osebja takoj dostopna skupini za obravnavo izbruha *(1)*.

Pri zmanjševanju prenosa in širjenja virusa influence v skupnostih učinkovito delujejo inhibitorji nevraminidaze. Pri nas imamo registrirani oseltamivir in zanamivir, ki delujeta proti virusu influence A in B, saj ublažita obolenje in skrajšata čas bolezni. Problem je v tem, da jih mora bolnik prejeti v 48 urah po nastopu kliničnih znakov *(8)*.

Poleg cepljenja in kemoprofilakse so pri obvladovanju izbruha gripe pomembni tudi ukrepi izolacije z omejitvijo gibanja in stikov med zdravimi in bolnimi

osebami, ukrepi glede zaposlenega osebja in higienski ukrepi. Na nacionalnem nivoju imamo Načrt pripravljenosti na pandemijo gripe na področju zdravstva iz leta 2006 in Algoritem ukrepanja ob pojavu gripe v zdravstvenih ustanovah *(1, 9)*. V prispevku bomo opisali ukrepe za obvladovanje sezonske gripe ter izpostavili nekaj omejitev, zaradi katerih načrta ne moremo v celoti uresničevati.

OBRAVNAVA IZBRUHA

Izbruh gripe predstavljata dva ali več primerov (pacienti ali zaposleni) s simptomi in znaki akutne okužbe dihal v obdobju 72 ur, ki so med seboj epidemiološko povezani, pri čemer naj bi bil virus influence laboratorijsko potrjen vsaj pri enem primeru. Epidemiološko prijavljamo vsako osebo z gripi podobno boleznijo in vsaj enim izmed znakov, kot so: povišana telesna temperatura, slabo počutje, glavobol in bolečine v mišicah, ter vsaj enim izmed respiratornih simptomov, kot so: kašelj, vnetje žrela, kratka sapa *(1, 2)*.

Laboratorijska merila so izpolnjena v primeru, da je pozitiven eden od laboratorijskih testov: osamitev virusa influence iz kliničnega vzorca, potrjevanje prisotnosti nukleinske kisline virusa influence v kliničnem vzorcu, identifikacija antigena virusa influence v kliničnem vzorcu z metodo direktne imunofluorescence in porast specifičnih protiteles proti virusu influence. Epidemiološka povezava pomeni prenos s človeka na človeka. Vse primere razvrstimo kot možne (samo klinična merila), verjetne (klinična merila in epidemiološka povezava) ali potrjene (klinična merila, epidemiološka povezava in laboratorijska potrditev) *(1)*. O izbruhu gripe ali sumu na izbruh obvestimo epidemiološko službo na območni enoti Nacionalnega inštituta za javno zdravje (NIJZ), ta pa epidemiologa v pripravljenosti v Centru za nalezljive bolezni NIJZ.

Za potrditev virusa gripe moramo odvzeti brise nosno-žrelnega prostora prvim obolelim. V primeru izbruha je smiselno določiti podtip virusa influence (molekularno ali tipizacija izolata virusa influence). Določanje podtipov zagotavlja Laboratorij za javnozdravstveno virologijo na Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano (NLZOH). Ko je v izbruhu virus influence laboratorijsko potrjen, nadaljnje laboratorijsko potrjevanje ni več potrebno. Ponovno potrjevanje je potrebno le izjemoma, v kolikor bi se v več kot 72 urah po uvedbi zdravljenja s protivirusnimi zdravili pojavili novi primeri s simptomi gripe. Možno je, da je povzročitelj drug virus, ki povzroči okužbo dihal. V primeru potrditve virusa influence je lahko vzrok neobčutljivost virusa na protivirusno zdravilo ali pa drug tip virusa influence *(8, 10)*.

OCENA TVEGANJA

Pogosto se pri gripi zaradi zmanjšanja odpornosti pojavijo dodatne okužbe z bakterijami (pljučnica, bronhitis). Dodaten zaplet, značilen za otroke, je vnetje srednjega ušesa, pogoste komplikacije so tudi bronhitisi in pljučnice. Pri pripravi ocene tveganja je zdravstvenim ustanovam v veliko pomoč epidemiolog. V oceni tveganja upoštevamo delež cepljenih proti gripi med oskrbovanci in osebjem ter pripravimo predlog možnih, učinkovitih preventivnih ukrepov.

UKREPI OB IZBRUHU

Higienski ukrepi

Virus influence se prenaša s kužnimi kapljicami, ki nastajajo pri kašljanju, kihanju, govorjenju, z neposrednim tesnim stikom z obolelim ter s posrednim stikom preko okuženih površin in predmetov (kljuke, telefonske slušalke, jedilni pribor) *(1–3)*. Neposredni ali posredni stik z izločki dihal je glavni način prenosa viru-

sa gripe. Pravilna higiena rok je najučinkovitejši ukrep za preprečevanje širjenja gripe *(11)*.

Pred nudenjem oskrbe bolnemu varovancu si masko skrbno namestimo tako, da si pokrijemo nos in usta. Zamenjamo jo takoj, ko postane mokra. Vsakič, ko rabljeno masko odstranimo, si razkužimo roke. Rabljene maske odvržemo v posebno embalažo kot kužni odpadek. Uporabljamo navadne kirurške maske.

Ukrepi standardne in kapljične izolacije za oskrbovance in zaposlene z omejitvijo gibanja

V zdravstvu smo vsi zaposleni dolžni izvajati ukrepe standardne izolacije pri vseh bolnikih, ne glede na diagnozo. Standardna izolacija preprečuje širjenje okužb pri stiku z bolnikom in njegovimi izločki. Med ukrepe standardne izolacije sodi higiena rok, uporaba osebne varovalne opreme, čiščenje in razkuževanje opreme, rokovanje s perilom, odstranjevanje infektivnih odpadkov, namestitev bolnika, higiena kašlja. Ukrep kapljične izolacije preprečuje prenos okužbe s kapljicami bolnika ob kašljanju, kihanju in govorjenju. Pri posegih, ki razpršujejo izločke dihal je možna tvorba aerosolov oz. delcev, manjših od 5 mikronov, zato je v takšnem primeru priporočena uporaba respiratorne maske. Ukrepi kapljične izolacije predstavljajo ukrepe standardne izolacije kot tudi nošenje kirurške maske pri tesnem stiku s pacientom (do 1 m), razmik med posteljami več kot 1 m ter kohortiranje *(1)*.

Ker se gripa prenaša tudi s stikom, je treba izvajati ukrepe kontaktne izolacije. Potrebno je pogostejše čiščenje in razkuževanje neposredne bolnikove okolice in drugih površin in predmetov, ki se jih pacient in zdravstveno osebje pogosto dotikajo. Paciente namestimo v individualne sobe, v kolikor imamo kapacitete, oz. jih kohortno izoliramo v večposteljne sobe.

Pacienti z gripo ne smejo zapuščati svoje sobe vsaj pet dni od pojava prvih znakov bolezni ali do popolne ozdravitve. Če je prevoz pacienta nujen, mu pred prevozom namestimo kirurško masko. Če je izbruh omejen na eno enoto/oddelek, je potrebno omejiti stike in gibanje z drugimi enotami/oddelki. V času izbruha sprejem novih pacientov na oddelek ni priporočljiv. V primeru nujne premestitve varovanca iz ustanove, kjer beležimo izbruh gripe, v bolnišnico, je osebje ustanove dolžno le-to o izbruhu pisno obvestiti.

Ukrepi pri zdravstvenem osebju

Med izbruhom gripe ponudimo cepljenje vsemu necepljenemu osebju. V primeru dolgotrajne zdravstvene obravnave je smiselno cepljenje ponuditi tudi pacientom. V primeru pojava gripi podobne bolezni pri zaposleni osebi, mora le ta ostati doma in o tem obvestiti odgovorno osebo. Vse zaposlene s simptomi gripe (tudi če so cepljene ali jemljejo protivirusna zdravila), je treba izključiti iz dela za pet dni od pojava simptomov ali dokler simptomi ne izginejo. Pred povratkom na delo morajo biti najmanj 24 ur brez vročine. O dolžini bolniške odsotnosti odloči lečeči zdravnik *(1)*. Med izbruhom gripe cepljeno osebje brez simptomov nima omejitve dela na drugih oddelkih, necepljeno osebje pa mora počakati eno inkubacijsko dobo (3 dni) od zadnjega dne, ko so delali v enoti/oddelku, kjer je izbruh, preden lahko delajo na drugi enoti/oddelku, kjer ni izbruha.

V primeru, da je izbruh gripe omejen samo na nekatere enote, poskusimo zmanjšati pretok osebja tako, da oblikujemo skupine, ki skrbijo samo za bolne varovance, in skupine, ki skrbijo samo za zdrave oskrbovance. V kolikor so zaposleni cepljeni s cepivom, ki ustreza krožečemu virusu oziroma prejemajo ustrezno protivirusno terapijo, to ni potrebno *(1)*. Med izbruhom naj bi na prizadetem

oddelku/enoti delalo le osebje, ki je cepljeno. Priporočeno je takojšnje cepljenje, razen pri tistih, pri katerih obstaja kontraindikacija za cepljenje. Necepljeno osebje, ki nima znakov bolezni, lahko dela na prizadetem oddelku, če prejema ustrezno kemoprofilakso *(1, 2)*.

Drugi ukrepi

Na vhodu v ustanovo namestimo obvestilo o izbruhu gripe s priporočenimi zaščitnimi ukrepi ter možnimi tveganji za obiskovalce. Obiskovalci morajo biti seznanjeni z omejitvami obiskov. Pacienti in obiskovalci prejmejo tudi pisna navodila (zloženke) o preprečevanju prenosa gripe. Na obisk lahko pridejo samo zdravi. Seznaniti jih moramo z izbruhom in možnimi tveganji. Skupinski obiski niso dovoljeni. Prav tako moramo omejiti obiske ene osebe pri več oskrbovancih. Če obiskovalec po obisku zboli, mora o tem obvestiti ustanovo. Primer se šteje k izbruhu. V primeru obiska pacienta z gripo obiskovalcem ponudimo kirurško masko ter jih poučimo o pravilni uporabi maske in higieni rok. Med izbruhom moramo dosledno izvajati temeljito in pogosto čiščenje delovnih površin in prostorov. Predvsem je potrebno temeljito čiščenje površin ob bolniku *(2, 11)*.

Zdravljenje in kemoprofilaksa

V primeru izbruha gripe v zdravstveni ustanovi je uporaba protivirusnih zdravil ključnega pomena za omejitev širjenje virusa influence. Uporabljamo jih kot sredstvo za zdravljenje pacientov in kot sredstvo za preprečevanje obolenja pri necepljenih osebah, ki so bile z obolelimi v stiku. V Sloveniji sta registrirani dve protivirusni zdravili, ki sta učinkoviti proti virusu influence A in B in spadata v skupino zaviralcev nevraminidaz *(12, 13)*. Pri odraslih bolnikih z gripo protivirusna zdravila zmanjšajo resnost obolenja in skrajšajo potek bolezni. Učinkovita so, če jih bolnik prejme v 48 urah po nastopu simptomov. Zaradi lažje aplikacije zdravila je oseltamivir sredstvo izbora pri starejših pacientih *(1, 10)*.

V primeru izbruha v bolnišnici se strošek protivirusnih zdravil za zdravljenje kot kemoprofilakso krije iz sredstev bolnišnice. Zdravljenje moramo pričeti v prvih 48 urah obolenja, izjemoma tudi kasneje. Pri obeh vrstah protivirusnih zdravil (oseltamivir, zanamivir) je čas zdravljenja pet dni. Praviloma recept za posameznega pacienta napiše sobni zdravnik, ker je seznanjen z oskrbovančevim zdravstvenim stanjem, ki lahko predstavlja morebitne kontraindikacije za to zdravilo.

Kemoprofilakso predpišemo za deset dni. Če se po desetih dneh še vedno pojavljajo novi primeri, z njo nadaljujemo še deset dni od pojava obolenja pri zadnjem primeru oziroma dokler izbruh ni končan. Če se po več kot 72 urah po uvedbi kemoprofilakse pojavljajo novi primeri obolenja, moramo pomisliti na pojav novega virusa ali na neobčutljiv sev (rezistenca). Za dokaz novega virusa odvzamemo dodatne brise žrela. Sočasno kroženje dveh ali več virusov ni tako redko. Če je izbruha konec prej kot v desetih dneh, prekinemo tudi profilakso. Kemoprofilaksa bo učinkovita, če je protivirusno zdravilo učinkovito proti sevu virusa influence (ni rezistence) in če istočasno izvajamo vse druge preventivne ukrepe za obvladovanje okužbe (izolacija, umivanje rok, uporaba mask), vključno s cepljenjem necepljenih oskrbovancev in osebja *(12, 13)*.

Protivirusna zdravila je zaradi možnega razvoja odpornosti potrebno uporabljati skrajno racionalno. Zdravila bi morali hraniti za tiste osebe, ki jih ne smemo cepiti ali pri katerih cepivo ni učinkovito.

Spremljanje izbruha

S pomočjo odgovorne osebe iz Komisije za obvladovanje bolnišničnih okužb (KOBO) spremljamo potek izbruha in

beležimo nove primere med oskrbovanci in osebjem ter spremljamo učinkovitost izvajanja preventivnih ukrepov. V primeru, da se kljub doslednim izvajanjem vseh preventivnih ukrepov, vključno s kemoprofilakso, še vedno pojavljajo novi primeri, moramo pomisliti na odpornost na protivirusno zdravilo ali pojav novega povzročitelja. Odgovorna oseba, v dogovoru z območnim epidemiologom NIJZ, dnevno posreduje podatke o novo zbolelih na predpisanem obrazcu, po faksu ali elektronski pošti.

Konec izbruha

Preden razglasimo konec izbruha moramo biti prepričani, da nimamo več novih primerov. Konec izbruha razglasimo, če je od zadnjega primera minilo 7–10 dni in ni novih bolnikov (4–5 dni inkubacijska doba, 3–5 dni kužnost bolnika) *(1)*.

Priprava poročila o izbruhu

Po končanem izbruhu KOBO ob sodelovanju vseh, ki so sodelovali pri obravnavi izbruha v ustanovi, in ob pomoči območnega epidemiologa, pripravi končno poročilo o izbruhu *(1)*.

OPIS PRIMERA OMEJITVE PRI UKREPANJU OBVLADOVANJA IZBRUHA GRIPE

V februarju letos smo v Psihiatrični bolnišnici Begunje obravnavali izbruh gripe. Zbolele so tri pacientke. Prvi primer je bila pacientka z intenzivnim psihopatološkim doživljanjem (slušne halucinacije). Heteroanamnestični podatki so govorili v prid heteroagresivnega vedenja v domačem okolju (razbila šipo na zunanjih vratih v bloku), odklanjanja hrane in opustitve psihiatrične medikamentozne terapije. Ob sprejemu je bilo ocenjeno, da je hospitalizacija nujna. Pacientka je bila sprejeta na ženski intenzivni oddelek. V začetku obravnave je bila slabo sodelujoča, bolezensko neuvidevna, težje vodljiva na oddelku, jezna, higiensko neurejena. Deveti dan hospitalizacije je postala pacientka febrilna, navajala je bolečine v mišicah, žrelu, glavobol in utrujenost. Ob tem je bila na oddelku še vedno težje vodljiva in nekritična do svojega bolezenskega stanja. Dne 3. 2. 2016 je bil odvzet bris na virus influence, s katerim smo potrdili influenco tipa A. Pri pacientki smo pričeli z ukrepi kapljične izolacije, ki pa zaradi pacientkinega psihičnega stanja niso bili ustrezno izvajani. Kljub navodilom osebja se pacientka ni zadrževala v bolniški sobi, tako da jo je bilo potrebno neprestano opozarjati. Navodil za preprečevanje prenosa gripe zaradi dezorganizacije v vedenju in mišljenju ni bila zmožna upoštevati. Izvor okužbe ostaja nepojasnjen, možno je, da je bil virus vnesen preko obiskovalcev. Druga obolela pacientka za gripo, ki se je okužila v bolnišnici, je imela paranoidno shizofrenijo. Na ženski intenzivni oddelek je bila sprejeta zaradi poslabšanja psihotične motnje ob opustitvi medikamentozne terapije in suicidalne ogroženosti (dva poskusa samomora v dveh mesecih pred sprejemom). Gospa je bila v sklopu oddelka sicer vodljiva, vendar je bilo ocenjeno, da je suicidalno ogrožena. Dne 6. 2. 2016 so pri pacientki ugotavljali povišano telesno temperaturo, ostalih simptomov, značilnih za gripo, pri pacientki niso ugotavljali oziroma jih pacientka ni navajala. Tudi pri tej pacientki posumili, da bi šlo lahko za virus influence, katerega smo 9. 2. 2016 potrdili. Obe pacientki smo kohortno osamili. Tretja pacientka je bila mlado dekle, sprejeto zaradi poslabšanja psihičnega stanja na ženski intenzivni oddelek. Pacientka je bila v sklopu oddelka vodljiva, umirjena. Ob medikamentozni terapiji se je psihično stanje hitro izboljšalo. 8. 2. 2016 se je pri pacientki pojavila povišana telesna temperatura. Glede na to, da smo 9. 2. 2016 že pri dveh pacientkah na ženskem intenzivnem oddelku potrdili virus influence, se pri tej pacientki nismo odlo-

čili za odvzem brisa. Ker je bilo pacientkino psihično stanje izboljšano, smo jo z navodili odpustili v domačo oskrbo.

Pri psihiatričnih pacientih pogosto opažamo že primarno slabe osnovne higienske navade in škodljive razvade (alkoholiki, narkomani, duševno manj razvite osebe), lahko pa so te posledica psihiatričnih motenj (psihoze, demence, hude depresivne motnje, delirantne epizode). Pri psihiatričnih pacientih narava njihove bolezni pogosto onemogoča ustrezno izvajanje ukrepov, ki so potrebni za preprečevanje bolnišničnih okužb (npr. dementnemu pacientu, maničnemu ali akutno psihotičnemu pacientu je težko dopovedati, da se zadržuje v svoji sobi, se čim manj dotika površin, si dosledno razkužuje roke, izvaja vsakodnevno osebno higieno).

ZAKLJUČEK

Gripa je zelo nalezljiva bolezen in se pogosto pojavlja v obliki izbruhov. V času kroženja virusa so zdravstvene ustanove najbolj oblegana mesta s strani obolelih pacientov, tako da v ustanovo zelo hitro dobimo obolele z gripo. V nadaljevanju je obveza zdravstvenih delavcev, da znotraj že tako ranljive populacije bolezen zamejimo in je ne širimo. Pri obvladovanju izbruha gripe in prekinitvi prenosa so poleg cepljenja in kemoprofilakse pomembni tudi higienski ukrepi, ukrepi izolacije ter omejitve gibanja in stikov med zdravimi in bolnimi osebami. Ukrepe ob izbruhu sezonske gripe v bolnišnicah bolj ali manj uspešno usmerja KOBO. Pri tem je zelo pomembna pomoč epidemiologov kot tudi vsega negovalnega osebja. V danih situacijah, posebej v psihiatričnih bolnišnicah je pri obvladovanju izbruha potrebno iskati kompromise oz. ves čas iskati manjšo škodo za bolnika. Poleg nesodelovanja pacientov so največje omejitve tudi pomanjkanje zdravstvenega kadra, posebej zaradi velike obolevnosti v primeru necepljenosti, neznanje obvladovanja prenosa okužbe vključno z izolacijo pacientov, higiena rok in uporaba osebne varovalne opreme.

LITERATURA

1. Frelih T, Čakš N, Sočan M, et al. Gripa - algoritem ukrepanja. Priporočila za obravnavo izbruha ali suma na izbruh gripe v ustanovah. NIJZ [internet]. c2015 [citirano 2016 Oct 1]. Dosegljivo na: www.nijz.si/področja/Nalezljive bolezni/Gradiva
2. Communicable Diseases Report, NSW, for September-October 2004. NSW Public Health Bulletin [internet]. 2004 [citirano 2016 Oct 1]; 15: 220-1. Dosegljivo na: http://www.publish.csiro.au/?act=view_file&file_id=NB04050.pdf
3. Ellis S, Coffey C, Mitchel E, et al. Influenza- and respiratory syncytial virus-associated morbidity and mortality in the nursing home population. J Am Geriatr Soc. 2003; 51: 761-7.
4. Hayward AC, Harling R, Wetten S, et al. Effectiveness of an influenza vaccine programme for care home staff to prevent death, morbidity, and health service use among residents: cluster randomised controlled trial. BMJ. 2006; 333: 1241.
5. Monto AS, Hornbuckle K, Ohmit SE. Influenza vaccine effectiveness among elderly nursing home residents: a cohort study. Am J Epidemiol. 2001; 154: 155-60.
6. Fiore AE, Uyeki TM, Broder K, et al. Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010. MMWR Recomm Rep. 2010; 59 (RR-8): 1-62.
7. Zimmerman RK. Increasing engagement of clinicians in adult immunizations: Reflections on a decade and a half of research. Vaccine. 2014; 32: 7040-2.

8. CDC: Influenza antiviral medications: a summary for clinicians [internet]. CDC; c2015 [citirano 2016 Oct 1]. Dosegljivo na: http://www.cdc.gov/flu/professionals/antivirals/summary-clinicians.htm
9. Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije: Načrt pripravljenosti na pandemijo gripe na področju zdravstva [internet]. c2006 [citirano 2016 Oct 1]. Dosegljivo na: http://www.mz.gov.si/fileadmin/mz.gov.si/pageuploads/pticja_gripa/pandemski_nacrt_ver_1.2_15072006.pdf
10. Hota S, McGeer A. Antivirals and the control of influenza outbreaks. Clin Infect Dis. 2007; 45: 1362–8.
11. Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije: NAKOBO. Higiena rok [internet]. c2009 [citirano 2016 Oct 1]. 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_3_Higiena_rok_2009.pdf
12. Harper SA, Bradley JS, Englund JA, et al. Seasonal Influenza in Adults and Children–Diagnosis, Treatment, Chemoprophylaxis, and Institutional Outbreak Management: Clinical Practice Guidelines of the Infectious Diseases Society of America. Clinical Infectious Diseases. 2009; 48: 1003–32.
13. Public Health England. The treatment and prophylaxis of influenza: PHE guidance 2014-2015. Version 5.0. October 2014. London: Public Health England. 2014.

Tatjana Mrvič[1], Uroš Krivec[2]

Akutni bronhiolitis

Acute Bronchiolitis

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: akutni bronhiolitis, epidemiologija, diagnostika, zdravljenje, preprečevanje

Akutni bronhiolitis je ena najbolj pogostih virusnih infekcijskih bolezni dihal pri majhnih otrocih in vodilni vzrok za bolnišnično zdravljenje dojenčkov, mlajših od 12 mesecev. Bolezen se pojavlja sezonsko v zimskih mesecih, kar sovpada s kroženjem respiratornega sincicijskega virusa. Ta je kot glavni povzročitelj odgovoren za do 80 % primerov bolezni. Čeprav število hospitalizacij zaradi akutnega bronhiolitisa v razvitem svetu v zadnjih desetletjih narašča, pa se je število umrlih otrok v tem času zmanjšalo pod 1 %. Težji potek lahko pričakujemo pri otrocih z dejavniki tveganja (nedonošenost, kronična pljučna, prirojena srčna bolezen). Za postavitev diagnoze ne potrebujemo mikrobioloških ali laboratorijskih preiskav, ključen je dober klinični pregled (prisotnost izcedka iz nosu, kašlja, pokov, piskov nad pljuči, težkega, hitrega dihanja, težav pri hranjenju, apneje, zaspanosti). Dokazano učinkovito zdravljenje je po več kot 50 letih še vedno samo podporno z zagotavljanjem primerne hidracije in oksigenacije krvi in po principu minimalnega rokovanja z otrokom. Preprečevanje bolezni vključuje ustrezne higienske ukrepe (umivanje/razkuževanje rok, čiščenje površin), v bolnišničnem okolju pa še kohortno izolacijo pacientov in dosledno uporabo osebne varovalne opreme (rokavice, plašč/predpasnik, maska) pri rokovanju z okuženim otrokom. Za preprečevanje okužb z respiratornim sincicijskim virusom pa je za najbolj ogrožene skupine otrok na voljo od leta 1998 tudi pasivna zaščita z monoklonskimi protitelesi.

ABSTRACT

KEY WORDS: acute bronchiolitis, epidemiology, diagnostics, treatment, prophylaxis

Acute bronchiolitis is one of the most common viral infections of respiratory tract affecting small children. It is the leading cause for hospital admissions in infants younger than 12 months. The disease occurs seasonally with peak incidence during the winter months which coincide with circulation of respiratory syncytial virus, which is the leading agent responsible for up to 80% of cases. Despite the fact that in developed world hospitalization rates in the last decades are increasing, mortality rates have decreased and are below 1%. A more serious course of the disease is anticipated in children with risk factors (prematurity, chronic lung, congenital heart diseases). For the diagnosis, no microbiological or laboratory tests are required. Essential is a good physical examina-

[1] Tatjana Mrvič, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana; tatjana.mrvic@kclj.si

[2] Uroš Krivec, dr. med., Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Bohoričeva ulica 20, 1000 Ljubljana

tion (runny nose, cough, crackles, wheezing on lung auscultation, difficult, rapid breathing, apnea, difficulty in feeding, drowsiness). The only proven successful treatment from the last 50 years is still supportive with maintaining good hydration and oxygenation with a principle of minimal handling. Preventive measures include good hand hygiene (washing / disinfection) and surface cleaning. In hospital settings, it is also important to cohort the patients and for healthcare workers to maintain a strict use of personal protective equipment (gloves, gowns/aprons, masks). Immunoprophylaxis for respiratory syncytial virus is available since 1998 for children at increased risk of severe disease.

UVOD

Akutni bronhiolitis je ena najbolj zgodaj pridobljenih in pogostih bolezni dihal pri dojenčkih in majhnih otrocih. Je tudi vodilni vzrok za bolnišnično zdravljenje dojenčkov do 12 mesecev starosti *(1)*. Čeprav se večina otrok z akutnim bronhiolitisom pozdravi brez ali z malo zapleti, pa bolezen pri manjšem številu povzroči klinične ponovitve, ki potrebujejo nadaljnje obravnave v ambulanti ali bolnišnici. Od 30 do 40 % otrok, ki so bili zaradi bronhiolitisa predhodno zdravljeni v bolnišnici, bo imelo ponavljajoče epizode bronhospazmov do najstniških let ali celo še kasneje *(2, 3)*. Kljub nedvomnemu kliničnemu pomenu obstajajo le omejeni dokazi o tem, kateri otroci bodo po prvi epizodi bolezni imeli ponovitve in bodo potrebovali nadaljnjo zdravstveno obravnavo.

DIAGNOZA

Akutni bronhiolitis je virusna bolezen, pri kateri obravnavo razdelimo na dva glavna dela: klinično in etiološko diagnozo.

Klinična diagnoza

Enotne definicije bolezni in določene zgornje starostne meje pojava bolezni še vedno ni. V letu 2006 je Ameriška pediatrična akademija (angl. *American Academy of Pediatrics*, AAP) skupaj z Evropskim respiratornim združenjem (angl. *European Respiratory Society*, ERS) poudarila, da je diagnoza bronhiolitisa klinična. Prepoznamo ga kot skupek kliničnih simptomov in znakov, ki vključuje prodrom virusnih znakov in simptomov okužbe zgornjih dihal, čemur sledi povečano dihalno delo in piskanje pri otrocih, mlajših od dveh let *(4)*. V Evropi je pomen piskanja pri postavitvi diagnoze manjši kot v Združenih državah Amerike (ZDA) *(5–7)*. Otroci z akutnim bronhiolitisom imajo lahko zelo širok razpon kliničnih simptomov, od blage dihalne stiske do grozeče dihalne odpovedi. Postavitev klinične diagnoze in stopnje resnosti bolezni je vezana izključno na interpretacijo zdravnika ob upoštevanju vseh značilnosti in nanjo ne vplivajo nobene specifične klinične ugotovitve in diagnostični testi. Za diagnozo sta potrebna skrben klinični pregled (prisotnost izcedka iz nosu, kašlja, pokov, piskov nad pljuči, težkega, hitrega dihanja, težav pri hranjenju, apneje, zaspanosti) v kombinaciji s klinično anamnezo (za oceno poteka bolezni in pridobitev podatkov o predhodnih stanjih, ki lahko vplivajo na težji potek) *(1, 8)*. Razviti so bili številni točkovni sistemi za objektivno ocenjevanje teže dihalnega napora, vendar nobeden ni dosegel širše veljave in le nekateri so pokazali napovedno vrednost. Verjetno je to posledica trenutnih nihanj kliničnih znakov pri otrocih z bronhiolitisom *(9)*.

Diagnostični kriteriji bolezni (ni pa nujno, da so prisotni samo ti) vključujejo *(10–12)*:

- začetek z izcedkom iz nosu in/ali zanki okužbe zgornjih dihal,

- prvo epizodo dihalne stiske v povezavi s poki in/ali piskanjem, uporabo pomožnih dihalnih mišic ali ugrezanje spodnjega dela prsnega koša, nizko zasičenost krvi s kisikom, povečano frekvenca dihanja glede na starost, spremembe barve kože, plapolanje z nosnimi krili, vročina
- izpostavljenost osebam, ki imajo znake okužbe zgornjih dihal in
- pojavnost med epidemično sezono.

Etiološka diagnoza

Za dokazovanje respiratornih virusov uporabljamo dokazovanje antigenov z imunofluorescenco ali pa dokaz genoma virusa z metodo verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) v izločkih dihal (izpirek ali bris nosno-žrelnega prostora). PCR velja za zlati standard diagnostičnih testov s 93–100 % občutljivostjo (v primerjavi z antigenskim testom, ki ima 80–90 % občutljivost) in 64–100 % specifičnostjo *(8)*. Čeprav v klinični praksi etiološka diagnoza ni potrebna in se tudi ne priporoča, pa je lahko koristna v bolnišnici, saj se z dokazom virusnega povzročitelja lahko izognemo uporabi antibiotikov, z združevanjem pacientov glede na dokazanega povzročitelja pa lahko preprečimo prenos okužb. Preiskave za določitev virusa imajo vsekakor tudi epidemiološki pomen. Zlasti v zadnjih letih se postavlja vprašanje, ali sočasna okužba z več virusi vpliva na potek bolezni. V prospektivni multicentrični ameriški raziskavi (MARC-30), v katero je bilo vključeno 2.207 otrok, starih pod dve leti z diagnozo akutnega bronhiolitisa, je bilo dokazano, da je bilo 30 % hospitaliziranih otrok z bronhiolitisom okuženo z več kot enim virusom *(13)*. Raziskava je pokazala, da virusna etiologija ni napovedni dejavnik za apnejo, kar postavlja pod vprašaj dolgo časa prevladujoče mnenje, da respiratorni sincicijski virus (RSV) bolj poveča nevarnost za apnejo kot drugi virusi pri bronhiolitisu *(14)*. Raziskava je pokazala še, da čeprav je imela virusna etiologija določen vpliv na trajanje zdravljenja v bolnišnici, ni imela vpliva na napoved o potrebi po zdravljenju s kontinuiranim pozitivnim tlakom (angl. *continous positive airway pressure*, CPAP) *(13)*. To je v skladu z nedavno špansko raziskavo, ki zaključuje, da so klinični dejavniki bolj pomembni za težo bronhiolitisa kot pa virusna etiologija. Sočasna okužba z več virusi tudi naj ne bi vplivala na hujši potek bolezni *(15)*.

EPIDEMIOLOGIJA

Bronhiolitis je praviloma sezonsko obolenje. Pojavlja se najpogosteje v epidemijah v zimskih mesecih. Za najpomembnejšega povzročitelja – RSV, ki je odgovoren za 60–80 % primerov bolezni pri otrocih do enega leta starosti – je značilen enak vzorec sezonskega pojavljanja po celem svetu, z večino primerov od oktobra do maja na severni polobli *(16–20)*. Odrasli s kronično obstruktivno pljučno boleznijo in drugi imunsko oslabljeni pacienti imajo lahko okužbe z RSV preko celega leta in predstavljajo možni rezervoar virusa *(21, 22)*. Pri otrocih, mlajših od enega leta, je drugi najpomembnejši povzročitelj bolezni rinovirus (14–30 %), sledijo mu človeški bokavirus (14–15 %), človeški metapmnevmovirus (3–12 %), enterovirus, adenovirus, koronavirus, virus parainfluence in virusi gripe (1–8 %) *(6, 17, 18, 23, 24)*.

Bronhiolitis je v razvitem svetu bolezen z visoko obolevnostjo in nizko smrtnostjo. Približno 20 % otrok v prvem letu starosti dobi bronhiolitis *(1)*. Do dopolnjenega drugega leta starosti pa vsaj 10 % otrok potrebuje vsaj eno ambulanto obravnavo zaradi te bolezni *(25)*. Približno 2–3 % otrok z bronhiolitisom potrebuje zdravljenje v bolnišnici, manj kot odstotek pa jih je sprejetih v enoto intenzivne terapije (EIT) ali jih umre *(4, 5, 16, 26)*. Število otrok, ki se zdravijo v bolnišnici s to diagnozo, v zadnjih 30 letih narašča. Samo

v ZDA se je število hospitaliziranih otrok v 80. in 90. letih 20. stoletja povečalo za 2,4-krat *(27, 28)*. Na to je verjetno vplivala predvsem uporaba perkutanega merjenja zasičenosti krvi s kisikom in dejstvo, da je hipoksemija postala kriterij za sprejem v bolnišnico. V istem obdobju se smrtnost zaradi bronhiolitisa ni povečala, kar posredno kaže, da verjetno vse hospitalizacije niso potrebne. Smrtnost zaradi dihalne odpovedi ob bronhiolitisu, povzročenem z RSV, je tako na primer v Veliki Britaniji (VB) 2,9-, v ZDA pa 5,3/100.000 otrok, mlajših od 12 mesecev *(29, 30)*. Razlike so lahko posledica različnih diagnostičnih preiskav kot tudi socio-ekonomskih pogojev. Študija iz VB tudi poudarja, da se je smrtnost zaradi bronhiolitisa pri otrocih, mlajših od enega leta, v 20 letih (od 1979 do 2000) znatno znižala (z 21,5- na 1,8/100.00 dojenčkov), kar je odraz napredka pediatrične intenzivne oskrbe *(31)*.

PATOFIZIOLOGIJA

Virusna okužba pri otrocih najprej prizadene zgornja dihala, nato pa se v nekaj dneh razširi v spodnja dihala. Za vnetje v bronhiolih so značilni peribronhialni infiltrati z levkociti, večinoma mononuklearnimi celicami, in edem podsluznice ter adventicije *(5, 6)*. Poškodba epitelija lahko nastopi zaradi neposrednega delovanja virusa ali pa posrednega vpliva z aktivacijo imunskega odgovora *(6)*. Edem, izločanje sluzi in okvara epitelija dihal z nekrozo celic, lahko povzročijo delno ali popolno zaporo dihal, ujetje zraka distalno od zapore, sesedanje pljuč in nesorazmerje med ventilacijo ter perfuzijo, kar vodi do hipoksemije in povečanega dihalnega dela *(5, 16)*. Stisnjenje gladkih mišic v stenah dihal ne igra bistvene vloge v patološkem procesu bronhiolitisa *(5)*.

PREISKAVE

Kot je že bilo poudarjeno, diagnozo akutnega bronhiolitisa postavimo klinično. Zdravnik mora na podlagi anamneze prepoznati nevarnostne dejavnike za težji potek bolezni. Znano je, da nižja starost (zlasti < 1 mesec), nedonošenost, prirojene pljučne in srčne bolezni lahko vplivajo na težji potek in povečajo verjetnost zdravljenja v EIT *(1, 4)*.

Otroci z akutnim bronhiolitisom ne potrebujejo rutinskih laboratorijskih ali radioloških preiskav *(4–6, 33)*. Izjema je le pulzna oksimetrija. Ta naj bo vključena v klinično oceno bolezni, če je le mogoče, saj z njo zaznamo hipoksemijo tudi v primerih, ko klinično še ni vidna *(4, 5)*.

Laboratorijske preiskave – odvzem C-reaktivnega proteina in kompletna krvna slika – so smiselne pri otrocih z bronhiolitisom le, če sumimo na sekundarno bakterijsko okužbo; vrednosti elektrolitov v krvi pa pri težavah s hranjenjem ali znakih dehidracije. Plinska analiza krvi je potrebna pri dojenčkih s hujšimi dihalnimi težavami oz. grozečo dihalno odpovedjo *(6)*.

ZDRAVLJENJE

V enem prvih preglednih člankov o bronhiolitisu iz leta 1965 sta Wright in Beem opozorila: »načelo *primum non nocere* mora brzdati mučno tesnobo, da bi naredili nekaj – karkoli – za ublažitev hude dispneje« in »dojenčka se ne sme izčrpavati z nepotrebnimi, neučinkovitimi zdravili in preiskavami« *(33)*. Na žalost so ta opozorila izpred 50 let še vedno v veliki meri neupoštevana.

Zdravljenje otroka z akutnim bronhiolitisom je v osnovi podporno, saj se je izkazalo, da nobeno medicinsko zdravljenje ne izboljša pomembnih kliničnih izhodov, kot so dolžina hospitalizacije ali premestitve v EIT. Za najbolj koristnega se je izkazalo minimalno rokovanje z otrokom, še posebej pri najmlajših (< 3 mesece starosti) *(5, 16, 19)*. Dvignjeno ležišče lahko izboljša oksigenacijo in se priporoča za otroke, če so skrbno opazovani

(16, 34). Previdna nosna aspiracija je lahko koristna za dojenčke z gostim sekretom v zgornjih dihalih, ki imajo zaradi tega težave pri hranjenju ali oteženo dihanje *(16, 35, 36)*.

Kisik

Kisik se aplicira hipoksičnim otrokom z bronhiolitisom preko nazalnih kanil ali obrazne maske. Še vedno ni soglasja, katera je želena vrednost zasičenosti krvi s kisikom (SpO_2). Tako v VB kisik aplicirajo otrokom za vzdrževanje SpO_2 92 %, meja po priporočilih AAP pa je SpO_2 90 % pri sicer zdravih otrocih *(4, 5, 7, 16, 36)*. Opazovalne študije kažejo, da ima ciljna vrednost 90 % v primerjavi s 94 % potencialno vlogo pri znatnem skrajšanju trajanja hospitalizacije in AAP tudi priporoča zmanjšano stopnjo nadzora pri dojenčkih, katerih stanje se izboljša *(4, 37, 38)*.

Tekočine in hrana

Vzdrževanje hidracije je pomemben del oskrbe otrok z bronhiolitisom. Na stanje hidracije znatno vpliva povečano dihalno delo, hitro dihanje in vročina *(39, 40)*. V blagih primerih bolezni se svetuje oralno hranjenje, s poudarkom na bolj pogostih manjših obrokih, vključno z dojenjem *(5, 16, 41)*. Veliko otrok, ki se zdravi v bolnišnici, prejema tekočine intravensko (i. v.) ali enteralno po nazogastrični sondi (NGS). Različne države po svetu imajo različna nacionalna priporočila. AAP tako priporoča i. v. nadomeščanje tekočin, Avstralija, Nova Zelandija, Nizozemska, Norveška in Škotska pa zagovarjajo hranjenje po NGS *(4, 39–43)*. Prednosti i. v. nadomeščanja tekočin so lahko zmanjšana nevarnost aspiracije in neovirano dojenje, pomanjkljivosti pa so možnost nastanka kataboličnega stanja zaradi nizkega vnosa kalorij in večja nevarnost preobremenitve s tekočinami ter elektrolitno neravnovesje *(40, 43–45)*. Hranjenje po NGS zagotavlja boljši prehranski status in ravnovesje dušika, ki je lahko pomemben za hitrejše okrevanje. Preko NGS lahko dodajamo tudi izbrizgano materino mleko otrokom, ki so preveč utrujeni, da bi sami sesali *(16, 40, 46)*.

Praviloma otrokom nadomeščamo tekočine v 100 % glede na dnevne potrebe. Pri tistih s težjim potekom bolezni lahko pride do zadrževanja tekočin na račun neustreznega izločanja antidiuretičnega hormona, zato morajo biti kliniki na to še posebej pozorni. V teh primerih morajo nadomeščati le 70–80 % dnevnih potreb po tekočinah *(4, 16, 40)*.

Inhalacije s fiziološko raztopino

Inhalacije se pogosto uporabljajo pri otrocih z bronhiolitisom z namenom povečanja izločanja sluzi. Do sedaj ni bila opravljena nobena randomizirana raziskava, ki bi potrdila koristnost inhalacij z 0,9 % NaCl pri akutnem bronhiolitisu *(1)*. Na drugi strani pa se izvajajo številne raziskave o uporabi inhalacij hipertonične NaCl (3–5 %). Izkazalo se je, da inhalacije s hipertonično fiziološko raztopino pri številnih boleznih povečujejo mukociliarno čiščenje, verjetno zaradi sprožena osmotskega toka vode v sloj sluzi in prekinitve ionskih vezi v sluznem gelu *(47)*. Tudi nekatere metaanalize, opravljene pri otrocih z blagim do zmernim bronhiolitisom, so pokazale, da lahko inhalacije s hipertonično fiziološko raztopino vplivajo na skrajšanje zdravljenja v bolnišnici in stopnjo hospitalizacije *(48, 49)*. Vendar pa so v večini teh raziskav pacienti zaradi nevarnosti bronhospazma prejeli inhalacije hipertonične fiziološke raztopine v kombinaciji z bronhodilatatorjem. Ker niso uspeli opredeliti optimalnih časovnih intervalov, koncentracij raztopin in aparatur za inhalacije in ker trenutno še vedno velja princip minimalnega rokovanja z dojenčkom, inhalacije s hipertonično raztopino niso rutinsko priporočene pri zdravljenju akutnega bronhiolitisa

(19). V prenovljenih priporočilih AAP iz leta 2014 so zapisali, da lahko uporaba inhalacij s 3 % NaCl pri otrocih z blagim do zmernim bronhiolitisom, ki se zdravijo v bolnišnici več kot tri dni, izboljša stanje, zato pri tej skupini otrok o uporabi lahko razmislimo *(12)*.

Uporaba inhalacij z bronhodilatatorji ali adrenalinom pri otrocih z akutnim bronhiolitisom ni pokazala kliničnega pomembnega učinka *(19, 50, 51)*. Enako velja za uporabo kortikosteroidov, ki se pri zdravljenju akutnega bronhiolitisa ne priporočajo *(52)*.

Antibiotiki

Uporaba antibiotikov je rezervirana le za zdravljenje sekundarnih bakterijskih okužb v poteku bolezni, kar je bolj pogosto pri hujšem poteku. Pri otrocih z bronhiolitisom obstaja < 1 % verjetnosti za bakterijsko okužbo krvi ali osrednjega živčevja, približno 1 % verjetnost za okužbo sečil, medtem ko je verjetnost bakterijske pljučnice pri neintubiranih otrocih zelo majhna *(53)*. Težavo predstavlja akutno vnetje srednjega ušesa (AVSU), saj ima več kot polovica otrok z bronhiolitisom ob pregledu ugotovljeno to diagnozo *(54)*. Vnetje lahko povzročajo tako virusi kot bakterije. Če je ob pregledu vidno izbočenje timpanične membrane, gre praviloma za bakterijsko AVSU *(54, 55)*.

Protivirusna terapija

Pri zdravljenju akutnega bronhiolitisa nima mesta, z izjemo oseltamivirja v primeru dokazane gripe *(56, 57)*.

Respiratorna fizioterapija

Respiratorna fizioterapija se pri otrocih z akutnim bronhiolitisom ne priporoča. Edem dihal, luščenje dihalnega epitelija v dihala in splošna hiperinflacija pljuč skupaj s slabo razvito vzporedno ventilacijo lahko pri otrocih z bronhiolitisom povzročijo atelektaze. Pregled osmih randomiziranih raziskav je pokazal, da niti vibracije, perkusije ali pasivne tehnike izdiha nimajo klinično koristnih učinkov *(58–65)*.

Neinvazivno predihavanje

Neivazivno predihavanje se uporablja pri težje bolnih otrocih z akutnim bronhiolitisom. CPAP preko nosnega katetra ali maske se uporablja pri otrocih z zmernim do hudim bronhiolitisom. CPAP ponovno vzpostavlja delovanje sesedenih delov dihal z zmanjšanjem srednjega upora v dihalih. To poveča praznjenje pljuč med izdihom in ima za posledico zmanjšanje hiperinflacije in dihalnega dela, s čimer se poveča izmenjava plinov *(66, 67)*. Objavljenih je nekaj manjših raziskav, kjer so dokazali pozitiven učinke kombinacije helioksa in CPAP pri zdravljenju bronhiolitisa *(66, 68–70)*. Helioks – mešanica helija in kisika – je plin z nizko specifično težo. Pri zdravljenju bronhiolitisa ima lahko pozitivne učinke s spremembo toka plinov iz turbulentnega v laminarni in s tem izboljšanja oksigenacije in izplavljanja CO_2 *(71)*. Čeprav ni natančno objavljenih kriterijev za uporabo CPAP, pa so najbolj pogosta stanja, kjer se le-ta uporablja pri otrocih, dihalna stiska, velika potreba po kisiku, zadrževanje CO_2 in apneja *(16)*.

Uporaba ogrevanega navlaženega kisika preko nosne kanile za zdravljenje z visokim pretokom kisika (angl. *high-flow nasal cannulae*, HFNC) je postala alternativa nosnemu CPAP. Z njim dosežemo povečanje pritiska v žrelu in posledično zmanjšamo dihalno delo ter dihalno stisko *(72)*. Uporaba HFNC pri dojenčkih z bronhiolitisom lahko zmanjša potrebo po intubaciji in jo dojenčki bolje prenašajo kot nosni CPAP *(73, 74)*. Kljub vsemu pa še vedno ni dovolj dokazov o učinkovitosti HFNC pri dojenčkih z bronhiolitisom. Opisani so tudi primeri hudega puščanja zraka pri otrocih, zdravljenih na ta način *(75)*.

Umetno (invazivno) predihavanje

Umetno predihavanje uporabljamo za zdravljenje otrok z najtežjim potekom bronhiolitisa. Nevarnostni dejavniki za dihalno odpoved so nedonošenost, nizka porodna teža, bronhopulmonalna displazija, apneja, nizka saturacija s kisikom in hud dihalni napor ob sprejemu v bolnišnico. V skrajnem primeru, ko ni možen dober nadzor z umetno ventilacijo, pride v poštev še izventelesna membranska oksigenacija (angl. *extracorporeal membrane oxygenation*, ECMO) *(67, 76)*.

PREPREČEVANJE

Ključna v preprečevanju prenosa respiratornih virusov, zlasti najbolj epidemiološko pomembnega RSV, je dobra higiena s poudarkom na umivanju ali razkuževanju rok in čiščenje površin, ki so lahko kontaminirane z izločki dihal. Znano je, da RSV lahko na površinah preživi do sedem ur in se prenaša neposredno in posredno z dotikom *(77)*. V letošnjem letu pa je bila objavljena raziskava, v kateri so dokazali, da se RSV lahko na oddelkih in v EIT, kjer zdravijo okužene otroke, zadržuje v zraku v obliki aerosola tudi dve uri *(78)*. V bolnišnicah je poleg skrbnega razkuževanja rok z alkoholnimi razkužili potrebno pri delu z okuženimi otroki uporabljati tudi osebno varovalno opremo (plašče in rokavice). Zaščitne kirurške maske je potrebno uporabiti vedno, ko se predvideva izpostavljenost aerosoliziranim izločkom dihal ob negi otroka z bronhiolitisom *(4)*.

Druge metode za nadzor nad okužbami vključujejo še izobraževanje osebja in družinskih članov, kohortiranje ter epidemiološko spremljanje začetka RSV-sezone. Z vsemi temi ukrepi lahko zmanjšamo prenos RSV v bolnišničnem okolju za 39–50 % *(79, 80)*.

Za preprečevanje RSV okužb pri dojenčkih z nevarnostnimi dejavniki za težji potek (nedonošenost, kronična pljučna bolezen, prirojene srčne napake) je od leta 1998 na voljo imunoprofilaksa z monoklonskimi protitelesi (palivizumb). Čeprav palivizumab ne vpliva na zmanjšanje smrtnosti zaradi RSV okužb, pa so raziskave pokazale zmerno zmanjšanje števila hospitalizacij. Glavna ovira pri uporabi zdravila je vsekakor njegova visoka cena *(81)*.

ZAKLJUČEK

V zadnjih 40 letih raziskovanja bronhiolitisa so objavili številne raziskave, kjer so ocenjevali različne strategije zdravljenja te bolezni. Številne terapije so na začetku pokazale določeno upanje, vendar so kasneje večje študije to ovrgle. Obstaja nekaj vprašanj glede možnih koristi določenih terapevtskih intervencij pri specifičnih podskupinah otrok (npr. otroci s predhodnim piskanjem, atopijo, okužbami z določenimi virusi – rinovirusi). Možno je, da bodo rezultati prihodnjih študij o uporabi določenih zdravil ali intervencij pokazali koristi pri posameznih podskupinah otrok. Trenutno pa morajo biti napori (tudi v luči visokih stroškov v zdravstvu) usmerjeni v zmanjševanje preiskav in terapij bronhiolitisa, ki so se izkazali kot nekoristni.

LITERATURA

1. Øymar K, Skjerven HO, Mikalsen IB. Acute bronchiolitis in infants, a review. Scand J Trauma Resusc Emerg Med. 2014; 22: 23.
2. Sigurs N, Aljassim F, Kjellman B, et al. Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life. Thorax. 2010; 65 (12): 1045–52.

3. Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. Lancet. 1999; 354: 541–5.
4. American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis. Management of Bronchiolitis: Diagnosis and management of bronchiolitis. Pediatrics. 2006; 118: 1774–93.
5. Zorc JJ, Hall CB. Bronchiolitis: recent evidence on diagnosis and management. Pediatrics. 2010; 125: 342–9.
6. Wainwright C: Acute viral bronchiolitis in children - a very common condition with few therapeutic options. Paediatr Respir Rev. 2010; 11: 39–45.
7. Bronchiolitis in Children: A national clinical guideline [internet]. Scottish Intercollegiate Guidelines Network, 2006 [citirano 2016 Okt 20]. Dosegljivo na: http://www.sign.ac.uk/pdf/sign91.pdf
8. Baraldi E, Lanari M, Manzoni P, et al. Inter-society consensus document on treatment and prevention of bronchiolitis in newborns and infants. Ital J Pediatr. 2014; 40: 65.
9. Destino L, Weisgerber MC, Soung P, et al. Validity of respiratory scores in bronchiolitis. Hosp Pediatr. 2012; 2 (4): 202–9.
10. Bronchiolitis Guideline Team, Cincinnati Children's Hospital Medical Center. Evidence-based care guideline for management of bronchiolitis in infants one year of age or less with a first time episode [internet]. 2010 [citirano 2016 Oct 20]. Dosegljivo na: http://www.cincinnatichildrens.org/WorkArea/
11. Management of Bronchiolitis in Infants: The Hospital for Sick Children, Clinical Practice Guideline [internet]. 2011 [citirano 2016 Oct 20]. Dosegljivo na: http://www.sickkids.ca/clinical-practice-guidelines/clinical-practice-guidelines/export/CLINH18/Main%20Document.pdf
12. Ralston SL, Lieberthal AS, Meissner CH, et al. Clinical Practice Guideline: The Diagnosis, Management, and Prevention of Bronchiolitis. Pediatrics. 2014; 134: 1474–502.
13. Mansbach JM, Piedra PA, Teach SJ, et al. Prospective multicenter study of viral etiology and hospital length of stay in children with severe bronchiolitis. Arch Pediatr Adolesc Med. 2012; 166 (8): 700–6.
14. Schroeder AR, Mansbach JM, Stevenson M, et al. Apnea in children hospitalized with bronchiolitis. Pediatrics. 2013; 132 (5): e1194–201.
15. Ricart S, Marcos MA, Sarda M, et al. Clinical risk factors are more relevant than respiratory viruses in predicting bronchiolitis severity. Pediatr Pulmonol. 2013; 48 (5): 456–63.
16. Nagakumar P, Doull I. Current therapy for bronchiolitis. Arch Dis Child. 2012; 97: 827–30.
17. Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, et al. Bronchiolitis: age and previous wheezing episodes are linked to viral etiology and atopic characteristics. Pediatr Infect Dis J. 2009; 28: 311–7.
18. Midulla F, Pierangeli A, Cangiano G, et al. Rhinovirus bronchiolitis and recurrent wheezing: 1-year follow-up. Eur Respir J. 2012; 39: 396–402.
19. Skjerven HO, Hunderi JO, Brugmann-Pieper SK, et al. Racemic adrenaline and inhalation strategies in acute bronchiolitis. N Engl J Med. 2013; 368: 2286–93.
20. Mikalsen IB, Halvorsen T, Oymar K. The outcome after severe bronchiolitis is related to gender and virus. Pediatr Allergy Immunol. 2012; 23: 391–8.
21. Stensballe LG, Devasundaram JK, Simoes EA. Respiratory syncytial virus epidemics: the ups and downs of a seasonal virus. Pediatr Infect Dis J. 2003; 22: S21–32.
22. Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, et al: Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 2001; 164: 1618–23.
23. Brand HK, de Groot R, Galama JM, et al. Infection with multiple viruses is not associate with increased disease severity in children with bronchiolitis. Pediatr Pulmonol. 2012; 47: 393–400.
24. Uršič T, Jevšnik M, Žigon N, et al. Human bocavirus and other respiratory viral infections in a 2-year cohort of hospitalized children. J Med Virol. 2012; 84: 99–108.
25. Mansbach JM, Pelletier AJ, Camargo CA Jr. US outpatient office visits for bronchiolitis, 1993-2004. Ambul Pediatr. 2007; 7 (4): 304–7.
26. Stockman LJ, Curns AT, Anderson LJ, et al. Respiratory syncytial virus-associated hospitalizations among infants and young children in the United States, 1997–2006. Pediatr Infect Dis J. 2012; 31: 5–9.
27. Manzoni P, Paes B, Resch B, et al. High risk for RSV bronchiolitis in late preterms and selected infants affected by rare disorders: a dilemma of specific prevention. Early Hum Dev. 2012; 88 (Suppl 2): S34–41.
28. Lanari M, Giovannini M, Giuffré L, et al. Prevalence of respiratory syncytial virus infection in Italian infants hospitalized for acute lower respiratory tract infections, and association between respiratory syncytial virus infection risk factors and disease severity. Pediatr Pulmonol. 2002; 33 (6): 458–65.

29. Fleming DM, Pannell RS, Cross KW. Mortality in children from influenza and respiratory syncytial virus. J Epidemiol Community Health. 2005; 59: 586–90.
30. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. JAMA. 2003; 289: 179–86.
31. Panickar JR, Dodd SR, Smyth RL, et al. Trends in deaths from respiratory illness in children in England and Wales from 1968 to 2000. Thorax. 2005; 60: 1035–8.
32. Choi J, Lee GL. Common pediatric respiratory emergencies. Emerg Med Clin North Am. 2012; 30: 529–63.
33. Wright FH, Beem MO. Diagnosis and Treatment: Management of Acute Viral Bronchiolitis in Infancy. Pediatrics. 1965; 35: 334–7.
34. Gillies D, Wells D, Bhandari AP. Positioning for acute respiratory distress in hospitalised infants and children. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2012; 7: CD003645.
35. Miller ST. How I treat acute chest syndrome in children with sickle cell disease. Blood. 2011; 117: 5297–305.
36. NICE. Bronchiolitis in children: diagnosis and management [internet]. NICE guideline. 2015 [citirano 2016 Oct 20]. Dosegljivo na: http://www.nice.org.uk/guidance/ng9
37. Unger S, Cunningham S. Effect of oxygen supplementation on length of stay for infants hospitalized with acute viral bronchiolitis. Pediatrics. 2008; 121: 470–5.
38. Schroeder AR, Marmor AK, Pantell RH, et al. Impact of pulse oximetry and oxygen therapy on length of stay in bronchiolitis hospitalizations. Arch Pediatr Adolesc Med. 2004; 158: 527–30.
39. Kugelman A, Raibin K, Dabbah H, et al. Intravenous fluids versus gastric-tube feeding in hospitalized infants with viral bronchiolitis: a randomized, prospective pilot study. J Pediatr. 2013; 162: 640–2.
40. Oakley E, Babl FE, Acworth J, et al. A prospective randomised trial comparing nasogastric with intravenous hydration in children with bronchiolitis (protocol): the comparative rehydration in bronchiolitis study (CRIB). BMC Pediatr. 2010; 10: 37.
41. Brand PL, Vaessen-Verberne AA. Differences in management of bronchiolitis between hospitals in The Netherlands. Dutch Paediatric Respiratory Society. Eur J Pediatr. 2000; 159: 343–7.
42. Babl FE, Sheriff N, Neutze J, et al. Bronchiolitis management in pediatric emergency departments in Australia and New Zealand: a PREDICT study. Pediatr Emerg Care. 2008; 24: 656–8.
43. Norwegian Society of Pediatricians Guidelines; Bronchiolitis [internet]. 2012 [citirano 2016 Oct 20] Dosegljivo na: http://www.helsebiblioteket.no/retningslinjer/akuttveileder-i-pediatri/lunge-ogluftveissykdommer/akutt-bronkiolitt
44. Hernandez E, Khoshoo V, Thoppil D, et al. Aspiration: a factor in rapidly deteriorating bronchiolitis in previously healthy infants? Pediatr Pulmonol. 2002; 33: 30–31.
45. Kennedy N, Flanagan N. Is nasogastric fluid therapy a safe alternative to the intravenous route in infants with bronchiolitis? Arch Dis Child. 2005; 90: 320–1.
46. Atzei A, Atzori L, Moretti C, et al. Metabolomics in paediatric respiratory diseases and bronchiolitis. J Matern Fetal Neonatal Med. 2011; 24 (Suppl 2): 59–62.
47. Mandelberg A, Amirav I. Hypertonic saline or high volume normal saline for viral bronchiolitis: mechanisms and rationale. Pediatr Pulmonol. 2010; 45: 36–40.
48. Zhang L, Mendoza-Sassi RA, Wainwright C, et al. Nebulised hypertonic saline solution for acute bronchiolitis in infants. Cochrane Database of Systematic Reviews 2013; 7: CD006458.
49. Chen YJ, Lee WL, Wang CM, et al. Nebulized hypertonic saline treatment reduces both rate and duration of hospitalization for acute bronchiolitis in infants: an updated meta-analysis. Pediatr Neonatol. 2014; 55 (6): 431–8.
50. Gadomski AM, Bhasale AL. Bronchodilatators for bronchiolitis. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2006; 3: CD001266.
51. Hartling L, Fernandes RM, Bialy L, et al. Steroids and bronchodilators for acute bronchiolitis in the first two years of life: systematic review and meta-analysis. BMJ. 2011; 342: d1714.
52. Fernandes RM, Bialy LM, Vandermeer B, et al. Glucocorticoids for acute viral bronchiolitis in infants and young children. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2013; 6: CD004878.
53. Spurling GKP, Doust J, Del Mar CB, et al. Antibiotics for bronchiolitis in children. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2011; 6: CD005189.
54. Andrade MA, Hoberman A, Glustein J, et al. Acute otitis media in children with bronchiolitis. Pediatrics. 1998; 101 (4 pt 1): 617–9.
55. Shazberg G, Revel-Vilk S, Shoseyov D, et al. The clinical course of bronchiolitis associated with acute otitis media. Arch Dis Child. 2000; 83 (4): 317–9.

56. Ventre K, Randolph A. Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2010; 5: CD000181.
57. CDC. Children and Flu Antiviral Drugs [internet]. 2016 [citirano 2016 Oct 20] Dosegljivo na: http://www.cdc.gov/flu/children/antiviral.htm
58. Aviram M, Damri A, Yekutielli C, et al. Chest physiotherapy in acute bronchiolitis [abstract]. Eur Respir J. 1992; 5 (suppl 15): 229–30.
59. Webb MS, Martin JA, Cartlidge PH, et al. Chest physiotherapy in acute bronchiolitis. Arch Dis Child. 1985; 60 (11): 1078–9.
60. Nicholas KJ, Dhouieb MO, Marshal TG, et al. An evaluation of chest physiotherapy in the management of acute bronchiolitis: changing clinical practice. Physiotherapy. 1999; 85 (12): 669–74.
61. Bohé L, Ferrero ME, Cuestas E, et al. Indications of conventional chest physiotherapy in acute bronchiolitis [Spanish]. Medicina (B Aires). 2004; 64 (3):198–200.
62. De Córdoba F, Rodrigues M, Luque A, et al. Fisioterapia respiratória em lactentes com bronquiolite: realizar ou não? Mundo Saúde. 2008; 32 (2): 183–8.
63. Gajdos V, Katsahian S, Beydon N, et al. Effectiveness of chest physiotherapy in infants hospitalized with acute bronchiolitis: a multicenter, randomized, controlled trial. PLoS Med. 2010; 7 (9): e1000345.
64. Rochat I, Leis P, Bouchardy M, et al. Chest physiotherapy using passive expiratory techniques does not reduce bronchiolitis severity: a randomised controlled trial. Eur J Pediatr. 2012; 171 (3): 457–62.
65. Postiaux G, Louis J, Labasse HC, et al. Evaluation of an alternative chest physiotherapy method in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. Respir Care. 2011; 56 (7): 989–94.
66. Donlan M, Fontela PS, Puligandla PS. Use of continuous positive airway pressure (CPAP) in acute viral bronchiolitis: a systematic review. Pediatr Pulmonol. 2011; 46: 736–46.
67. Greenough A. Role of ventilation in RSV disease. CPAP, ventilation, HFO, ECMO. Paediatr Respir Rev. 2009; 10 (Suppl 1): 26–8.
68. Martinon-Torres F, Rodriguez-Nunez A, Martinon-Sanchez JM. Nasal continuous positive airway pressure with heliox in infants with acute bronchiolitis. Respir Med. 2006; 100: 1458–62.
69. Mayordomo-Colunga J, Medina A, Rey C, et al. Helmet-delivered continuous positive airway pressure with heliox in respiratory syncytial virus bronchiolitis. Acta Paediatr. 2010; 99: 308–11.
70. Martinon-Torres F, Rodriguez-Nunez A, Martinon-Sanchez JM. Nasal continuous positive airway pressure with heliox versus air oxygen in infants with acute bronchiolitis: a crossover study. Pediatrics. 2008; 121: e1190–5.
71. Gluck EH, Onorato DJ, Castriotta R. Helium-oxygen mixtures in intubated patients with status asthmaticus and respiratory acidosis. Chest. 1990; 98: 693–8.
72. Milesi C, Baleine J, Matecki S, et al. Is treatment with a high flow nasal cannula effective in acute viral bronchiolitis? A physiologic study. Intensive Care Med. 2013; 39: 1088–94.
73. Lee JH, Rehder KJ, Williford L, et al. Use of high flow nasal cannula in critically ill infants, children, and adults: a critical review of the literature. Intensive Care Med. 2012; 39: 247–57.
74. Schibler A, Pham TM, Dunster KR, et al. Reduced intubation rates for infants after introduction of high-flow nasal prong oxygen delivery. Intensive Care Med. 2011; 37: 847–52.
75. Hegde S, Prodhan P. Serious air leak syndrome complicating high-flow nasal cannula therapy: a report of 3 cases. Pediatrics. 2013; 131: e939–44.
76. Flamant C, Hallalel F, Nolent P, et al. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in children: from short mechanical ventilation to extracorporeal membrane oxygenation. Eur J Pediatr. 2005; 164: 93–8.
77. Hall CB, Douglas RG Jr, Geiman JM. Possible transmission by fomites of respiratory syncytial virus. J Infect Dis. 1980; 141: 98–102.
78. Kulkarni H, Smith CM, Lee Ddo H, et al. Evidence of Respiratory Syncytial Virus Spread by Aerosol. Time to Revisit Infection Control Strategies? Am J Respir Crit Care Med. 2016; 194 (3): 308–16.
79. Karanfil LV, Conlon M, Lykens K, et al. Reducing the rate of nosocomially transmitted respiratory syncytial virus. Am J Infect Control. 1999; 27 (2): 91–6.
80. Macartney KK, Gorelick MH, Manning ML, et al. Nosocomial respiratory syncytial virus infections: the cost-effectiveness and cost-benefit of infection control. Pediatrics. 2000; 106 (3): 520–6.
81. Meissner HC, Kimberlin DW. RSV immunoprophylaxis: does the benefit justify the cost? Pediatrics. 2013; 132 (5): 915–8.

Lilijana Kornhauser Cerar[1]

Okužbe z respiratornim sincicijskim virusom pri otrocih ter zaščita s palivizumabom – slovenske izkušnje

Respiratory Syncytial Virus Infection in Children and Immunoprophylaxis with Palivizumab – Slovenian Experience

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: okužba dihal, bronhiolitis, respiratorni sincicijski virus, palivizumab, nedonošenček, bronhopulmonalna displazija

Z respiratornim sincicijskim virusom (RSV) se okuži več kot 90 % otrok pred drugim letom starosti. Okužbe z RSV se ponavljajo vse življenje, večinoma v obliki blage prehladne bolezni. Pri otrocih s povečanim tveganjem (nedonošenčki, otroci s kronično pljučno boleznijo ali s hemodinamsko pomembno srčno napako) lahko okužba privede do življenje ogrožajočih dihalnih premorov ali bolezni spodnjih dihal (bronhiolitisa, pljučnice), ki ji sledi dolgotrajno, ponavljajoče se piskanje. Ker učinkovitega zdravljenja za bronhiolitis ni, je ključno preprečevanje okužbe, tako s higienskimi ukrepi in izogibanjem stika z virusi kot tudi s pasivno zaščito z monoklonskimi protitelesi proti RSV (palivizumab). Slovenske smernice za imunoprofilakso RSV pri otrocih z visokim tveganjem so bile prvič objavljene leta 2002. Leta 2005 je bila zaščita rizičnih otrok s palivizumabom vključena v državni Program cepljenj in imunoprofilakse. Po smernicah, ki so bile dopolnjene leta 2006, 2009 in 2014, so v sezoni 2016/17 do zaščite upravičeni nedonošenčki, rojeni pred 29. tednom nosečnosti, ki so ob pričetku sezone RSV stari do 12 mesecev; nedonošenčki, rojeni med 29. in 32. tednom gestacije, s sorojencem, mlajšim od šest let, ki so ob pričetku sezone mlajši od šest mesecev; otroci z bronhopulmonalno displazijo, ki so v zadnjih šestih mesecih pred pričetkom sezone RSV potrebovali zdravljenje, do starosti enega leta; ter otroci s hemodinamsko pomembno prirojeno srčno napako do operativne poprave napake oz. najdlje do starosti dveh let. Zagotavljanje zdravila, oblikovanje seznama prejemnikov ter spremljanje učinkovitosti in morebitnih sopojavov je v Sloveniji centralizirano, medtem ko so dajanje palivizumaba po letu 2006 prevzeli pediatri na primarni ravni.

[1] Asist. dr. Lilijana Kornhauser Cerar, dr. med., Klinični oddelek za perinatologijo, Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Zaloška cesta 11, 1525 Ljubljana; lilijana.kornhauser-cerar@guest.arnes.si

ABSTRACT

KEY WORDS: respiratory tract infection, bronchiolitis, respiratory syncytial virus, palivizumab, preterm infant, bronchopulmonary dysplasia

Infection with respiratory syncytial virus (RSV) affects more than 90 % of children before the age of two years and lifelong repeated infections are common; in most cases, the infection is mild. However, in young children with certain risk factors (such as preterm birth, chronic lung disease or congenital heart disease), infection may lead to apnea or to life-threatening lower respiratory tract disease and is associated with long-term recurrent wheeze. There is no effective treatment for bronchiolitis, therefore prevention of infection is crucial, either with proper hygiene, avoiding exposure to the virus or by passive protection with humanized monoclonal antibodies against RSV (palivizumab). In 2002, the first Slovenian guidelines for RSV immunoprophylaxis in selected high-risk children were published; they were updated three times (2006, 2009, and 2014). In 2005, palivizumab for high-risk groups was included in the National Immunization Programme. The enrollment criteria for the season 2016/17 include: infants with gestational age less than 29 weeks and younger than 12 months at the beginning of the RSV season; infants with gestational age 29–32 weeks with a sibling 6 years or less, younger than 6 months; active bronchopulmonary dysplasia and age less than 12 months; or haemodinamically significant congenital heart disease until surgically repaired or until aged less than 2 years. While the distribution of palivizumab, the enrollment of children and follow-up controls remain centralized in Slovenia, since 2006, the administration of the drug has been carried out by primary level pediatricians.

ZNAČILNOSTI RESPIRATORNEGA SINCICIJSKEGA VIRUSA

Respiratorni sincicijski virus (RSV), ki je bil odkrit leta 1956, sodi v skupino paramiksovirusov. Je RNA-virus, ki vsebuje vsaj deset beljakovin, na katere se usmerjajo tudi raziskave v razvoju cepiv. Virus je dobil ime po značilnem zlivanju človeških celic v tkivni kulturi, poimenovanem sincicijski učinek. Znana sta dva podtipa (A in B), ki se razlikujeta po antigenski različnosti beljakovine G. V večini epidemij je bil dokazan podtip A. Virus je splošno razširjen in se pojavlja v vseh geografskih in socialno-ekonomskih okoljih *(1)*. Med ljudmi se hitro širi preko tesnega stika z okuženo osebo ali predmeti, kjer lahko na sobni temperaturi preživi do 30 ur. Najpogostejša vstopna vrata so oči in nos, čas inkubacije je 3–5 dni. Okužena odrasla oseba virus izloča 1–6 dni, otroci in ljudje z imunskimi pomanjkljivostmi pa lahko izločajo RSV tudi do štiri tedne *(2)*. Okužba z RSV sodi med najbolj pogoste bolezni v otroški dobi: polovica otrok se okuži v prvem letu, do starosti dveh let pa 90 %. Pojavlja se v epidemijah, v našem geografskem področju predvsem v zimskih mesecih (med novembrom in aprilom). Poznavanje lokalnih značilnosti epidemij je pomembno tako v klinični diagnostiki kot v optimalnem načrtovanju preprečevalnih ukrepov. Po bolezni ne pride do dolgotrajne odpornosti, zato se okužbe pogosto ponavljajo celo v isti sezoni *(3)*. Čeprav okužbe lahko potekajo le s simptomi in znaki prehlada, je po podatkih iz literature RSV (sam ali v kombinaciji z drugimi virusi) povzročitelj 45–90 % primerov bronhiolitisa (vnetja malih dihalnih poti), 15–35 % pljučnic, 6–8 % laringitisa, povzroča pa tudi apnejo in vnetje srednjega ušesa *(4, 5)*. Bolnišnično zdra-

vljenje potrebuje 0,5–3,2 % okuženih otrok, zato je RSV najpogostejši vzrok hospitalizacije v prvem letu življenja. Težjo obliko okužbe prebolevajo zelo mladi dojenčki (do tretjega meseca starosti), nedonošenčki z ali brez kronične pljučne bolezni in dojenčki s hemodinamsko pomembno prirojeno srčno napako, predvsem zaradi nezrelih ali spremenjenih pljučnih funkcij in nizke ravni protiteles *(6)*. Pri teh skupinah otrok je v 10–20 % potrebno zdravljenje s kisikom ali celo z umetno ventilacijo na enoti za intenzivno zdravljenje *(7)*. Med dejavnike tveganja za težji potek sodijo še moški spol, podhranjenost, odsotnost dojenja ter dejavniki okolja, predvsem izpostavljenost cigaretnemu dimu. V zadnjih letih opisujejo dodatne dejavnike tveganja za dihalno odpoved ali celo smrt zaradi RSV-okužbe, med katere sodijo živčno-mišične bolezni, cistična fibroza, trisomija 21, prirojene ali pridobljene motnje imunosti ter težje prirojene napake (npr. hipoplazija pljuč, mielomeningokela) *(8–12)*. RSV je tudi pomemben povzročitelj težje bolezni dihal pri starostnikih in rizičnih skupinah odraslih *(13)*.

PATOGENEZA OKUŽBE Z RESPIRATORNIM SINCICIJSKIM VIRUSOM

RSV je omejen na dihala, kjer pride do značilne peribronhialne infiltracije z limfociti. Virus, ki se razmnožuje v zgornjih dihalih, se veže tudi na epitelij bronhiolov, kjer povzroči propad celic, čemur sledi povečano izločanje sluzi. Infiltracija submukoze in adventicije z vnetnimi celicami privede do dodatnega zmanjšanja svetline malih dihalnih poti. Ob ventilnem mehanizmu pride do kopičenja zraka in prenapihnjenosti pljuč, po resorbciji zraka in popolnem zaprtju svetline bronhiolov pa se v pljučih pojavljajo področja atelektaz. S površine virusa se sprošča topna oblika beljakovine G (Gs), ki dodatno spremeni imunski odgovor organizma. Zaradi sproščanja mediatorjev se prične vnetna reakcija, ki lahko povzroča okvaro tkiv še dolgo po koncu okužbe *(2)*. Pri teži okužbe je poleg velikosti virusnega bremena pomemben dejavnik dovzetnost organizma za okužbo, ki je odvisna od genetskih, imunskih, pljučnih tkivnih dejavnikov in individualnega imunskega odgovora. Po podatkih v literaturi igra pomembno vlogo v patogenezi okužbe z RSV polimorfizem genov, ki kodirajo citokine in njihove receptorje ter naravni polimorfizem HLA-sistema *(14, 15)*.

KLINIČNA SLIKA OKUŽBE Z RESPIRATORNIM SINCICIJSKIM VIRUSOM

Okužba z RSV se pri dojenčkih praviloma prične z blagimi znaki vnetja zgornjih dihal (nahod z vodenim izcedkom), ki jim lahko sledijo kihanje, kašelj, piskanje ter pospešeno in oteženo dihanje z uporabo pomožnih dihalnih mišic, kar je posledica ovire v malih dihalnih poteh zaradi bronhiolitisa ali pljučnice *(16)*. Pri skoraj četrtini dojenčkov so prvi znaki okužbe neješčnost, razdražljivost/zaspanost ali celo apneja, najbolj ogroženi so dojenčki, mlajši od treh mesecev, in nedonošenčki *(17)*. Obstajajo dokazi, da je RSV pomemben vzročni dejavnik za nenadno nepričakovano smrt dojenčka *(18)*. Številni epidemiološki podatki potrjujejo povezavo med RSV-okužbo v zgodnjem otroštvu in kasnejšo kronično respiratorno obolevnostjo tudi pri predhodno zdravih, donošenih otrocih. Po RSV-bronhiolitisu se napadi piskanja (reaktivna bolezen dihal oz. recidivirajoči obstruktivni bronhitis) pojavljajo pri do 50 % otrok *(19, 20)*.

DIAGNOSTIKA OKUŽBE Z RESPIRATORNIM SINCICIJSKIM VIRUSOM

V diagnostiki je najbolj pomembna klinična ocena, laboratorijski testi praviloma ne spremenijo zdravljenja *(21)*. Ob

kliničnih znakih bronhiolitisa rentgenogram pljuč ni značilen (hiperinflacija, peribronhialni infiltrati, atelektaze), med diagnostičnimi testi se za dokaz RSV v kužninah uporabljata predvsem klasična direktna imunofluorescenca (DIF) in novejša metoda verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR), pri kateri se pomnožuje nukleinske kisline z verižno reakcijo s polimerazo. Za kužnino odvzamemo nazofaringealni izpirek ali aspirat traheje, ki sta boljša kot bris nosu. Če pa se odločimo za slednjega, mora biti ta odvzet s krtačastim brisom. Čeprav sta tako klasična DIF kot PCR visoko specifični metodi in prvo odlikujeta tudi krajši čas do izvida in nizka cena, je v Sloveniji v zadnjem času v klinični uporabi predvsem PCR *(2)*. Metoda je visoko občutljiva, še zlasti ob okužbi z več respiratornimi virusi *(22)*. Pomen ima tudi pri načrtovanju ukrepov za preprečevanje prenosov bolnišničnih okužb. Čeprav je RSV najpomembnejši vzročni dejavnik bronhiolitisa, lahko bolezen z enakim potekom povzročajo tudi drugi virusi, kot so humani metapneumovirus, koronavirusi (HCoV-NL63), bokavirus, rinovirusi, virus parainfluence ter gripe. Možne so tudi hkratne okužbe z več virusi, kar je povezano s težjim potekom obolenja *(23)*.

ZDRAVLJENJE BRONHIOLITISA, POVZROČENEGA Z RESPIRATORNIM SINCICIJSKIM VIRUSOM

Navkljub intenzivnim raziskavam za bronhiolitis ni učinkovitega zdravila, zato se o načinih zdravljenja še vedno krešejo mnenja in objavljajo z dokazi bolj ali manj podprte raziskave. Večina otrok z bronhiolitisom lahko okreva v domačem okolju. Bolnišnično zdravljenje je priporočljivo le za tiste, ki so izsušeni, odklanjajo pitje in hranjenje, imajo dihalne premore, kažejo znake dihalne stiske ali za vzdrževanje nasičenosti krvi s kisikom nad 90 % potrebujejo dodatek kisika. V posameznih, praviloma manjših, raziskavah nekatera od zdravil ali postopki nakazujejo ugoden vpliv na potek bronhiolitisa. Vendar sodeč po rezultatih metaanaliz protivirusna zdravila (npr. ribavirin, interferon), antibiotiki, sistemski (deksametazon, prednizolon, metilprednizolon, hidrokortizon; dani per os, intramuskularno ali intravensko) ali inhalatorni steroidi, bronhodilatatorji (salbutamol, albuterol, racemični adrenalin), antagonisti levkotrienov, vitamini (D), nadomestni surfaktant, različni načini ventilatorne podpore (stalni nadtlak v dihalnih poteh, visokofrekventna ventilacija z oscilacijami) in dodajanje helija v dihalne pline in fizioterapija prsnega koša nimajo vpliva na potek in trajanje simptomov bolezni, čas do izboljšanja, stopnjo hospitalizacije, potrebo po mehanski ventilaciji ali trajanje bolnišničnega zdravljenja *(24–26)*. Nobenega dokaza tudi ni, da bi inhalacije steroidov v času prebolevanja RSV-bronhiolitisa preprečile kasnejše ponavljajoče se piskanje. Le inhalacije hipertonične (3 %) fiziološke raztopine so bile v raziskavah povezane z izboljšanjem kliničnih parametrov v prvih dneh bolezni ter s skrajšanjem bolnišničnega zdravljenja *(27)*. Rezultati retrospektivne raziskave na majhni skupini otrok s posebnimi dejavniki tveganja za težak potek okužbe z RSV (po transplantaciji hematopoetskih matičnih celic) kažejo, da težo bolezni in stopnjo umrljivosti zmanjšuje tudi intravensko zdravljenje z monoklonalnimi protitelesi (palivizumab) v kombinaciji z ribavirinom v inhalaciji *(28)*. Zdravljenje RSV-bronhiolitisa in pljučnice zato ostaja omejeno na podporne ukrepe, med katere sodijo vzdrževanje energetskega in tekočinskega ravnovesja, nežno izpiranje oz. čiščenje dihalnih poti (s fiziološko raztopino), dodajanje kisika in ob dihalni odpovedi podpora z mehansko ventilacijo.

PREPREČEVANJE OKUŽB Z RESPIRATORNIM SINCICIJSKIM VIRUSOM

Ker učinkovitega zdravljenja RSV-bolezni ni, je toliko bolj pomembno preprečevanje okužbe, predvsem z enostavnimi in poceni higienskimi ukrepi. Zdravstveno osebje, starši in vsi, ki pridejo v stik z bolnikom z RSV, si morajo pravilno in pogosto umivati in razkuževati roke. V bolnišničnem okolju je nujna osamitev ali združevanje (kohortni sistem) obolelih ob doslednem upoštevanju pravil preprečevanja širjenja bolnišničnih okužb. V domačem okolju dojenčka ščiti dojenje, prepoved kajenja in zmanjšanje možnosti okužbe z virusom od sorojencev, ki naj v času epidemij ne bi obiskovali vrtca *(29)*.

V devetdesetih letih prejšnjega stoletja so v zaščiti pred težko okužbo veliko obetala poliklonalna intravenska protitelesa proti RSV (RSV-IVIG, RespiGam®), ki so bila izolirana iz krvi ljudi z visoko ravnijo RSV nevtralizirajočih protiteles. Bolniki z visokim tveganjem za težak potek okužbe so jih dobivali v času sezone enkrat mesečno v obliki štiri urne intravenske infuzije v odmerku 750 mg/kg. Dve veliki multicentrični raziskavi sta pri prejemnikih v primerjavi s kontrolno skupino dokazali statistično pomembno znižanje stopnje in trajanja hospitalizacije ter potrebe po sprejemu na enoto za intenzivno terapijo oz. po mehanski ventilaciji *(30, 31)*. Zaradi sopojavov, ki so vključevali preobremenitev s tekočino, vročinske reakcije, nižjo vrednost saturacije s kisikom ter zaradi povečane umrljivosti v skupini otrok s hemodinamsko pomembno prirojeno srčno napako, so dajanje RSV-IVIG opustili.

Leta 1998 je bilo za preprečevanje RSV okužb pri posebnih skupinah bolnikov s strani Ameriške agencije za zdravila odobreno zdravilo palivizumab, ki je rekombinantno humanizirano monoklonsko protitelo, pridobljeno s pomočjo DNA-tehnologije v mielomskih celicah miši. Gre za nevtralizirajoče IgG1 protitelo, ki preko vezave z beljakovino F na površini RSV prepreči zlitje virusa z epitelno celico gostitelja. V intramuskularnem odmerku 15 mg/kg enkrat mesečno je zdravilo petdesetkrat bolj učinkovito kot njegov predhodnik RSV-IVIG *(32)*. Na tržišču je v obliki vial (Synagis®), ki vsebujejo 50 mg (0,6 ml) ali 100 mg (1 ml) palivizumaba. Zaščito se lahko kombinira z drugimi cepljenji, saj palivizumab ne vpliva na imunski odgovor nanje. V literaturi so opisane redke preobčutljivostne reakcije (ocena tveganja za anafilaksijo je manj kot 1 na 100.000 primerov) *(33)*. Raziskava IMpact-RSV Trial je pri 1.502 otrocih s povečanim tveganjem (nedonošenčki, rojeni pred 35. tednom nosečnosti, stari manj kot šest mesecev in otroci z bronhopulmonalno displazijo do starosti dveh let) dokazala njegovo učinkovitost v dajanju pasivne zaščite proti RSV, ki se je kazala z zmanjšanjem stopnje hospitalizacije, za več kot polovico manjšo potrebo po sprejemu na intenzivno enoto, krajšim bolnišničnim zdravljenjem ter manj dnevi na dodatnem kisiku v primerjavi z otroki v kontrolni skupini, ki so dobivali placebo (fiziološko raztopino) *(34)*. Palivizumab je bil v dvojno slepi s placebom kontrolirani raziskavi skupine Feltesa in sodelavcev preverjen tudi pri otrocih s hemodinamsko pomembno prirojeno srčno napako, ki so bili mlajši od 24 mesecev *(35)*. V času štirih sezon RSV-okužb so v populaciji 1.287 otrok ugotovili statistično pomembno manjšo potrebo po sprejemu v bolnišnico ter za 56 % krajšo hospitalizacijo, medtem ko med skupinama ni bilo razlik v umrljivosti, potrebi po intenzivnem zdravljenju in umetni ventilaciji. Novejše raziskave obetajo, da bi preprečevanje RSV-okužbe spodnjih dihal s palivizumabom lahko zmanjšalo tveganje za dolgotrajno, ponavljajoče se piskanje tudi pri otrocih brez kronične pljučne bolezni *(36)*.

Ker je palivizumab zelo drago biološko zdravilo (povprečna cena zaščite tri kilogramskega dojenčka je več kot 2.500 evrov na sezono), njegova cena pogosto presega pričakovani prihranek zaradi manjše stopnje ali krajšega časa hospitalizacije ob okužbi z RSV. Zato so bile v svetu narejene (ali še vedno potekajo) številne stroškovne analize, tako v posameznih državah kot tudi za točno določene skupine bolnikov s povečanim tveganjem. Presoja njihovih izsledkov je s strani uporabnika težavna, saj se stroški tako za vse prejemnike kot za posamezne podskupine močno razlikujejo. Ceno za pridobljena leta zdravstveno kakovostnega življenja (angl. *Quality Adjusted Life Year*, QUALY) za najbolj stroškovno učinkovito podskupino iz raziskave Wanga (30.000 angleških funtov) je težko primerjati s tisto iz raziskave Rescha (9.754 EUR za otroke s prirojeno srčno napako, 21.672 EUR za otroke z bronhopulmonalno displazijo in 14.439 EUR za nedonošenčke z gestacijsko starostjo 35 tednov ali manj) *(37–39)*.

V zadnjem desetletju so bile preskušane tudi druge oblike monoklonalnih protiteles, ki so imele v primerjavi s palivizumabom drugačno aminokislinsko zaporedje, kar jim je dalo boljšo sposobnost vezave z virusom, večjo aktivnost v nevtralizaciji virusa ter daljši razpolovni čas. Med njimi je bil tudi motavizumab (Numax®), ki pa kljub dokazani učinkovitosti v preprečevanju okužbe tako v zgornjih kot v spodnjih dihalih zaradi s palivizumabom primerljive učinkovitosti ter višje pojavnosti kožnih reakcij po injekciji ni dobil odobritve Ameriške agencije za zdravila za širšo klinično uporabo *(40)*.

Trenutne raziskave s področja protiteles proti RSV se usmerjajo na modifikacijo palivizumaba z daljšim razpolovnim časom (MEDI-577), antiRSV nanoprotitelesa (tehnologija Ablynx® – rezultati prvih dveh faz kliničnega raziskovanja kažejo, da v intranazalnem odmerku 5 mg/kg učinkovito preprečujejo vse oblike RSV-okužbe) ter protitelesa, usmerjena proti beljakovini G (z dvojnim delovanjem: delujejo neposredno protivirusno in modulirajo imunski odgovor) *(41–43)*. V prvi fazi kliničnih raziskav so tudi protivirusna zdravila, ki naj bi preprečila razmnoževanje RSV ali njegovo pritrditev na celico, med njimi so sintetična RNA (SiRNA, ALN-RSV01), inhibitorji beljakovine F in druge t. i. majhne molekule *(44–46)*.

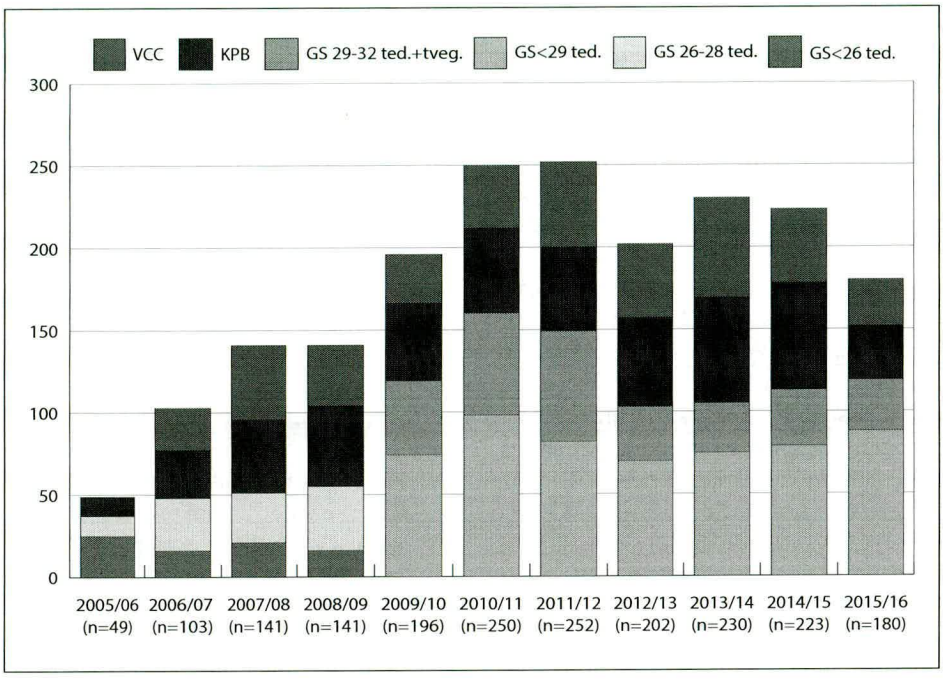
Trenutno cepiva za preprečevanje okužbe z RSV ni. Idealno cepivo naj bi bilo učinkovito v preprečevanju bolezni spodnjih dihal, primerno naj bi bilo za dajanje kmalu po rojstvu (ali celo pred rojstvom, ko bi ga dobila nosečnica), izzvalo naj bi hiter zaščitni imunski odgovor proti obema podtipoma (A in B), zagotavljalo naj bi dolgotrajno popolno zaščito, moralo bi biti varno in stabilno ter se v primeru živega cepiva ne bi smelo prenesti na necepljene osebe. Poskusi v šestdesetih letih prejšnjega stoletja, ki so vključevali s formalinom inaktivirano cepivo (FI-RSV; trije odmerki, dani i. m. dojenčkom v starosti 2–7 mesecev), so dokazali dober imunski odgovor s porastom protiteles, vendar je pri cepljenih otrocih okužba z RSV potekala bistveno težje v primerjavi z necepljenimi, povečana je bila tudi umrljivost *(47)*. Dodatno težavo pri razvoju cepiva predstavlja raznolikost imunskega odgovora na virus v različnih starostnih obdobjih. Okužba z RSV poteka najtežje pri najmlajših otrocih, ki imajo še šibek imunski odgovor tudi zaradi supresije s cirkulirajočimi protitelesi matere. Pri tej populaciji bi bilo verjetno najbolj učinkovito živo oslabljeno in z genetskim inženiringom spremenjeno cepivo, dano intranazalno, kar bi bil neboleč postopek, cepivo pa bi sprožilo tako lokalni kot sistemski imunski odgovor. Pri večjih otrocih in odraslih bi bila bolj primerna mrtva cepiva, ki bi temeljila na podenotah virusa (usmerjena na beljakovino F/G/M) *(48)*.

IMUNOPROFILAKSA RESPIRATORNEGA SINCICIJSKEGA VIRUSA V SLOVENIJI

Prva uporaba palivizumaba v imunoprofilaksi RSV v Sloveniji je bila zabeležena leta 2000, ko je zdravilo prejelo 10 otrok z največjim tveganjem za težak potek okužbe (samo otroci z bronhopulmonalno displazijo, ki so bili v začetku sezone mlajši od šest mesecev) *(49)*. V tej majhni skupini nismo ugotovili nobenih sopojavov zdravila, nihče ni zbolel s težjo RSV-okužbo. V naslednjih sezonah je bil palivizumab uporabljan le v Mariboru, stroške zaščite je krila bolnišnica. Leta 2001 je bila oblikovana posvetovalna skupina, ki je po švedskem vzoru oblikovala slovenska priporočila za imunoprofilakso RSV s palivizumabom. V skupini je sodelovalo šest specialistov s področja neonatologije, pediatrične pulmologije, intenzivnega zdravljenja otrok ter infektologije. Priporočila so bila objavljena oktobra 2002; zaščita je bila svetovana za nedonošenčke, rojene z gestacijsko starostjo manj kot 26 tednov in starostjo manj kot šest mesecev v začetku sezone RSV-okužb ter za otroke z aktivno kronično pljučno boleznijo – bronhopulmonalno displazijo (BPD), mlajše od 24 mesecev *(50)*. Merilo za BPD je bila potreba po dodatnem kisiku za vzdrževanje saturacije 85–92 % v postmenstrualni starosti 36 tednov. Zaščita je bila svetovana tudi za nedonošenčke z gestacijsko starostjo 26–28 tednov, mlajše od 6 mesecev, ki so imeli dejavnike tveganja za težji potek bolezni. Za uvrstitev otroka v to skupino je bilo potrebno soglasje treh specialistov. Šele leta 2005 je Zdravstveni svet pri Ministrstvu za zdravje merila obravnaval in priporočil, da se za otroke s povečanim tveganjem imunoprofilakso RSV s palivizumabom vključi v državni program cepljenj in imunoprofilakse ter da stroške zanj krije Zavod za zdravstveno zavarovanje Slovenije. Tako kot za ostala cepiva in zaščito pred nalezljivimi boleznimi je bil za nabavo in oskrbo izvajalcev s palivizumabom zadolžen Inštitut za varovanje zdravja (IVZ).

Med novembrom 2005 in aprilom 2016 je bilo v Sloveniji do zaščite s palivizumabom upravičenih 1.967 otrok, zdravilo pa je dejansko dobilo 1.909 otrok (najpomembnejši razlog za neizvedbo pri 58 otrocih je bilo odklonilno mnenje staršev do cepljenj). Vključevanje po posameznih sezonah prikazuje slika 1.

V prvi sezoni (2005/2006) je bilo v zaščito vključenih le 49 otrok (večina nedonošenčkov z gestacijsko starostjo manj kot 26 tednov in mlajših od šest mesecev v začetku sezone). Zaradi pomanjkanja palivizumaba (zdravilo je potrebno za prihajajočo jesensko sezono naročiti najkasneje v maju) 16 otrok iz skupine z gestacijsko starostjo 26–28 tednov z dejavniki tveganja kljub izpolnjevanju meril zaščite ni dobilo. Dajanje palivizumaba je bilo povsem centralizirano (Ljubljana, Maribor). V sezoni 2006/2007 so bile smernice prvič posodobljene z vključitvijo otrok s hemodinamsko pomembno prirojeno srčno napako, v začetku sezone starih manj kot 24 mesecev. Vseh prejemnikov je bilo 103, najpomembnejše merilo za vključitev so bile kronične bolezni (pri 28 % kronična pljučna bolezen, pri 25 % prirojena srčna napaka). Pri polovici prejemnikov sta bila prvi in zadnji odmerek dana centralizirano (v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana ali Maribor), dajanje preostalih treh odmerkov so prevzeli pediatri na primarni ravni. Presenetila nas je slaba odzivnost v skupini otrok s prirojeno srčno napako, v kateri skoraj četrtina otrok ni prejela vseh petih odmerkov. Sezono 2007/2008 smo pričeli z dodatnimi člani v Posvetovalni skupini za imunoprofilakso RSV (pediater kardiolog, pediatri primarne ravni, epidemiologi IVZ), ki je pripravila zloženke o nevarnostih RSV in načinih preprečevanja okužb z njimi. Zloženke so že v porodnišnici



Slika 1. Prejemniki palivizumaba v Sloveniji med leti 2005 in 2016 (n = 1.967, 12 sezon) glede na izpolnjevanje merila za zaščito. GS – gestacijska starost (v tednih), KPB – kronična pljučna bolezen, VCC – prirojena srčna napaka (lat. *vitium cordis congenitum*).

prejeli starši vseh novorojenčkov, na voljo so bile tudi v pediatričnih posvetovalnicah in na otroških oddelkih bolnišnic. Glede na epidemiološke analize desetletnega povprečja pojavnosti RSV je bil za čas pričetka zaščite izbran četrti teden v novembru *(51)*. Zaradi opozoril o prenizki ravni protiteles za učinkovito zaščito po prvem odmerku je bil skrajšan interval med prvim in drugim odmerkom (s štiri na tri tedne). V tej in naslednji sezoni je palivizumab prejelo po 141 otrok; prevladovali so kronični bolniki, katerim je bilo zaradi večje teže dano več kot tri četrtine letne porabe zdravila. Leta 2009 so bila po strokovni obrazložitvi ter analizi predvidenih stroškov na Razširjenem republiškem strokovnem kolegiju za pediatrijo in Zdravstvenem svetu pri Ministrstvu za zdravje odobrena nova razširjena priporočila. Spremenjena merila, povečanje števila rojstev in s tem števila nedonošenčkov, pa tudi lažja dostopnost do palivizumaba so doprinesli k (pre)velikemu porastu prejemnikov v naslednjih sezonah, ko je bilo na seznam za zaščito vključenih celo 252 otrok (2011/2012). V zadnji sezoni je bilo na seznamu upravičencev 180 otrok (177 je zdravilo tudi dobivalo), kar pripisujemo strogemu nadzoru nad izpolnjevanjem meril, upoštevanju kronološke starosti ob pričetku sezone (prej korigirana starost), znižanju starostne omejitve v skupini otrok s kronično pljučno boleznijo s 24 na 12 mesecev (od leta 2015) ter hitrejši operativni popravi prirojenih srčnih napak (že v prvem letu starosti). Število porabljenih odmerkov je še dodatno znižal zaključek imunoprofilakse s 15. aprilom, ko je pričakovano zmanjšanje intenzitete kroženja RSV v Sloveniji – zato otroci, ki se rodijo v sezoni okužb RSV po 1. januarju, ne dobijo vseh 5 odmerkov.

V dvanajstih sezonah uporabe palivizumaba za preprečevanje težkih okužb RSV smo od sopojavov beležili predvsem lokalne spremembe na mestu dajanja zdravila (rdečina in oteklina, v manj kot 5 %). Pogostost okužb dihal je bila v skupini prejemnikov primerljiva s pojavnostjo v splošni populaciji otrok te starosti. Ker palivizumab ne prepreči okužbe zgornjih dihal z RSV, so bili občasno prijavljeni pozitivni izvidi testov na RSV iz brisov zgornjih dihal pri otrocih, ki so prejemali palivizumab, pričakovani. Čeprav so nekateri otroci zaradi dihalne odpovedi ob okužbi spodnjih dihal potrebovali zdravljenje s kisikom ali celo z umetno ventilacijo, pa so bili pri njih iz kužnin spodnjih dihal dokazani drugi virusi (bokavirusi, humani metapneumovirusi, pogosto v kombinaciji z rinovirusi), ne pa RSV.

Pred vsako sezono so merila objavljena v Uradnem listu (Program cepljenja in zaščite z zdravili), dostopna so tudi na spletni strani IVZ *(52)*. V sezoni 2016/2017 so do imunoprofilakse RSV s palivizumabom v breme obveznega zavarovanja v Sloveniji upravičeni:

- Vsi otroci, rojeni pred 29. tednom nosečnosti (do vključno 28 6/7 tedna), ki so ob pričetku sezone RSV stari do 12 mesecev (rojeni po 1. 11. 2015).
- Otroci, rojeni med 29. in 32. tednom gestacije (29 0/7 do 31 6/7 tedna), s sorojencem v predšolski starosti (6 let ali manj), ki so v pričetku sezone RSV stari do šest mesecev (rojeni po 1. 5. 2016).
- Otroci z bronhopulmonalno displazijo, ki so v zadnjih šestih mesecih pred pričetkom sezone RSV potrebovali dodatni kisik in so kronološko stari do 12 mesecev.
- Otroci s hemodinamsko pomembno prirojeno srčno napako do kronološke starosti 24 mesecev, ki imajo simptome in znake pljučne hipertenzije, kongestivnega srčnega popuščanja, ne pridobivajo teže, se utrujajo pri hranjenju, imajo ponavljajoče se okužbe dihal, nizko nasičenost krvi s kisikom, kažejo zaostanek pri doseganju razvojnih mejnikov.

  Do palivizumaba so upravičeni tudi tisti, kjer se v naravnem poteku bolezni te simptome pričakuje.

Za uvrstitev na seznam je potrebno pisno priporočilo specialista pediatra – kardiologa. Po popolni kirurški popravi srčne napake bolniki do profilakse niso več upravičeni. V času sezone se bolniki z novoodkrito srčno napako uvrščajo v seznam naknadno, palivizumab prejemajo do popolne poprave srčne napake ali do konca sezone (karkoli je prej).

Priporočila za preprečevanje težkih RSV-okužb s palivizumabom se po svetu razlikujejo, morda tudi zato, ker okužbe s tem virusom niso povsod enako obsežen epidemiološki problem. Slovenske smernice so še vedno primerljive s tistimi v bolj restriktivnih državah (npr. Švedska in Nizozemska) in so bistveno bolj omejevalne kot v sosednjih državah (Avstrija, Italija, Hrvaška, Češka in Slovaška) *(53)*. Dodatna težava je tudi v dejstvu, da mnenja avtorjev člankov iz posameznih držav niso vedno skladna z državnimi priporočili, še manj pa s pokrivanjem stroškov imunoprofilakse iz sredstev zdravstvenega zavarovanja in dejanskim izvajanjem zaščite. Za razliko od drugih držav Evropske unije in ZDA se v Sloveniji lahko pohvalimo z zelo visoko učinkovitostjo: vsaj 95 % na seznam prejemnikov uvrščenih otrok zdravilo tudi dobi, kar je predvsem zasluga zavzetosti slovenskih pediatrov na primarni ravni, ki so izvajalci imunoprofilakse *(54)*.

LITERATURA

1. Welliver RC. RSV and other respiratory viruses. Pediatr Infect Dis J. 2003; 22: S6–12.
2. Munywoki P, Koech D, Agoti C, et al. Influence of age, severity of infection, and co-infection on the duration of respiratory syncityal virus (RSV) shedding. Epidemiol Infect. 2015; 143: 804–12.
3. Glezen WP, Taber LH, Frank AL, et al. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. Am J Dis Child. 1986; 140: 543–6.
4. Stensballe LG, Devasundaram JK, Simoes EAF. Respiratory syncytial virus epidemics: the ups and downs of a seasonal virus. Pediatr Infect Dis J. 2003; 22: 21–32.
5. Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, et al. Viral pneumonia. Lancet. 2011; 377: 1264–75.
6. Rodriguez R, Ramillo O. Respiratory syncytial virus: How, why and what to do. J Infect. 2014; 68: S115–8.
7. Horn SD, Smout RJ. Effect of prematurity on respiratory syncytial virus hospital resource use and outcomes. J Pediatr. 2003; 143: 133–41.
8. Wilkesmann A, Ammann RA, Schildgen O, et al. Hospitalized children with respiratory syncytial virus infection and neuromuscular impairment face an increased risk of a complicated course. Pediatr Infect Dis J. 2007; 26: 485–91.
9. Speer ME, Fernandes CJ, Boron M, et al. Use of palivizumab for prevention of hospitalization as a result of respiratory syncytial virus in infants with cystic fibrosis. Pediatr Infect Dis J. 2008; 27: 559–61.
10. Bloemers BL, van Furth AM, Weijerman ME, et al. Down syndrome: a novel risk factor for respiratory syncytial virus bronchiolitis - a prospective birth-cohort study. Pediatrics. 2007; 120: 1076–81.
11. Manzoni P, Leonessa M, Farina D, et al. Respiratory syncytial virus infection and prophylaxis with palivizumab in immunosupressed children: the experience of large Italian neonatal care setting. Pediatr Transpl. 2007; 11: 456–7.
12. Caffrey Osvald E, Clarke JR. NICE clinical guidelines: bronchiolitis in children. Arch Dis Child Educ Pract Ed. 2016; 101: 46–8.
13. McClure D, Kieke B, Sundaram M, et al. Seasonal incidence of medically attended respiratory svncytial virus infection in a community cohort of adults ≥ 50 years old. PLoS One. 2014; 9: e102586.
14. DeVicenzo JP. Factors predicting childhood respiratory syncytial virus severity. What they indicate about pathogenesis. Ped Infect Dis J. 2005; 24: 177–83.
15. Pennings JLA, Schuurhof A, Hodemaekers HM, et al. Systemic signature of the lung response to respiratory syncytial virus infection. PLoS One. 2011; 6: e21461.
16. Simoes EAF. Respiratory syncytial virus infections. Lancet. 1999; 354: 847–52.
17. Rayyan M, Naulaers G, Daniels H, et al. Characteristics of respiratory syncytial virus-related apnoea in three infants. Acta Paediatr. 2004; 93: 847–9.
18. Fernandez-Rodriguez A, Ballestros S, de Ory F, et al. Virological analysis in the diagnosis of sudden children death: a medico-legal approach. Forensic Sci Int. 2006; 161: 8–14.
19. Drysdale SB, Milner AD, Greenough A. Respiratory syncytial virus infection and chronic respiratory morbidity - is there a functional or genetic predisposition? Acta Pediatr. 2012; 101: 1114–20.
20. Simoes EAF, Groothuis JR, Carbonell-Estrany X, et al. Palivizumab prophylaxis, respiratory syncytial virus, and subsequent recurrent wheezing. J Pediatr. 2007; 151: 34–42.
21. American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis. Diagnosis and management of bronchiolitis. Pediatrics. 2006; 118: 1774–93.
22. Abels S, Nadal D, Stroehle A, et al. Reliable detection of respiratory syncytial virus infection in children for adequate hospital infection control management. J Clin Microbiol. 2001; 39: 3135–9.
23. Jarrti T, Jartti L, Ruuskanen O, et al. New respiratory viral infections. Curr Opinin Pulm Med. 2012; 18: 271–8.
24. Kneyber MC, Moll HA, de Groot R. Treatment and prevention of respiratory syncytial virus infection. Eur J Pediatr. 2000; 159: 399–411.
25. Eiland LS. Respiratory syncytial virus: Diagnosis, treatment and prevention. J Pediatr Pharmacol Ther. 2009; 14: 75–85.
26. Zorc JJ, Hall CB. Bronchiolitis: Recent evidence on diagnosis and management. Pediatrics. 2010; 125: 342–9.
27. Everard M, Hind D, Ugonna K, et al. Saline in acute bronchiolitis RCT and economic evaluation: hypertonic saline in acute bronchiolitis - randomized controlled trial and systematic review. Health Technol Assess. 2015; 19: 1–130.

28. Chavez Bueno S, Mejias A, Merryman RA, et al. Intravenous palivizumab and ribavirin combination for respiratory syncytial virus disease in high-risk pediatric patients. Pediatr Infect Dis. 2007; 26: 1089–93.
29. Drysdale SB, Green CA, Sande CJ. Best practise in the prevention and management of paediatric respiratory syncytial virus infection. Ther Adv Infect Dis. 2016; 3: 63–71.
30. The PREVENT Study Group. Reduction of respiratory syncytial virus hospitalization among premature infants with bronchopulmonary dysplasia using respiratory syncytial virus immune globulin prophylaxis. Pediatrics. 1997; 99: 93–9.
31. Groothuis JR, Simoes EA, Levin MJ, et al. Prophylactic administration of respiratory syncytial virus immune globulin to high-risk infants and young children. The Respiratory Syncytial Virus Immune Globulin Study Group. N Engl J Med. 1993; 329: 1524–30.
32. Wu H, Pfarr DS, Losonsky GA, et al. Immunoprophylaxis of RSV infection: advancing from RSV-IGIV to palivizumab and motavizumab. Curr Topic Microbiol Immunol. 2008; 317: 103–23.
33. Chavez-Bueno S, Mejias A, Welliver RC. Respiratory syncytial virus bronchiolitis. Current and future strategies for treatment and prophylaxis. Treat Respir Med. 2006; 5: 493–94.
34. The IMpact-RSV Study Group. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. Pediatrics. 1998; 102: 531–7.
35. Feltes TF, Cabalka AK, Meissner HC, et al. Palivizumab prophylaxis reduces hospitalization due to respiratory syncytial virus in young children with hemodinamically significant congenital heart disease. J Pediatr. 2003; 143: 530–40.
36. Simoes EA, Groothuis JR, Carbonell-Estrany X, et al. Palivizumab prophylaxis, respiratory syncytial virus, and subsequent recurrent wheezing. J Pediatr. 2007; 151: 34–42, 42.e1.
37. Čižman M. Raba palivizumaba v Sloveniji: ali smo racionalni? ISIS. 2012; 10: 66–7.
38. Wang D, Bayliss S, Meads C. Palivizumab for immunoprophylaxis of respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis in high-risk infants and young children; systematic review and additional economic modeling of subgroup analyses. Health Technol Asses. 2011; 15: 1–124.
39. Resch B, Gusenleitner W, Nuijten MJ, et al. Cost-effectiveness of palivizumab against respiratory syncytial viral infection in high-risk children in Austria. Clin Ther. 2008; 30: 749–60.
40. Abarca K, Jung E, Fernandez P, et al. Safety, tolerability, pharmacokinetics, and immunogenicity of motavizumab, a humanized, enhanced-potency monoclonal antibody for the prevention of respiratoty syncytial virus infection at high-risk children. Pediatr Infect Dis J. 2009; 28: 267–72.
41. Welliver RC. Pharmacotherapy of respiratory syncytial virus infection. Curr Opin Pharmacol. 2010; 10: 289–93.
42. Vanlandschoot P, Stortelers C, Beirnaert E, et al. Nanobodies^{a}: new ammunition to battle viruses. Anitiviral Res. 2011; 92: 389–407.
43. Kauvar LM, Harcourt JL, Haynes LM, et al. Therapeutic targeting of respratory syncytial virus G-protein. Immunother. 2010; 2: 655–61.
44. Zamora MR, Budev M, Rolfe M, et al. RNA interference therapy in lung transplant patients infected with repiratory syncytial virus. Am J Respir Crit Care Med. 2011; 183: 531–8.
45. Sun Z, Pan Y, Jiang S, et al. Respiratory syncytial virus entry inhibitors targeting the f protein. Viruses. 2013; 16: 211–25.
46. Empey KM, Peebles RS Jr, Kolls JK. Pharmacologic advances in the treatment and prevention of respiratory syncytial virus. Clin Infect Dis. 2010; 50: 1258–67.
47. Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. Am J Epidemiol. 1969; 89: 422–34.
48. Murata Y. Respiratory syncytial virus vaccine development. Clin Lab Med. 2009; 29: 725–39.
49. Kornhauser Cerar L, Roškar Z. Preprečevanje težkih okužb z respiratornim sincicijskim virusom (RSV) s palivizumabom pri otrocih z visokim tveganjem. Med Razgl. 2009; 48 Suppl 2: 33–9.
50. Pokorn M, Čižman M, Primožič J, et al. Strokovna izhodišča za uporabo specifičnih monoklonskih protiteles (palivizumab) za preprečevanje okužb z respiratornim sincicijskim virusom (RSV) v Sloveniji. Zdravst Vest. 2002; 71: 645–6.
51. Meerhof TJ, Mosnier A, Schellevis F, et al. EISS RSV Task Group. Progress in the surveillance of respiratory syncytial virus in Europe: 2001 – 2008. Euro Surveill. 2009; 14: 14–8.

52. NIJZ. Program cepljenja in zaščite z zdravili za leto 2016 [internet]. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje; 2016 [citirano 2016 Oct 18]. Dosegljivo na: http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/predlog_programa_2016_mar_2016_objavljen_na_spletu_2.pdf

53. Kornhauser Cerar L, Burmas A, Grgič Vitek M, et al. Posvetovalna skupina za imunoprofilakso RSV s palivizumabom. Preprečevanje hudih okužb z respiratornim sincicijskim virusom s palivizumabom – slovenske smernice. ISIS. 2013; 1: 53–4.

54. Frogel MP, Stewart DL, Hoopes M, et al. A systematic review of compliance with palivizumab administration for RSV immunoprophylaxis. J Manag Care Pharm. 2010; 16: 46–58.

Darja Duh[1], Andrej Golle[2], Nina Gorišek Miksić[3], Dušanka Vidovič[4]

Pomen dokazovanja respiratornega sincicijskega virusa pri starostnikih

The Importance of Respiratory Syncytial Virus Detection in Elderly

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: respiratorni sincicijski virus, starostniki, multipleks molekularne metode, pljučnica

IZHODIŠČA. Respiratorni sincicijski virus (RSV) je izredno pomemben respiratorni patogen tudi za starostnike. Obolevnost in smrtnost starostnikov zaradi RSV je primerljiva z obolevnostjo in smrtnostjo bolnikov okuženih z virusi gripe. Raziskovalci opozarjajo, da so okužbe starostnikov z RSV resen problem, ki zahteva ustrezno mikrobiološko diagnostiko, bolnišnični nadzor nad okužbo in razvoj novih protivirusnih zdravil in cepiv. V Sloveniji je RSV pri starostnikih še vedno zapostavljen. METODE. V petletnem obdobju smo pri starostnikih starih 65 let in več dokazovali RSV z molekularno metodo multipleks verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR), s katero dokazujemo sočasno več različnih respiratornih patogenov in s specifičnim PCR za dokazovanje izključno RSV. REZULTATI. V petletnem obdobju od leta 2012 do prve polovice 2016 smo pri starostnikih, starih 65 let in več, dokazali RSV v 5,2 % (31/598) kužnin. Virus smo dokazali le z molekularno metodo multipleks PCR, ne pa tudi s specifičnim PCR za dokazovanje izključno RSV. Med RSV negativnimi kužninami smo v do 43 % dokazali druge respiratorne viruse, predvsem viruse gripe in rinoviruse. Kužnine smo prejeli iz različnih oddelkov Univerzitetnega kliničnega centra Maribor in drugih inštitucij v severovzhodni Sloveniji, prevladovala sta Oddelek za pljučne bolezni in Oddelek za nalezljive bolezni in vročinska stanja. Po kliničnih podatkih sodeč so imeli RSV okuženi starostniki težjo obliko obolenja dihal, ki se je kazala kot pljučnica, kronična obstruktivna pljučna bolezen in/ali astma. ZAKLJUČKI. V Sloveniji moramo biti bolj pozorni na okužbe starostnikov z RSV. V zimskih mesecih je smiselno uporabljati multipleks molekularne metode, s katerimi dokazujemo vsaj viruse gripe in RSV hkrati.

[1] Doc. dr. Darja Duh, univ. dipl. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; darja.duh@nlzoh.si

[2] Asist. mag. Andrej Golle, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

[3] Asist. dr. Nina Gorišek Miksić, dr. med., Oddelek za nalezljive bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor

[4] Asist. Dušanka Vidovič, dr. med., Oddelek za pljučne bolezni, Klinika za interno medicino, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor

ABSTRACT

KEY WORDS: respiratory syncytial virus, elderly adults, multiplex molecular methods, pneumonia

BACKGROUNDS. Respiratory syncytial virus (RSV) is increasingly recognized as an important cause of respiratory illness in elderly adults. Adults hospitalized for RSV infection have high morbidity and mortality, comparable to outcomes in seasonal influenza patients. Strategies to improve case finding, diagnosis, hospital infection control, and development of antiviral therapies and immunization of high-risk adults are urgently needed. In Slovenia, the detection of RSV in elderly is an underestimated concern. METHODS. Samples from elderly aged 65 and more were tested for the presence of RSV infection in the five-year period. Virus was detected by using multiplex molecular method for simultaneous detection of several respiratory pathogens and specific polymerase chain reaction (PCR) for RSV detection. RESULTS. In the five-year period from 2012 until the first half of 2016, 5.2% (31/598) of the elderly aged 65 and more were proven to be infected with RSV. Virus was detected only by using multiplex molecular method. When specific PCR for RSV detection alone was employed, none of the samples tested positive. In up to 43% of the negative RSV samples, the presence of other respiratory viruses was proven, with influenza and rhinoviruses being the most prevalent. Samples were sent from different departments of the University Medical Centre Maribor and from other institutions in north-eastern Slovenia, but the majority of samples came from the Department of Pulmonary Diseases and the Department of Infectious Disease and Febrile Conditions. Based on the clinical data provided by the two departments, RSV-infected elderly had signs of severe respiratory illness. They were diagnosed with pneumonia, chronic obstructive pulmonary disease and/or asthma. CONCLUSIONS. In conclusion, Slovenia needs to recognize the importance of RSV infection in elderly adults. Multiplex molecular methods for simultaneous detection of influenza viruses and RSV at least, should be used during winter months for microbiological diagnosis of respiratory infection in elderly.

IZHODIŠČA

Respiratorni sincicijski virus (RSV) je v zimskih mesecih pogost povzročitelj virusnih okužb dihal pri ljudeh *(1)*. Pri otrocih do dveh let starosti velja celo za najpomembnejšega povzročitelja bronhiolitisa in pljučnice *(2)*. Dejavniki tveganja pri otrocih, med katerimi virus še posebej hudo prizadene prezgodaj rojene otroke, otroke z nizko porodno težo in otroke z drugimi osnovnimi boleznimi, so natančno raziskani *(2, 3)*.

Ravno nasprotno je vloga RSV pri okužbah dihal starostnikov slabše raziskana. V svetovni literaturi zasledimo objave, kjer raziskovalci na osnovi kliničnih, epidemioloških in mikrobioloških podatkov ugotavljajo, da je RSV pomemben respiratorni patogen pri starostnikih *(4–6)*. Preventivni ukrepi proti okužbi z RSV bi po njihovem mnenju značilno zmanjšali breme in zaplete ob težjih respiratornih obolenjih starostnikov *(4)*. Kljub temu splošnega prepričanja o pomenu RSV pri odraslih in še posebej pri starostnikih med zdravniki in v virooloških knjigah ni zaslediti *(1)*. To bi lahko deloma pripisali sezonskemu pojavljanju RSV, ki se prekriva s pojavljanjem ostalih pomembnih respiratornih patogenov pri odraslih, kot

so virusi gripe. Prav tako je težko ločiti okužbe z različnimi respiratornimi patogeni le na osnovi kliničnih znakov, ki so lahko med različnimi kliničnimi oblikami bolezni zabrisane *(6)*. Kot eno izmed rešitev pri reševanju problema dokazovanja RSV pri starostnikih bi lahko predstavljale multipleks molekularne metode. Te omogočajo sočasno dokazovanje več različnih patogenov v eni sami reakciji iz ene kužnine. Posledično skrajšajo čas, potreben za mikrobiološko diagnostiko, in znižajo stroške preiskav *(7)*.

V Laboratoriju za klinično molekularno diagnostiko Oddelka za medicinsko mikrobiologijo Maribor Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) že nekaj let uporabljamo test FilmArray Respiratory Panel (FilmArray RP v 1.7; BioFire, BioMerieux Company, Francija). S testom, ki temelji na metodi ugnezdene verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR), sočasno dokazujemo širok nabor respiratornih patogenov med drugim tudi RSV. V petletnem obdobju smo z uporabo testa zasledili povečano število RSV pri starostnikih, starih 65 let in več. Zanimalo nas je, ali je prisotnost RSV v teh primerih naključna in ga dokažemo le zato, ker je del uporabljenega testa, in ali je dokazovanje RSV v omenjenih primerih pomembno tudi iz kliničnega in mikrobiološkega vidika.

METODE

Uporabili smo podatke testiranja kužnin bolnikov, starih 65 let in več, ki smo jih sprejeli v laboratorij od leta 2012 do prve polovice leta 2016. Upoštevali smo kužnine, poslane iz vseh oddelkov in ambulant Univerzitetnega kliničnega centra (UKC) Maribor, Splošne bolnišnice Dr. Jožeta Potrča Ptuj, Zdravstvenega doma Dr. Adolfa Drolca Maribor in Nacionalnega inštituta za javno zdravje. Vrsta naročene preiskave je bila multipleks PCR za respiratorne patogene ali PCR za RSV.

Vse kužnine smo shranili v hladilniku pri 4 °C za največ 1 dan. Brise smo ob sprejemu v laboratorij po potrebi zalili s sterilno fiziološko raztopino do največ 2 ml in vsebino premešali na vorteksu. S kužninami vedno rokujemo v mikrobiološki komori druge varnostne stopnje in pri tem upoštevamo navodila za varno delo v molekularnem biološkem laboratoriju.

Za sočasno dokazovanje respiratornih patogenov smo uporabili test FilmArray RP (v 1.7, BioFire) z oznako CE-IVD. Test smo izvedli po navodilih proizvajalca. Tristo µl kužnine smo dodali k reagentu Sample Buffer in rehidrali reagente v FilmArray kartuši. Vnos reagentov in kužnine v kartušo poteka po principu vakuuma. Kartušo smo označili s protokolno številko in jo prenesli v aparat FilmArray. V računalniški program, ki vodi aparat, smo vnesli ustrezne podatke s čitalcem črtne kode na kartuši. V roku 1 ure smo na aparatu odčitali rezultat. Aparat je zaprt sistem, ki omogoča sočasno ekstrakcijo nukleinskih kislin (NK), tj. DNA in RNA, dokazovanje patogenov z ugnezdenim RT-PCR s talilno krivuljo ter analizo rezultatov. Po končani reakciji smo kartušo zavrgli.

V primeru zahtevanega PCR za RSV smo iz kužnin ekstrahirali NK po navodilih proizvajalca s komercialnim kompletom reagentov RTP® DNA/RNA Virus Mini Kit (STRATEC Molecular GmbH, Berlin, Nemčija). Princip ekstrakcije temelji na uporabi posebnih kolon s silikagelno membrano, na katero se zaradi kemijskih lastnosti vežejo NK.

Prisotnost RNA RSV smo dokazovali z metodo RT-PCR v realnem času, ki smo jo validirali v laboratoriju. Pomnožili smo 163 bp dolg odsek gena za protein N RSV in uporabili začetne oligonukleotide ter hidrolizirajočo sondo, kot so jih opisali Bonroy in sodelavci *(8)*. Upoštevali smo pogoje reakcije, zapisane v citiranem članku. Metodo smo izvajali na aparatu LightCycler 2.0 (Roche, ZDA). Meja

detekcije (LoD) obeh testnih metod je določena in znaša v primeru FilmArray RP 2 TCID50/ml ter v primeru hišnega RT-PCR v realnem času 10^4 kopij RSV/ml.

Podatke o kužninah, starosti bolnikov, o pošiljatelju, vrsti uporabljene metode in rezultatu za vseh pet let smo zbrali v računalniških programih MBL in K21 analize, SRC Infonet d. o. o.

Klinične podatke so posredovali zdravniki specialisti iz Oddelka za pljučne bolezni Klinike za interno medicino in iz Oddelka za nalezljive bolezni in vročinska stanja UKC Maribor.

REZULTATI

V obdobju od 1. januarja 2012 do 30. junija 2016 smo na prisotnost RSV testirali 598 kužnin bolnikov, starih 65 let in več. V 5,2 % (31/598) smo z molekularno metodo dokazali genom RSV. V posameznih zaporednih letih je naraščalo število poslanih kužnin in število pozitivnih primerov RSV, kot prikazuje tabela 1.

Sprejeli smo različne kužnine – bris nosno-žrelnega predela, bris žrela, bris nosu, bris traheostome, aspirat bronha in bronhoalveolarni izpirek – in RSV dokazali le v brisih nosno-žrelnega predela in brisih žrela.

Kužnine so poslale različne inštitucije iz območja severovzhodne Slovenije. Najpogostejši pošiljatelji so bili različni oddelki UKC Maribor, med katerimi izstopata Oddelek za pljučne bolezni in Oddelek za nalezljive bolezni in vročinska stanja (slika 1a). Zato ni presenetljivo, da smo največ primerov RSV dokazali ravno pri bolnikih iz omenjenih oddelkov (slika 1b).

RSV smo v kužninah dokazovali z dvema metodama. RT-PCR v realnem času smo po naročilu uporabili le v letu 2014 v 7 primerih (10 % vseh izvedenih RSV testiranj), v letu 2015 v 1 primeru (0,4 % vseh izvedenih RSV testiranj) in v letu 2016 v 2 primerih (0,7 % vseh izvedenih RSV testiranj). V vseh ostalih 588 kužninah smo RSV dokazovali sočasno z drugimi respiratornimi virusi z metodo FilmArray RP. Kadar so na multipleks PCR za respiratorne patogene (FilmArray RP) poslali kužnine, za katere test ni validiran, smo v teh kužninah rezultat potrdili z RT-PCR v realnem času za dokazovanje RSV. V vseh primerih se je rezultat ujemal in je bil negativen.

Test FilmArray RP omogoča sočasno dokazovanje različnih respiratornih patogenov, zato smo lahko preverili, ali smo v RSV pozitivnih kužninah dokazali še dodatne respiratorne viruse. V letu 2014 smo v 3 izmed 7 RSV pozitivnih kužnin hkrati dvakrat dokazali humani koronavirus tip HKU1 in enkrat rinoviruse. V letu 2015 smo v 2 izmed 11 RSV pozitivnih kužnin dokazali hkrati še humani koronavirus tip NL63. V prvi polovici leta 2016 smo med 13 RSV pozitivnimi kužninami le v 1 dokazali humane rinoviruse.

Tabela 1. Prikaz testiranja na respiratorni sincicijski virus pri starostnikih v petletnem obdobju.

Leto	Št. vseh	Št. pozitivnih	% pozitivnih
2012	5	0	/
2013	5	0	/
2014	68	7	10,2
2015	250	11	4,4
2016 (1/2)[a]	270	13	4,9
Σ	598	31	5,2

[a] testno obdobje je prva polovica leta

Tabela 2. Prikaz dokazanih virusov s FilmArray RP v za respiratorni sincicijski virus (RSV) negativnih kužninah. Flu A – virusi gripe A, Flu B – virusi gripe B, hRV – človeški rinovirusi, hMPV – človeški metapneumovirus.

Leto	Št. za RSV negativnih kužnin	Dokazani drugi virusi		Vrsta in št. najpogosteje dokazanega virusa			
		št.	%	Flu A	Flu B	hRV	hMPV
2014	61	5	8,19	/	/	3	/
2015	239	103	43,09	36	17	20	/
2016 (1/2)[a]	257	91	35,41	37	/	15	14

[a] testno obdobje je prva polovica leta

Tabela 3. Izbrani klinični podatki za bolnike z dokazano okužbo z respiratornim sincicijskim virusom. KOPB – kronična obstruktivna pljučna bolezen, amb. – ambulantni pregled, * – prisoten akutni bronhitis, NP – ni podatkov.

Leto	Bolnik št.	Starost (let)	Št. dni v bolnici	Imunsko oslabljen	Pljučnica	KOPB	Astma, srčno popuščanje
2014	1	91	6	ne	da	NP	da
	2	83	11	ne	da	NP	da
	3	87	5	ne	ne*	NP	da
	4	70	25	da	da	NP	ne
	5 (2-krat)	85	19	ne	da	NP	da
	6	70	0, amb.	ne	da	NP	da
2015	1	68	9	ne	da	da	ne
	2	76	5	ne	da	ne	ne
	3	78	8	ne	da	ne	ne
	4	70	9	ne	ne	da	ne
	5	80	8	ne	ne	da	ne
	6	76	4	ne	ne	ne	da
	7	71	9	ne	ne	ne	da
	8	86	0, amb.	ne	ne*	NP	da
	9	80	17	ne	ne*	NP	da
2016	1	81	5	ne	da	ne	ne
	2	78	8	ne	ne	da	ne
	3	79	4	ne	ne	ne	da
	4	88	5	ne	ne	ne	da
	5	66	4	ne	ne	ne	ne
	6	91	7	ne	da	NP	ne

Med kužninami starostnikov, v katerih nismo dokazali genoma RSV, smo največkrat dokazali viruse gripe A in B ter človeške rinoviruse (tabela 2).

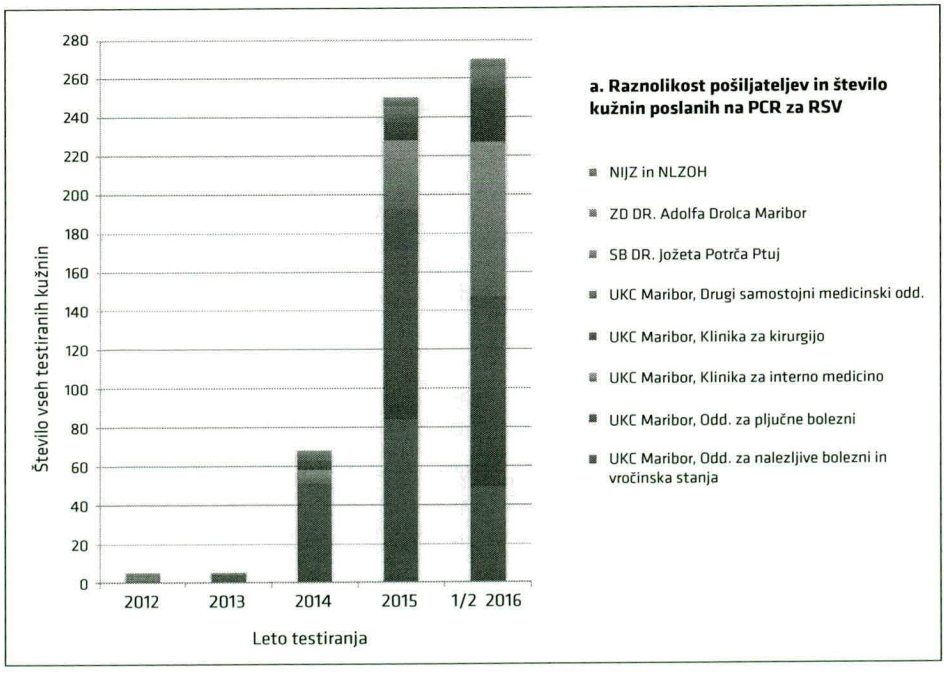
Klinične podatke smo omejili na podatke, ki pričajo o težji obliki respiratornega obolenja. Zanimalo nas je, ali so imeli bolniki okuženi z RSV pljučnico,

kronično obstruktivno pljučno bolezen (KOPB) in/ali astmo, kakšen je bil njihov imunski status in koliko dni so bili hospitalizirani. Podatke smo pridobili iz dveh oddelkov: Oddelka za pljučne bolezni in Oddelka za nalezljive bolezni in vročinska stanja, ki so poslali največ kužnin, v katerih smo dokazali RSV. Rezultate smo prikazali v tabeli 3.

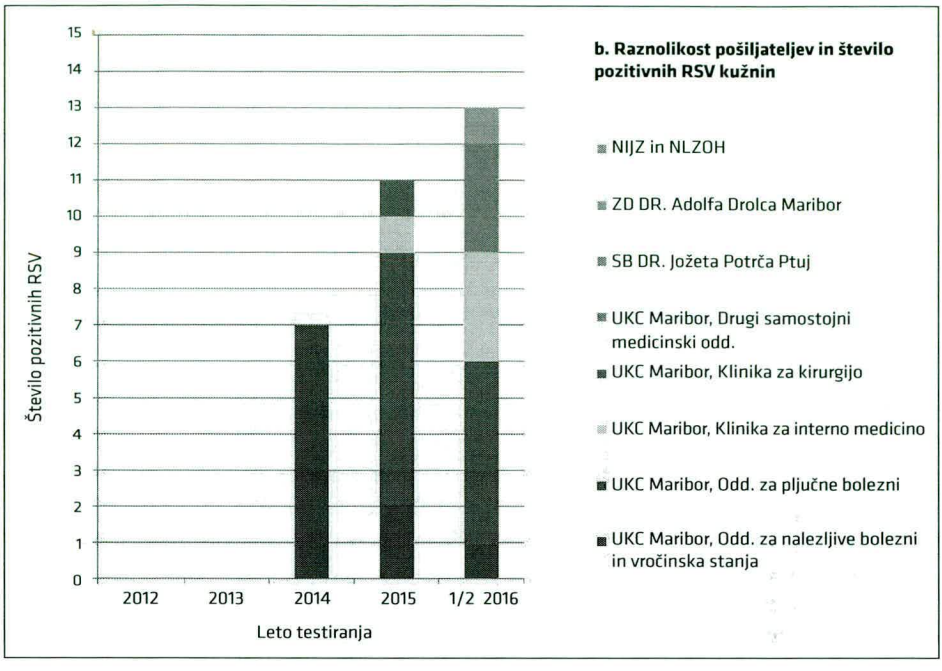
RAZPRAVA

Raziskovalci že dobrih 20 let opozarjajo na pomen okužb spodnjega respiratornega trakta starostnikov z RSV *(1, 4–6)*. Sprva so o tem pisali informativno in se osredotočali le na rezultate, ki so jih dobili z matematičnimi modeli in so predstavljali teoretično oceno o pomenu RSV pri starostnikih *(9, 10)*. Kasneje so v svetovni literaturi, v najbolj elitnih medicinskih revijah, kot so The New England Journal of Medicine, The Lancet itd., potrdili, da je RSV izredno pomemben respiratorni patogen tudi za starostnike *(5, 6)*. V svetu se danes ne postavlja več vprašanje pomena RSV pri starostnikih temveč vprašanje preventivnih ukrepov proti okužbi RSV v tej populaciji.

V Sloveniji je trenutno zapisanih podatkov o RSV pri starejših od 65 let malo in so del večjih študij, ki niso posvečene izključno RSV *(11, 12)*. Ob številu različnih publikacij na temo RSV je verjetno težje zaslediti objave o RSV in starostnikih, če jih seveda ne iščemo načrtno. Z uporabo multipleks molekularnih metod za dokazovanje respiratornih patogenov smo v preteklem petletnem obdobju v Laboratoriju za klinično molekularno diagnostiko, Oddelka za medicinsko mikro-



Slika 1a. Raznolikost pošiljateljev in število kužnin starostnikov, poslanih na testiranje za respiratorni sincicijski virus (RSV). PCR – verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*), NIJZ – Nacionalni inštitut za javno zdravje, NLZOH – Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, ZD – zdravstveni dom, SB – splošna bolnišnica, UKC – univerzitetni klinični center.



Slika 1b. Raznolikost pošiljateljev in število pozitivnih kužnin za respiratorni sincicijski virus (RSV) starostnikov.

biologijo Maribor, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, opazili povečano število dokazanih primerov RSV pri bolnikih, starejših od 65 let.

Leta 2012 in 2013, ko smo začeli uporabljati test FilmArray RP, smo prejeli manjše število kužnin na to vrsto preiskave, ki so jih odvzeli starostnikom skupno le v 10 primerih. V letih od 2014 do prve polovice leta 2016 so pošiljatelji multipleks PCR (FilmArray RP) zahtevali velikokrat, posledično smo nabrali tudi več kužnin starostnikov. V tem obdobju smo RSV dokazali v 5,3 % (31/588) kužnin (tabela 1). Zaradi prekrivanja kliničnih znakov in podobnega sezonskega pojavljanja RSV, virusov gripe in drugih respiratornih patogenov, sklepamo, da RSV ni bil prva izbira pri postavljanju diagnoze. To potrjuje tudi dejstvo, da smo prejeli naročilo za specifičen PCR na RSV v petletnem testnem obdobju le 10-krat. Rezultat je bil negativen v vseh 10 primerih. Zato je še bolj zanimivo, da smo takrat, ko smo potrdili okužbo z RSV, virus v večini dokazali kot edinega povzročitelja. V šestih primerih smo sicer potrdili koinfekcijo z ostalimi respiratornimi virusi (koronavirusi in rinovirusi), ki pa v večini ne povzročajo težjih okužb dihal *(13)*.

V skoraj polovici kužnin starostnikov, v katerih nismo potrdili RSV, smo dokazali druge patogene, največkrat viruse gripe in rinoviruse (tabela 2). S tem smo še dodatno potrdili, da je klinične znake okužb z omenjenimi virusi težko ločiti. Podobne podatke zasledimo tudi v literaturi *(9, 10)*. V zadnjem času se pogosto sprašujejo, kakšne so prednosti testiranja na vse, tudi klinično manj pomembne, respiratorne patogene. Z uporabo multipleks molekularnih metod, ki podajo informacije o vseh prisotnih virusih pri bolniku, naj bi zmanjšali število bolnišničnih dni in

racionalizirali porabo antibiotikov. Raziskovalci si glede tega niso enotni, vendar velja prepričanje, da je v sezoni respiratornih obolenj potrebno kužnine sočasno testirati vsaj na prisotnost virusov gripe, RSV, človeškega metapneumovirusa in virusov parainfluence *(7, 14)*. Ti podatki se nanašajo na pediatrične bolnike, vendar bi jih lahko prenesli tudi na starostnike.

Kužnine starostnikov, okuženih z RSV, smo v večini prejeli iz dveh oddelkov, iz Oddelka za pljučne bolezni in Oddelka za nalezljive bolezni in vročinska stanja, UKC Maribor. Z leti se je izkazalo, da število različnih oddelkov UKC Maribor in drugih inštitucij, ki pošiljajo kužnine starostnikov, okuženih z RSV, narašča (slika 1a in b). Verjetno smo tudi v teh primerih RSV dokazali slučajno, zaradi uporabe multipleks molekularne metode. Iz oddelkov, ki so poslali največ RSV pozitivnih kužnin, smo prejeli tiste klinične podatke o bolnikih, ki kažejo na težjo okužbo spodnjih dihal. Bolniki starostniki v večini niso bili huje imunsko oslabljeni in so ostali hospitalizirani od 4 do 11 dni (tabela 3). V treh primerih s podaljšano hospitalizacijo so bili vzroki le te drugje. Z izjemo enega bolnika, ki je v bolnišnici ostal 4 dni in ni kazal znakov težje okužbe dihal, so imeli vsi ostali bolniki pljučnico, poslabšanje KOPB in astme ali srčno popuščanje (tabela 3). Tudi podatki iz svetovne literature kažejo, da ima več kot 70 % hospitaliziranih odraslih bolnikov, okuženih z RSV, pljučnico, bronhiolitis, poslabšanje KOPB ali astme *(15–17)*. Obolevnost in smrtnost pri teh bolnikih je celo primerljiva z obolevnostjo in smrtnostjo bolnikov, okuženih z virusi gripe *(18)*. Raziskovalci opozarjajo, da so okužbe odraslih in starostnikov z RSV resen problem, ki zahteva ustrezno mikrobiološko diagnostiko, bolnišnični nadzor nad okužbami z RSV in razvoj novih učinkovitih protivirusnih zdravil in/ali cepiv.

ZAKLJUČEK

Respiratorni sincicijski virus je pomemben respiratorni patogen, ki povzroča težje okužbe dihal pri starostnikih. Tudi v Sloveniji moramo biti pri starostnikih bolj pozorni na okužbe z RSV. V zimskih mesecih je smiselno uporabljati multipleks molekularne metode, s katerimi dokazujemo vsaj viruse gripe in RSV hkrati.

LITERATURA

1. Falsey AR. Respiratory syncytial virus infection in adults. Semin Respir Crit Care Med. 2007; 28 (2): 171–81.
2. Petrovec M. Paramiksovirusi. In: Poljak M, Petrovec M, eds. Medicinska virologija. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011. p. 137–50.
3. Shi T, Balsells E, Wastnedge E, et al. Risk factors for respiratory syncytial virus associated with acute lower respiratory infection in children under five years: Systematic review and meta-analysis. J Glob Health. 2015; 5 (2): 020416.
4. Falsey AR, McElhaney JE, Beran J, et al. Respiratory syncytial virus and other respiratory viral infections in older adults with moderate to severe influenza-like illness. J Infect Dis. 2014; 209 (12): 1873–81.
5. Dowell SF, Anderson LJ, Gary HE Jr, et al. Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults. J Infect Dis. 1996; 174 (3): 456–62.
6. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, et al. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. N Engl J Med. 2005; 352 (17): 1749–59.
7. Krause JC, Panning M, Hengel H, et al. The role of multiplex PCR in respiratory tract infections in children. Dtsch Arztebl Int. 2014; 111 (38): 639–45.

8. Bonroy C, Vankeerberghen A, Boel A, et al. Use of a multiplex real-time PCR to study the incidence of human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus infections during two winter seasons in a Belgian paediatric hospital. Clin Microbiol Infect. 2007; 13 (5): 504–9.
9. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. JAMA. 2003; 289 (2): 179-86.
10. Fleming DM, Cross KW. Respiratory syncytial virus or influenza? Lancet. 1993; 342 (8886-8887): 1507–10.
11. Socan M, Marinic-Fiser N, Kraigher A, et al. Microbial aetiology of community-acquired pneumonia in hospitalised patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1999; 18 (11): 777–82.
12. Gorišek Miksić N. Etiologija virusnih okužb dihal pri oskrbovancih in zaposlenih v domu starejših občanov [doktorsko delo]. Maribor: Univerza v Mariboru; 2016.
13. Lepiller Q, Barth H, Lefebvre F, et al. High incidence but low burden of coronaviruses and preferential associations between respiratory viruses. J Clin Microbiol. 2013; 51 (9): 3039–46.
14. Rhedin S, Lindstrand A, Rotzén-Östlund M, et al. Clinical utility of PCR for common viruses in acute respiratory illness. Pediatrics. 2014; 133 (3): e538–45.
15. Lee N, Qureshi ST. Other viral pneumonias: coronavirus, respiratory syncytial virus, adenovirus, hantavirus. Crit Care Clin. 2013; 29 (4): 1045–68.
16. Backman K, Piippo-Savolainen E, Ollikainen H, et al. Adults face increased asthma risk after infant RSV bronchiolitis and reduced respiratory health-related quality of life after RSV pneumonia. Acta Pediatr. 2014; 103 (8): 850–5.
17. Ramaswamy M, Groskreutz DJ, Look DC. Recognizing the importance of respiratory syncytial virus in chronic obstructive pulmonary disease. COPD. 2009; 6 (1): 64–75.
18. Lee N, Lui GC, Wong KT, et al. High morbidity and mortality in adults hospitalized for respiratory syncytial virus infections. Clin Infect Dis. 2013; 57 (8): 1069–77.

Darja Duh[1], Barbara Blažič[2], Andrej Golle[3], Vojko Berce[4]

Virusi parainfluence tipa 4 – povečano število zaznanih okužb pri otrocih v letu 2015

Parainfluenza Viruses Type 4–Increased Number of Detected Infections in Children in 2015

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: virusi parainfluence tip 4, severovzhodna Slovenija, mikrobiološke diagnostične metode, otroci

IZHODIŠČA. Virusi parainfluence so pogosti in pomembni povzročitelji obolenj dihal pri otrocih, pri katerih povzročajo širok spekter kliničnih znakov. Opisani so štirje tipi virusov parainfluence, med katerimi velja virus parainfluence 4 (angl. *human parainfluenza virus type 4*, HPIV-4) za najmanj zanimivega. Zaradi prepričanja, da povzroča le blago okužbo, in zaradi pomanjkljivih mikrobioloških diagnostičnih testov so bile okužbe s HPIV-4 do nedavnega povečini nezaznavne. METODE. V obdobju od januarja 2014 do junija 2016 smo z multipleks metodo za sočasno dokazovanje patogenov FilmArray Respiratory Panel testirali 2.038 brisov nosno-žrelnega predela. Vključili smo le brise, ki so jih odvzeli bolnikom do 15. leta starosti v severovzhodnem delu Slovenije. REZULTATI. Viruse parainfluence smo dokazali v 158 brisih (7,75 %), pri čemer smo samo tip HPIV-4 dokazali skupno pri 33 bolnikih (21,52 %). Leta 2015 se je s HPIV-4 okužilo 28/33 bolnikov. Z metodo verižne reakcije s polimerazo, specifično za dokazovanje virusov parainfluence, smo uspeli potrditi 15/33 primerov. Pomnožili smo del odseka virusnega gena za beljakovino P. Na osnovi določenega nukleotidnega zaporedja gena P smo ugotovili, da je v letu 2015 prevladoval podtip HPIV-4b (11 bolnikov), medtem ko se je podtip HPIV-4a pojavil trikrat. ZAKLJUČKI. Iz rezultatov študije lahko zaključimo, da je HPIV-4 tudi v Sloveniji pogostejši, kot smo pričakovali. V mikrobiološke diagnostične teste je smiselno vključiti tip HPIV-4. Natančnejše epidemiološke in klinične podatke o pojavljanju HPIV-4 je za Slovenijo potrebno še pridobiti.

[1] Doc. dr. Darja Duh, univ. dipl. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor, darja.duh@nlzoh.si

[2] Barbara Blažič, univ. dipl. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

[3] Asist. mag. Golle Andrej, dr. med., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Center za medicinsko mikrobiologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

[4] Doc. dr. Vojko Berce, dr. med., Klinika za pediatrijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor

ABSTRACT

KEY WORDS: parainfluenza viruses type 4, north-eastern Slovenia, microbiological diagnostic tests, children

Backgrounds. Parainfluenza viruses (HPIV) are one of the most abundant respiratory pathogens and are amongst the most important causes of respiratory illnesses with variety of clinical manifestations in children. Four types of HPIV are known and HPIV-4 is considered as the least important. Due to the general opinion that the infection with HPIV-4 is usually mild and because of the lack of good microbiological diagnostic tests, HPIV-4 was until recently rarely detected. METHODS. In the period from January 2014 until June 2016, 2,038 nasopharyngeal swabs were tested with multiplex PCR FilmArray Respiratory Panel. Swabs were taken from children aged up to 15 in the north-eastern part of Slovenia. RESULTS. Overall, parainfluenza viruses were detected in 158 swabs samples (7.75%) and in 33 samples (21.52%) type HPIV-4 was detected. In the year 2015 alone, 28/33 cases of HPIV-4 were detected. Using the HPIV specific PCR assay, 15/33 cases were confirmed and the part of viral P gene was amplified. Nucleotide sequences of P gene revealed type HPIV-4b as the most prevalent (11 patients) in 2015. Type HPIV-4a was also present but less abundant (3 patients). CONCLUSIONS. Based on the results of the present study, we can conclude that HPIV-4 is more abundant in Slovenia than previously anticipated. It would be important to include HPIV-4 in the microbiological diagnostic tests. Further studies are needed to obtain the complete epidemiological and clinical information about HPIV-4 in Slovenia.

IZHODIŠČA

Virusi parainfluence (angl. *human parainfluenza viruses*, HPIV) so pogosti in pomembni povzročitelji okužb dihal pri ljudeh, predvsem pri otrocih do vstopa v šolo *(1)*. Do danes so opisali štiri genetske in antigenske tipe HPIV, ki jih uvrščajo v družino *Paramyxoviridae*. Tipa HPIV-1 in HPIV-3 sodita v rod *Respirovirus*, tipa HPIV-2 in HPIV-4 sodita v rod *Rubulavirus* (http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp). Virusi parainfluence so v večini okrogli virusi, lahko so tudi polimorfne oblike, velikosti od 150 do 600 nm *(2)*. Genom predstavlja linearna enovijačna negativno polarna RNA molekula velikosti reda 15 kbp. Obdana je s heliksno simetrično nukleokapsido in z lipoproteinsko ovojnico. Šest genov HPIV genoma nosi informacijo za strukturne beljakovine, ki so organizirane v zaporedju 3`-N-P-M-F-HN-L-5` *(2)*.

HPIV-4 velja izmed vseh HPIV za klinično najmanj pomembnega in ga v večini povezujejo z blagimi respiratornimi obolenji. Izolirali so ga leta 1959 iz kužnine študenta z blažjo okužbo zgornjega respiratornega trakta *(3)*. Leta 1993 so Rubin in sodelavci opisali 10 primerov okužb s HPIV-4 pri otrocih in zaključili, da lahko okužba s HPIV-4 poteka težje, kot so sprva mislili *(4)*. Izpostavil je, da od prve izolacije HPIV-4 do leta 1993 ni zapisov o kliničnem spektru bolezni, ki jo lahko povzroča ta virus. Razlogov, da je bil HPIV-4 znanstveno in strokovno dokaj nezanimiv, je več. Med njimi je vsekakor zahtevna izolacija in kultivacija virusa na celičnih kulturah. HPIV-4 raste izredno počasi na celični liniji LLC-MK2, ki ni pogosta v virooloških laboratorijih. Prav tako ne tvori vedno citopatskega učinka *(5)*. Problem pri dokazovanju HPIV-4 so predstavljale tudi diagnostične metode, bodi-

si serološki bodisi molekularnobiološki testi. Pomnoževanje RNA HPIV-4 z metodo PCR ni tehnično nič zahtevnejše od dokazovanja ostalih virusov parainfluence. Dejstvo pa je, da so bili komercialno dostopni kompleti reagentov pripravljeni tako, da so zajeli le tipe HPIV 1 do 3 ne pa tudi HPIV-4 *(4, 6)*. Zaradi prepričanja, da povzroča le blago okužbo, in zaradi pomanjkljivo pripravljenih molekularnobioloških diagnostičnih testov so bile okužbe s HPIV-4 do nedavnega zapostavljene in povečini nezaznavne.

V zadnjem desetletju so posvetili HPIV-4 nekoliko več pozornosti in ga dokazali kot povzročitelja nekaj izbruhov po svetu *(6, 7)*. V retrospektivnih študijah so opisali epidemiološke značilnosti kot tudi spekter kliničnih stanj pri okužbi s HPIV-4 *(8–11)*. Zaključili so, da lahko HPIV-4 povzroča okužbe spodnjega respiratornega trakta pri otrocih, kjer ga povezujejo z bronhiolitisom in s pljučnico. Zanimivo je tudi, da je bil statistično manj pogost povzročitelj krupa od HPIV-1 in HPIV-2 *(9)*.

V Laboratoriju za klinično molekularno diagnostiko Oddelka za medicinsko mikrobiologijo Maribor Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) že nekaj let uporabljamo test FilmArray Respiratory Panel (FilmArray RP v 1.7; BioFire, BioMerieux Company, Francija). S testom, ki temelji na metodi ugnezdeni PCR, sočasno dokazujemo širok nabor povzročiteljev okužb dihal med drugim tudi HPIV-4.

V letu 2015 smo pri otrocih zaznali povečano število dokazanih primerov HPIV-4 v primerjavi z leti 2014 in 2016. V literaturi so opisali, da ima lahko test FilmArray RP pomanjkljivosti, kot so zmanjšana specifičnost in/ali občutljivost za dokazovanje določenih patogenov (npr. *Bordetella pertussis*) *(12)*. Zanimalo nas je, ali je povečano število odraz dejanskega stanja oziroma izbruha v letu 2015 ali je morebiti posledica nespecifičnega delovanja testa. V nadaljevanju smo opisali tudi nekatere genetske značilnosti HPIV-4 pri dokazanih primerih iz leta 2015.

METODE

V raziskavo smo vključili kužnine bolnikov, starih do 15 let. To si bili dakronski brisi nosno-žrelnega predela, ki smo jih sprejeli v laboratorij v letih 2014 do 2016. Upoštevali smo kužnine, poslane iz vseh oddelkov in ambulant Klinike za pediatrijo in iz Oddelka za nalezljive bolezni in vročinska stanja, Univerzitetnega kliničnega centra Maribor, z naročeno vrsto preiskave multipleks PCR za respiratorne patogene.

Brisom smo ob sprejemu v laboratorij po potrebi dodali sterilno fiziološko raztopino do največ 2 ml, vsebino premešali na vorteksu in shranili v hladilniku pri 4 °C za največ en dan. S kužninami vedno rokujemo v mikrobiološki komori druge varnostne stopnje in pri tem upoštevamo navodila za varno delo v molekularnem biološkem laboratoriju.

Za dokazovanje povzročiteljev okužb dihal smo uporabili test FilmArray RP (v 1.7, BioFire) z oznako CE-IVD. Test smo izvedli po navodilih proizvajalca. K reagentu Sample Buffer smo dodali 300 µl kužnine in reagente rehidrali v FilmArray kartuši. Vnos reagentov in kužnine v kartušo poteka po principu vakuuma. Kartušo smo označili s protokolno številko in jo prenesli v aparat FilmArray. V računalniški program, preko katerega je voden aparat, smo vnesli ustrezne podatke s čitalcem črtne kode na kartuši. V roku ene ure smo na aparatu odčitali rezultat. Aparat je zaprt sistem, ki omogoča sočasno ekstrakcijo nukleinskih kislin (NK), tj. DNA in RNA, dokazovanje patogenov z ugnezdeno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (angl. *real-time polymerase chain reaction*, RT-PCR) s talilno krivuljo ter analizo rezultatov. Po končani reakciji smo kartušo zavrgli.

Iz kužnin, v katerih smo s testom FilmArray RP dokazali prisotnost RNA HPIV-4, smo ekstrahirali NK še za potrebe specifičnega PCR za dokazovanje vseh tipov HPIV. Avtomatsko ekstrakcijo NK smo izvedli na aparatu InviGenius® in uporabili komercialni komplet reagentov Invimag® Universal Kit/IG (STRATEC Molecular GmbH, Berlin, Nemčija). Princip ekstrakcije temelji na uporabi magnetnih delcev in ustreznih pufrov. Reagenti in aparat nosijo oznako CE-IVD ter omogočajo ekstrakcijo iz 12 različnih kužnin v roku 70 minut. Pri delu smo upoštevali navodila proizvajalca.

V ekstrahiranih NK smo dokazovali prisotnost RNA HPIV s komercialno dostopno metodo PCR v realnem času RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0 (Altona Diagnostics GmbH, Hamburg, Nemčija), ki vsebuje vse reagente za izvedbo testa. Z metodo pomnožimo določen del genoma, ki ga proizvajalec v navodilih sicer ne navede, zapiše pa, da metoda temelji na principu delovanja hidrolizirajočih sond. Vse reakcije smo izvedli in analizirali na aparatu Rotor-Gene® Q5-plex Platform (Qiagen, USA).

Za potrebe določanja nukleotidnega zaporedja in tipizacije HPIV-4 smo pomnožili kratek odsek gena za beljakovino P, ki je v nukleokapsidi HPIV zastopana s 300 molekulami *(1)*. Uporabili smo predhodno opisane začetne oligonukleotide PI4P F 5`CTGAACGGTTGCATTCAGGT in PI4P R 5`TTGCATCAAGAATGAGTCCT, s katerimi pomnožimo 433 bp dolg odsek gena P. Za ugnezdeni PCR smo uporabili začetne oligonukleotide PI4S F 5` AAAGAATTAGGTGCAACCAGTC in PI4S R 5`GTGTCTGATCCCATRAGCAG, s katerimi pomnožimo 246 bp dolg odsek gena P. Upoštevali smo pogoje reakcije, opisane v izvirnem članku *(13)*. Nukleotidno zaporedje smo določili s Sangerjevim sekveniranjem na aparatu 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Uporabili smo komplet reagentov BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, 36 cm dolg osem kapilarni sistem in polimer POP7. Identiteto zaporedij smo preverili v genski banki podatkov BLAST® (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) in jih obdelali z računalniškim paketom MEGA6, pri čemer smo za poravnavo sekvenc uporabili program CLUSTAL, za izris dendograma metodo neighbor-joining, model K2 in 1000 ponovitev *(14)*.

Podatke o kužninah, o pošiljatelju, vrsti uporabljene metode in rezultatu za vsa tri leta smo zbrali v računalniških programih MBL in K21 analize, SRC Infonet d.o.o.

REZULTATI

V obdobju od 1. januarja 2014 do 30. junija 2016 smo prejeli 2.038 brisov nosno-žrelnega predela, odvzetih pri otrocih, starih do 15 let. S testom FilmArray RP smo HPIV dokazali v 158 brisih (7,75 %). Izmed vseh pozitivnih HPIV smo tip HPIV-4 dokazali skupno v 34 brisih, odvzetih 33 bolnikom (21,52 %). Osemindvajset od vseh 33 HPIV-4 bolnikov smo glede na datum odvzema kužnine uvrstili v leto 2015 (tabela 1). Pri 14 izmed vseh HPIV-4 pozitivnih kužnin smo dokazali prisotnost dodatnih respiratornih virusov in sicer rinovirusov, enterovirusov, koronavirusov, adenovirusov, respiratornega sincicijskega virusa ter ostalih tipov HPIV (tabela 1).

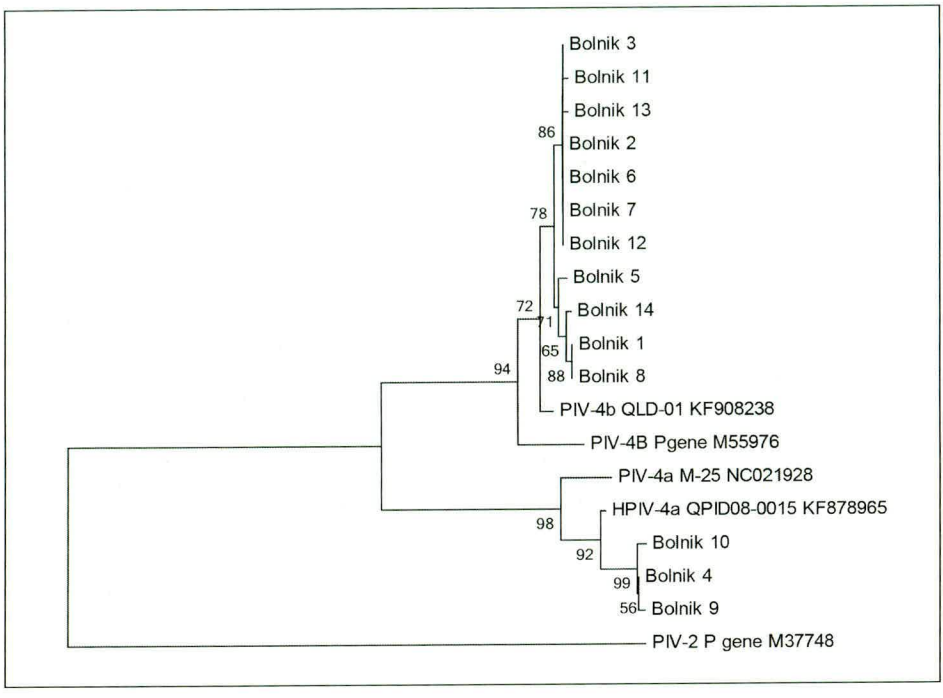
Iz vseh 34 kužnin, ki smo jih hranili na –20°C in v katerih smo s testom FilmArray RP potrdili prisotnost HPIV-4, smo ponovno ekstrahirali RNA. S specifičnim PCR (RealStar® PIV RT-PCR Kit 2.0) smo potrdili prisotnost RNA HPIV-4 le v 7 primerih (tabela 1).

Odsek gena P HPIV-4 smo iz istih RNA pomnožili v 15 primerih (tabela 1), pri čemer smo v 4 primerih pridobili PCR-produkt šele z ugnezdenim PCR.

Nukleotidno zaporedje 403 oziroma 210 bp dolgega odseka gena P HPIV-4 (dolžina zaporedja potem ko smo odstranili sekvence začetnih oligonukleotidov) smo uspešno določili pri 14 izmed 15 PCR-produktov (tabela 1). S primerjavo v BLAST smo pokazali, da v je 11 primerih HPIV-4 najbolj soroden HPIV-4b – sev QLD-01, ki so ga izolirali iz odraslega bolnika v Avstraliji *(15)*. V treh primerih je HPIV-4 iz te študije pokazal največjo podobnost s HPIV-4a – izolat QPID08-0015, ki je bil

Tabela 1. Rezultati potrjevanja HPIV-4 pozitivnih bolnikov, starih do 15 let (FilmArray RP). Neg – negativen, poz – pozitiven, AdV – adenovirusi, hRV – rinovirusi (angl. *human rhinovirus*), hEV – enterovirusi (angl. *human enterovirus*), CoV – koronavirusi (angl. *coronavirus*), RSV – respiratorni sincicijski virus, HPIV – virusi parainfluence 1 do 4 (angl. *human parainfluenza virus*), Ct – vrednost praga zaznavne pomnožene DNA (angl. *cycle treshold value*), * – sekveniranje je bilo v tem primeru neuspešno.

Leto	Bolnik	Datum rojstva	Rezultat		
			FilmArray RP, vsi HPIV-4 poz	RT-PCR Altona (Ct)	RT-PCR P gen
			koinfekcija		1. PCR/ugnezdeni PCR
2014	bolnik 15	27. 12. 2010	AdV, hRV	neg	neg/neg
2014	bolnik 16	28. 5. 2010	RSV, hEV	neg	neg/neg
2014	bolnik 17	27. 10. 2013		neg	neg/neg
2015	bolnik 18	26. 11. 2008		neg	neg/neg
2015	bolnik 5	1. 4. 2013		neg	neg/poz
2015	bolnik 7	5. 12. 2001	AdV	poz (33,75)	poz
2015	bolnik 3	7. 4. 2013		neg	poz
2015	bolnik 6	15. 1. 2015		neg	poz
2015	bolnik 19	27. 11. 2012		neg	neg/neg
2015	bolnik 4	4. 11. 2014	RSV	poz (24,67)	poz
2015	bolnik 2	27. 10. 2009	hRV	poz (30,55)	poz
2015	bolnik 20	18. 1. 2014		neg	neg/neg
2015	bolnik 21	29. 1. 2014		neg	neg/neg
2015	bolnik 1	21. 11. 2013	AdV, hRV, hEV	poz (25,31)	poz
2015	bolnik 20	18. 1. 2014	hRV	neg	neg/neg
2015	bolnik 22	11. 8. 2015		neg	neg/poz*
2015	bolnik 14	6. 6. 2014		neg	neg/poz
2015	bolnik 13	2. 6. 2014		neg	neg/poz
2015	bolnik 23	4. 11. 2010		neg	neg/neg
2015	bolnik 24	20. 7. 2013		neg	neg/neg
2015	bolnik 11	7. 5. 2014	AdV, hRV	neg	poz
2015	bolnik 25	16. 5. 2014		neg	neg/neg
2015	bolnik 12	31. 8. 2011		neg	poz
2015	bolnik 10	11. 8. 2015		poz (28,83)	poz
2015	bolnik 9	15. 9. 2015		poz (30,44)	poz
2015	bolnik 26	8. 8. 2015	HPIV-1, hRV	neg	neg/neg
2015	bolnik 28	28. 11. 2007		neg	neg/neg
2015	bolnik 29	10. 7. 2011	HPIV-2	neg	neg/neg
2015	bolnik 30	12. 1. 2013	hEV, CoV	neg	neg/neg
2015	bolnik 31	3. 4. 2012	HPIV-1	neg	neg/neg
2016	bolnik 32	31. 1. 2012		neg	neg/neg
2016	bolnik 33	14. 3. 2012	AdV, hRV, CoV	neg	neg/neg



Slika 1. Dendogram, izrisan iz poravnave 210 bp dolgega odseka gena P različnih HPIV-4 in HPIV-2. Oznake nukleotidnih zaporedij iz te študije ustrezajo številkam bolnikov v tabeli 1. HPIV – virusi parainfluence (angl. *human parainfluenza virus*).

prav tako opisan v Avstraliji (neobjavljeni podatki). Za izris dendograma smo uporabili 210 dolg odsek gena P HPIV-4, ker v vseh primerih nismo pridobili daljšega PCR-produkta. Dendogram prikazuje slika 1. Nukleotidna zaporedja iz te študije smo poslali v gensko banko podatkov za pridobitev identifikacijske številke (angl. *accession number*), na katere še čakamo.

RAZPRAVA

V družbi je pogosto tako, da določene navidezne resnice ljudje prenašajo iz roda v rod, ne da bi jih vsaj delno oziroma v celoti potrdili. Iz prebiranja svetovne literature, delovnih izkušenj v mikrobiološkem laboratoriju in aktualnih podatkov, prikazanih v tej študiji, menimo, da je HPIV-4 šolski primer prav take lažne resnice. Na splošno so virusi parainfluence pomembni povzročitelji respiratornih obolenj pri otrocih in odraslih in povzročajo širok spekter kliničnih znakov vključujoč faringitis, otitis media, konjuktivitis, krup, bronhiolitis in pljučnico *(1, 16)*. Sezonski izbruhi HPIV predstavljajo v svetu 40 % vseh hospitalizacij otrok zaradi obolenj spodnjega respiratornega trakta in celo 75 % vseh primerov krupa *(16)*. Je pa res, da so v večini kot klinično pomembni obravnavani le tipi HPIV-1, 2 in 3. Opisan in pred mnogimi leti izoliran je tudi tip HPIV-4, ki ga ločijo na dva podtipa HPIV-4a in 4b. Čeprav je v zadnjem desetletju pridobil na pomembnosti in je statistično gledano celo bolj pogost povzročitelj bronhiolitisa in pljučnice kot HPIV-1 in 2, je v literaturi še vedno obravnavan kot klinično najmanj zanimiv virus parainfluence *(6, 8, 9, 16)*.

V Sloveniji je objavljenih epidemioloških in/ali kliničnih podatkov o HPIV malo. Večina so dostopni v tedenskih poročilih, ki ga izdajata NIJZ in NLZOH, in izhajajo iz Nacionalnega programa za gripo ali so del večjih študij s poudarkom na različnih respiratornih virusih *(17)*. Dejstvu, da smo bili tudi v Sloveniji nepozorni na HPIV-4, so najverjetneje botrovali izbrani diagnostični testi. V zadnjem času smo v mikrobioloških laboratorijih začeli uporabljati različne metode PCR za sočasno dokazovanje respiratornih virusov, med katere je bil vključen tudi HPIV-4. V severovzhodnem delu Slovenije smo v letu 2015, v primerjavi z leti 2014 in 2016, pri otrocih zaznali povečano število okužb s HPIV-4. Pri 17 od 28 bolnikov iz leta 2015 smo z metodo FilmArray RP dokazali HPIV-4 kot edinega virusnega povzročitelja respiratornega obolenja, medtem ko smo v preostalih 11 primerih dokazali še dodatne viruse (tabela 1). V pilotni raziskavi, v kateri smo pregledali pojavljanje HPIV v severovzhodnem delu Slovenije v letih 2014 in 2015, smo ugotovili, da je HPIV-3 najpogostejši povzročitelj in predstavlja 49,71 % (86/173) vseh zaznanih HPIV-okužb, sledi mu HPIV-4, ki predstavlja 21,39 % (37/173) in nato še HPIV-1 in HPIV-2 *(18)*. Visoko število zaznanih HPIV-4 v letu 2015, ki je po literaturi sodeč najmanj pogost tip izmed HPIV, je vzbudilo naše zanimanje.

Za multipleks metode je značilno, da imajo lahko na račun sočasne zaznave večjega števila različnih tarč v enem vzorcu nekoliko zmanjšano specifičnost in občutljivost. Tudi test FilmArray RP se srečuje s podobnimi problemi *(12)*. Vendar v primeru dokazovanja HPIV-4 nismo zasledili objav, ki bi prikazovale slabše delovanje tega testa. S komercialnim, certificiranim PCR-testom, specifičnim za HPIV (Altona) smo uspeli potrditi le 7 od vseh 34 HPIV-4, zaznanih s FilmArray RP (tabela 1). Možnosti za takšno razhajanje je več, med prvimi slabša specifičnost testa FilmArray RP. Po kliničnih podatkih sodeč (ustna komunikacija s pediatrom) so rezultati sovpadali s stanjem bolnikov, ki so bili v večini hospitalizirani. Tudi iz validacijskega poročila testa FilmArray RP je razvidno, da je bil HPIV zajet v validacijo in je pri vrednosti 30 TCID50/ml (LoD) pokazal 100 % ponovljivost, zanesljivost ter nobene navzkrižne reaktivnosti z ostalimi tipi HPIV. Če privzamemo, da je test specifičen, je naslednja možna razlaga slabša občutljivost komercialnega PCR za HPIV proizvajalca Altona. V tem primeru je potrebno preveriti ekstrakcijo NK in tarčni gen, ki ga pomnožujemo v obeh testih. Metoda, ki smo jo uporabili za avtomatsko ekstrakcijo NK, temelji na enakem principu delovanja (magnetni delci) kot tista, ki je vključena v test FilmArray RP. Tarčni gen za dokazovanje HPIV v testu FilmArray RP je gen za F-protein. Žal podatkov o tarčnem genu v komercialnem PCR nismo dobili. Smo pa z metodo PCR, s katero smo pomnoževali odsek gena P za dokazovanje nukleotidnega zaporedja, dokazali več HPIV-4 in potrdili, da je bilo vsaj 15 rezultatov testa FilmArray RP pravilnih. V virusni nukleokapsidi je beljakovina P zastopana s številnimi molekulami *(1)*. S primerjavo nukleotidnega zaporedja v genski banki podatkov smo pokazali, da sta med otroci v letu 2015 krožila dva podtipa HPIV-4, to sta HPIV-4b (11 primerov, slika 1) in HPIV-4a (3 primeri, slika 1). V nekaj preostalih primerih, v katerih z nobeno od dodatnih metod nismo uspeli potrditi HPIV-4, lahko predvidevamo, da je bila klinična slika morebiti posledica okužbe z ostalimi respiratornimi virusi, ki smo jih prav tako zaznali s FilmArray RP v istih kužninah (tabela 1).

ZAKLJUČKI

Iz rezultatov te študije lahko zaključimo, da je HPIV-4 tudi v Sloveniji pogostejši, kot smo pričakovali. V SV Sloveniji smo bili v letu 2015 priča izbruhu HPIV-4, v katerem sta med otroki, starimi do 15 let, krožila dva podtipa, HPIV-4a in 4b. Natančnejše epidemiološke in klinične podatke o pojavljanju HPIV-4 je za Slovenijo potrebno še pridobiti.

LITERATURA

1. Paramiksovirusi. In: Poljak M, Petrovec M. Medicinska virologija. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011. p. 137–50.
2. Chattopadhyay S, Esper F, Banerjee K. Parainfluenza Viruses. In: Samal SK, ed. The biology of paramyxoviruses. Caister Academic Press, 2001. p. 175–209.
3. Johnson KM, Chanock RM, Cook MK, et al. Studies of a new human hemadsorption virus. I. Isolation, properties and characterization. Am J Hyg. 1960; 71: 81–92.
4. Rubin EE, Quennec P and McDonald JC. Infections due to parainfluenza virus type 4 in children. Clin Infect Dis. 1993; 17: 998–1002.
5. Vachon ML, Dionne N, Leblanc E, et al. Human parainfluenza type 4 infections, Canada. Emerg Infect Dis. 2006; 12 (11): 1755–8.
6. Lau SKP, To WT, Tse PWT et al. Human parainfluenza virus 4 outbreak and the role of diagnostic tests. J Clin Microbiol. 2005; 43 (9): 4515–21.
7. Abiko C, Mizuta K, Aoki Y, et al. An Outbreak of parainfluenza virus type 4 infections among children with acute respiratory infections during the 2011–2012 winter season in Yamagata, Japan. Jpn J Infect Dis. 2013; 66 (1): 76–8.
8. Frost HM, Robinson CC, Dominguez SR. Epidemiology and clinical presentation of parainfluenza type 4 in children: a 3-year comparative study to parainfluenza types 1–3. J Infect Dis. 2014; 209 (5): 695–702.
9. Fathima S, Simmonds K, Invik J, et al. Use of laboratory and administrative data to understand the potential impact of human parainfluenza virus 4 on cases of bronchiolitis, croup, and pneumonia in Alberta, Canada. BMC Infect Dis. 2016; 16 (1): 402.
10. McFarlane HJ, MacDonald J, Collins TC, et al. Severe pneumonia after cardiac surgery as a result of infection with parainfluenza virus type 4. Cardiothorac Vasc Anesth. 2009; 23 (1): 84–6.
11. Swamy MA, Malhotra B, Reddy PVJ, et al. Distribution and trends of human parainfluenza viruses in hospitalised children. Indian J Pediatr. 2016; 83 (10): 1109–13.
12. Jerris RC, Williams SR, MacDonald HJ, et al. Testing implications of varying targets for *Bordetella pertussis*: comparison of the FilmArray respiratory panel and the focus *B. pertussis* PCR assay. J Clin Pathol. 2015; 68 (5): 394–6.
13. Aguilar JC, Pérez-Breña MP, García ML, et al. Detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4 in clinical samples of pediatric patients by multiplex reverse transcription-PCR. J Clin Microbiol. 2000; 38 (3): 1191–5.
14. Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 2013; 30 (12): 2725–9.
15. Bialasiewicz S, McVernon J, Nolan T, et al. Detection of a divergent parainfluenza 4 virus in an adult patient with influenza like illness using next-generation sequencing. BMC Infect Dis. 2014; 14: 275.
16. Branche AR. And Falsey AR. Parainfluenza Virus Infection. Semin Respir Crit Care Med. 2016; 37 (4): 538–54.
17. Pokorn M, Jevšnik M, Petrovec M, et al. Respiratory and enteric virus detection in children: a prospective study comparing children with febrile seizures and healthy controls. J Child Neurol. 2016; pii: 0883073816670820.
18. Blažič B, Duh D, Volmajer N, et al. An overview of human parainfluenza virus 1–4 infections in Northeastern Slovenia based on molecular detection. J Clin Virol. 2016; 82 Suppl: 115–6.

Tina Uršič[1], Marko Kozjek[2], Martin Sagadin[3], Monika Jevšnik[4], Uroš Krivec[5], Marko Pokorn[6], Miroslav Petrovec[7]

Kako pomemben je virus parainfluence 4 pri otrocih v Sloveniji?

How Important is Parainfluenza Virus 4 in Slovene Children?

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: virus parainfluence 4, okužbe dihal, pediatrični bolniki

Virus parainfluence 4 (PIV 4) je bil prvič dokazan leta 1960. Poznamo dva podtipa PIV 4, in sicer PIV 4a in PIV 4b. Virusi parainfluence so najpogosteje odgovorni za milejše oblike respiratornih težav, rutinsko pa jih dokazujejo le posamezni laboratoriji. PIV 4 so slabše poznani povzročitelji okužb dihal; v literaturi je opisanih le malo epidemioloških raziskav in kliničnih primerov okužb dihal, osamitev virusa na celični kulturi je težavna, primanjkuje pa tudi antigenskih testov, s katerimi je možen dokaz virusa. Razvoj in izboljšave specifičnega RT-PCR za dokaz PIV 4 ponuja nove možnosti detekcije, ki so hitrejše, bolj specifične in občutljivejše v primerjavi s klasičnimi tehnikami diagnostike. Novi podatki zaradi vse širše uporabe naprednejše diagnostike nakazujejo na večjo razširjenost in pogostnost PIV 4, kot smo predvidevali do sedaj. V slovenski raziskavi iz leta 2015, v katero smo vključili 2.474 otrok do šestega leta starosti, smo PIV 4, kot edinega povzročitelja okužbe dihal, dokazali pri 40 otrocih (1,6 %) in je predstavljal 33,9 % vseh okužb, ki so jih v letu 2015 povzročili PIV 1–4. Dokazali smo, da PIV 4 povzroča sezonske okužbe z vrhom okužb v avgustu, najpogosteje (3,1 %) smo virus dokazali pri otrocih med petim in šestim letom starosti. Akutna okužba zgornjih dihal (45 %) in pljučnica (22,5 %) sta bili najpogosteje postavljeni diagnozi. Podporno zdravljenje s kisikom je potrebovalo 27,5 % otrok in kar 60 % otrok je imelo pridruženo drugo poglavitno osnovno bolezen. Rezultati naše raziskave so pokazali, da je PIV 4 pomemben povzročitelj okužb dihal pri otrocih, zato ga vključujemo v rutinsko diagnostiko respiratornega panela.

[1] Asist. razisk. dr. Tina Uršič, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; tina.ursic@mf.uni-lj.si

[2] Marko Kozjek, štud. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

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

[4] Asist. dr. Monika Jevšnik, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

[5] Uroš Krivec, dr. med., Služba za pljučne bolezni, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Bohoričeva ulica 20, 1525 Ljubljana

[6] Asist. mag. Marko Pokorn, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana

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

ABSTRACT

KEY WORDS: parainfluenza virus 4, respiratory infections, hospitalized children

Parainfluenza virus 4 (PIV 4) was first described in 1960. There are two subtypes of PIV 4, PIV 4a and PIV 4b. PIV 4 is rarely routinely detected. A limited number of studies showed that PIV 4 is mainly responsible for milder respiratory infections. It remains difficult to isolate the virus cell cultures and the lack of antigen tests further complicates the diagnostics of PIV 4. The PIV 4 pathogenicity is underestimated since the virus is rarely routinely detected and the available data comprise of only a small number of published reports of epidemiological studies and clinical cases of respiratory infections. The development and improvement of specific RT-PCR for the detection of PIV 4 offers new possibilities for detection. These techniques are faster, more specific and sensitive in comparison with conventional diagnostic techniques. Due to the wider use of advanced diagnostics, new data indicate a higher prevalence of PIV 4 than we expected based on existing data. In 2015, we conducted a study, which included 2,474 Slovene children less than 6 years of age, to assess the importance of PIV 4 infections in pediatric patients. PIV 4 was detected as a single respiratory pathogen in 40 children (1.6%) with respiratory infections and that accounted for 33.9% of all infections caused by PIV 1–4 in 2015. PIV 4 was most frequently (3.1%) detected in children between five and six years of age. The seasonal distribution of PIV 4 infections with a peak in August 2015 was also detected. Acute upper respiratory infection (45%) and pneumonia (22.5%) were the most commonly diagnosed. Supplemental oxygen for respiratory insufficiency was given to 27.5% of children and 60% of children had an associated underlying disease. The results of our study showed that PIV 4 is an important respiratory pathogen; therefore we included the virus into routine diagnostics in the so-called respiratory panel.

UVOD

V družino Paramyxovirus uvrščamo sedem rodov, med njimi tudi rodova Respirivirus, v katerega uvrščamo virusa parainfluence (angl. parainfulenza virus, PIV) 1 in 3, ter Rubulavirus, v katerega uvrščamo PIV 2 in 4. PIV so veliki 150–250 nm, obdani z ovojnico, v kateri je nesegmetiran negativno polaren RNA-genom velikosti 15 kilo baznih parov (kbp), ki kodira šest strukturnih beljakovin. Virusi parainfluence so pomembni respiratorni patogeni, odgovorni za okužbe zgornjih in spodnjih dihal. Virusi parainfluence 1–3 ob okužbi dihal povzročajo širok spekter kliničnih slik od blagega prehlada, akutne okužbe zgornjih dihal (angl. upper respiratory tract infection, URTI) do krupa ter težke klinične slike z bronhiolitisom in pljučnico (1).

Možne so seveda tudi asimptomatske okužbe (2). Ogrožene so vse starostne skupine, predvsem pa majhni otroci in imunsko oslabljene osebe (3, 4). Viruse parainfluence 1–3 v laboratorijih rutinsko dokazujejo s serološkimi metodami in osamitvijo virusa na celičnih kulturah (5). V zadnjem času so se razvile molekularno diagnostične tehnike, predvsem dokaz nukleinskih kislin PIV 1–4 z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času, s predhodno reverzno transkripcijo (angl. real-time reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) (6).

PIV 4 je bil prvič dokazan leta 1960. Poznamo dva podtipa PIV 4, in sicer PIV 4a in PIV 4b (7). Večinoma so odgovorni za milejše oblike respiratornih težav, vendar jih rutinsko dokazujejo le v posameznih laboratorijih. PIV 4 je manj poznan povzročitelj okužb dihal; v literaturi je opisanih le malo epidemioloških raziskav in kliničnih primerov okužb dihal, osamitev virusa na celični kulturi je težavna, primanjkuje pa tudi antigenskih testov, s katerimi je možen dokaz virusa. Razvoj in izboljšave specifičnega RT-PCR za dokaz PIV 4 ponujajo nove možnosti dokazovanja, ki so hitrejše, bolj specifične in občutljive v primerjavi s klasičnimi diagnostičnimi tehnikami. Novi podatki zaradi vse širše uporabe naprednejše diagnostike nakazujejo na večjo razširjenost in pogostnost PIV 4, kot smo predvidevali do sedaj.

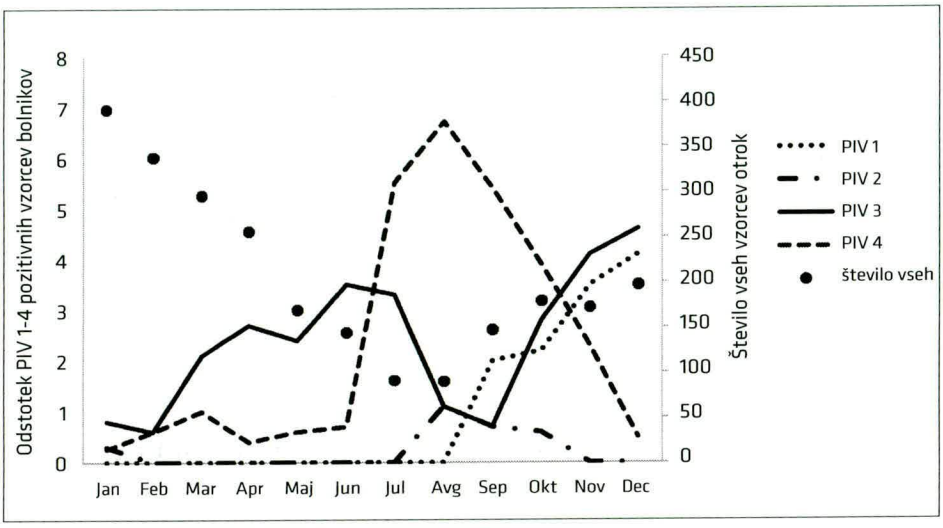
EPIDEMIOLOGIJA

Virusi parainfluence so razširjeni po vsem svetu, vendar je znano, da virusa PIV 1 in PIV 3 na področju Evrope dokažemo pogosteje kot PIV 2 in PIV 4, slednja nekoliko pogosteje dokažejo v Ameriki in Kanadi. Virusi parainfluence 1–4 se tako kot drugi respiratorni virusi prenašajo prek izločkov dihal. Virusi parainfluence 1–4 povzročajo okužbe dihal pri vseh starostnih skupinah, še posebno so nevarne okužbe pri imunsko oslabelih posameznikih *(8, 9)*. Pogostost okužb, ki jih povzroča PIV 4, je različna, v literaturi opisujejo, da okužbe, ki jih povzroča PIV 4, predstavljajo med 5 % in 43 % vseh okužb, ki jih povzročajo virusi parainfluence *(10–13)*.

REZULTATI SLOVENSKE RAZISKAVE

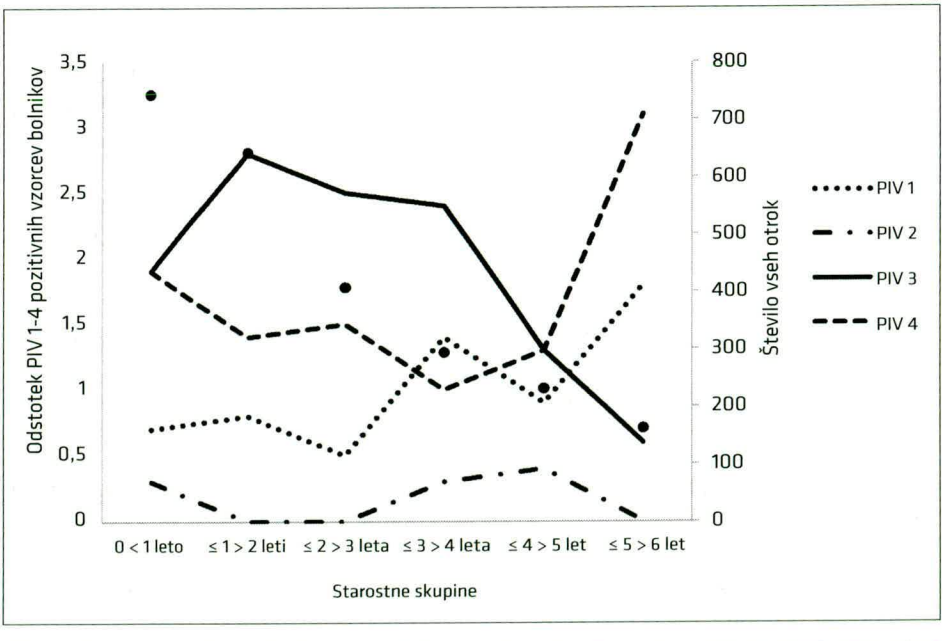
Na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani v sklopu rutinske diagnostike respiratornih virusov z metodo RT-PCR v realnem času dokazujemo prisotnost virusov influence A in B (Inf A/B), respiratorni sincicijski virus (RSV), človeški metapnevmovirus (angl. *human metapneumovirus*, hMPV), rinoviruse (angl. *human rhinovirus*, hRV), človeške koronaviruse (angl. *human coronavirus*, HcoV; HCoV-HKU1, HCoV-NL63, HCoV-OC43 in HCoV-229E), adenoviruse (AdV), človeški bokavirus 1 (angl. *human bocavirus*, HboV; HBoV1), PIV 1–3 ter enteroviruse (EV). Da bi ugotovili, kakšna je pogostost in klinična pomembnost PIV 4, smo zasnovali raziskavo. Vanjo smo vključili 700 obolelih otrok, starih do šest let, ki so bili v letu 2015 poslani na diagnostiko virusnih povzročiteljev okužb dihal in so bili negativni na vse respiratorne viruse, ki jih dokazujemo v sklopu respiratornega panela. PIV 1–4 smo v letu 2015 kot edine povzročitelje okužbe dokazali pri 4,8 % (118/2.474) otrok do šestega leta starosti, oziroma so PIV 1–4 pri le teh povzročili 6,7 % (118/1.752) vseh virusnih okužb dihal. PIV 4 smo, kot edinega povzročitelja dokazali pri 40 otrocih, medtem ko smo PIV 1 dokazali pri 21 otrocih, PIV 2 pri 4 otrocih in PIV 3 pri 53 otrocih. Okužbe s PIV 4 so tako predstavljale 33,9 % vseh okužb, ki so jih v letu 2015 povzročili PIV 1–4.

Okužbe dihal, ki jih je povzročil PIV 4 pri otrocih do šestega leta, so bile v letu 2015 sezonsko razporejene, in sicer smo PIV 4 najpogosteje dokazali med julijem in novembrom, z vrhom okužb v avgustu. Medtem, ko smo PIV 3 dokazali skozi celo leto, s prvim vrhom okužb v juniju in drugim večjim vrhom okužb v decembru, smo okužbe s PIV 1 dokazali le v drugi polovici leta, z vrhom okužb v decembru. PIV 2 smo dokazali le pri 4 pediatričnih bolnikih, zato je o sezonah pri tem virusu, na podlagi razpoložljivih podatkov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, težko govoriti (slika 1).



Slika 1. Sezonsko pojavljanje virusov parainfluence 1–4 v letu 2015 pri pediatričnih bolnikih do šestega leta starosti. PIV – virus parainfluence (angl. *parainfulenza virus*).

Mediana starosti otrok, okuženih s PIV 4, je bila eno leto, povprečna starost pa 1,68 let (standardna deviacija = 1,52). Okuženih je bilo več dečkov (n = 24) kot deklic (n = 16), razmerje 1,5:1. Čeprav smo največje število otrok okuženih s PIV 4 (14/40) dokazali v prvi starostni skupini do enega leta starosti, pa glede na veliko



Slika 2. Pogostnost pojavljanja virusov parainfluence 4 pri otrocih po starostnih skupinah. PIV – virus parainfluence (angl. *parainfulenza virus*).

število poslanih vzorcev otrok iz te starostne skupine pogostost okužbe s PIV 4 v tej starostni skupini ni najvišja. Pogostost okužbe s PIV 4 pada do petega leta starosti, nato pa v (3,1 %) v starostni skupini otrok med petim in šestim letom doseže najvišjo pogostost (slika 2).

V letu 2015 smo najvišjo pogostost okužbe s PIV 3 kot edinim povzročiteljem dokazali pri otrocih v starostni skupini med prvim in drugim letom starosti. Ugotovili smo, da pogostost okužbe s PIV 1 s starostjo počasi narašča in je najvišja v starostni skupini med petim in šestim letom.

Retrospektivno smo iz bolniške dokumentacije za otroke z dokazano okužbo dihal povzročeno s PIV 4 pridobili klinične podatke o poteku bolezni, simptomih in znakih, diagnozi in morebitnih osnovnih boleznih (tabela 1). Večina otrok (90 %), z okužbo dihal, povzročeno s PIV 4, je bila hospitaliziranih. Sedem otrok (27,5 %) je potrebovalo zdravljenje s kisikom, kar 15 (37,5 %) pa jih je prejemalo tudi antibiotično terapijo. Povišano telesno temperaturo je imelo 29 otrok (72,5 %), kar 24 otrok (60 %) pa je imelo tudi osnovno bolezen. Najpogostejši diagnozi sta bili akutna okužba zgornjih dihal, ki je bila zabeležena pri 18 otrocih (45 %), in pljučnica, ki je bila potrjena pri 9 otrocih (22,5 %) (tabela 1).

Tabela 1. Značilnosti otrok z okužbo dihal povzročeno z virusom parainfluence 4.

Značilnosti otrok okuženih z virusom parainfluence 4		**Število (%)**
Spol	**dečki : deklice**	**1,5 : 1**
Starostne skupine	0 > 1 leta	14 (35,0)
	< 1 ≥ 2 let	9 (22,5)
	< 2 ≥ 3 let	6 (15,0)
	< 3 ≥ 4 let	3 (7,5)
	< 4 ≥ 5 let	3 (7,5)
	< 5 ≥ 6 let	5 12,5)
Zdravljenje	bolnišnično	36 (90,0)
	s kisikom	7 (27,5)
	antibiotično	15 (37,5)
Povišana telesna temperatura	prisotna	29 (72,5)
Diagnoza	okužba zgornjih dihal	18 (45,0)
	laringitis	1 (2,5)
	akutni bronhitis*	5 (12,5)
	akutni bronhiolitis	3 (7,5)
	bronhopnevmonija	2 (5,0)
	pljučnica	9 (22,5)
	okužba zgornjih dihal + AGE	1 (2,5)
	akutni broniolitis + OMA + AGE	1 (2,5)
Osnovne bolezni	prisotne	24 (60)
Dokazani drugi povzročitelji	v dihalih[a]	2 (5)
	drugje[b]	3 (5)

[a] dihala: *H. Influenzae*, [b] drugje: blato – rotavirus, urin – *P. aeruginosa*

ZAKLJUČEK

PIV 1–4 so pomembni povzročitelji okužb dihal tako pri otrocih kot tudi pri osebah iz drugih starostnih skupin. V naši raziskavi smo viruse PIV 1–4 dokazali pri 4,8 % vseh otrok z okužbo dihal do šestega leta starosti, pri čemer je bil PIV 4 drugi najpogostejši povzročitelj (33,9 %) okužb dihal med PIV. Iz literature je znano, da PIV 1–3 povzročajo od asimptomatskih okužb, akutnih okužb zgornjih dihal, laringitisa, pa vse do krupa, bronhitisa in broniolitisa ter poslabšanja osnovnih bolezni *(14)*, vendar naj bi PIV 1 in PIV 2 pogosteje povzročala krup, PIV 3 pa so večkrat povezali z bronhiolitisom in pljučnico *(14–16)*. V naši raziskavi smo pokazali, da tudi PIV 4 povzroča tako akutne okužbe zgornjih dihal kot tudi bronhitis, bronhiolitis ter pljučnico, slednja je bila druga najpogosteje postavljena klinična diagnoza (22,5 %). O prevalenci PIV 4 v Evropi se je do nedavnega vedelo zelo malo. Španska prospektivna raziskava na otrocih do 14. leta starosti iz leta 2011 je podobno kot naša raziskava pokazala, da sta med parainfluencami najpogostejša PIV 3 in PIV 4 *(17)*. V triletni (2010–2013) kanadski raziskavi, objavljeni v letošnjem letu, so dokazali 2.300 primerov okužbe s PIV 1–4, pri čemer je bila okužba s PIV 3 najpogostejša (46 %), sledile so okužbe s PIV 1 (27 %), PIV 4 (16 %) ter PIV 2 (11 %). Med bolniki, pri katerih so dokazali okužbo s PIV 4, sta bili najpogostejši klinični diagnozi pljučnica (21 %) in bronhiolitis (18 %) *(18)*. V naši raziskavi smo virus PIV 4 dokazali kot drugi najpogostejši PIV v letu 2015 pri otrocih do šestega leta starosti. Glede na rezultate raziskave in obstoječo literaturo smo po opravljeni evalvaciji in raziskavi PIV 4 vključili v respiratorni panel; tako bomo PIV 4 v sezoni 2016/2017 dokazovali rutinsko, skupaj z ostalimi znanimi virusnimi povzročitelji okužb dihal (PIV 1–3, Flu A/B, RSV, hMPV, hRV, hCoV, HBoV1, AdV in EV).

LITERATURA

1. Downham MA. Clinical significance of parainfluenza virus infections in children. Arch Dis Child. 1973; 48 (10): 824.
2. Collins KR, Easton AJ. Sequence variation in the haemagglutinin-neuraminidase gene of human parainfluenza virus type 3 isolates in the UK. Epidemiol Infect. 1995; 114 (3): 493–500.
3. Rubin EE, Quennec P, McDonald JC. Infections due to parainfluenza virus type 4 in children. Clin Infect Dis. 1993; 17 (6): 998–1002.
4. Laurichesse H, Dedman D, Watson JM, et al. Epidemiological features of parainfluenza virus infections: laboratory surveillance in England and Wales, 1975–1997. Eur J Epidemiol. 1999; 15 (5): 475–84.
5. Henrickson KJ. Parainfluenza viruses. Clin Microbiol Rev. 2003; 16 (2): 242–64.
6. Echevarria JE, Erdman DD, Swierkosz EM, et al. Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, and 3 from clinical samples by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 1998; 36 (5): 1388–91.
7. Canchola J, Vargosko AJ, Kim HW, et al. Antigenic Variation among Newly Isolated Strains of Parainfluenza Type 4 Virus. Am J Hyg. 1964; 79: 357–64.
8. Hohenthal U, Nikoskelainen J, Vainionpaa R, et al. Human parainfluenza type 4 virus (hPIV4) infection provoking many questions regarding the role of this virus as the causative agent of respiratory tract infections in the post-transplant setting. Bone Marrow Transplant. 2002; 29 (7): 629–30.
9. Maeng SH, Yoo HS, Choi SH, et al. Impact of parainfluenza virus infection in pediatric cancer patients. Pediatr Blood Cancer. 2012; 59 (4): 708–10.
10. Liu WK, Liu Q, Chen DH, et al. Epidemiology and clinical presentation of the four human parainfluenza virus types. BMC Infect Dis. 2013; 13: 28.

11. Ren L, Gonzalez R, Xie Z, et al. Human parainfluenza virus type 4 infection in Chinese children with lower respiratory tract infections: a comparison study. J Clin Virol. 2011; 51 (3): 209–12.
12. Frost HM, Robinson CC, Dominguez SR. Epidemiology and clinical presentation of parainfluenza type 4 in children: a 3-year comparative study to parainfluenza types 1-3. J Infect Dis. 2014; 209 (5): 695–702.
13. Vachon ML, Dionne N, Leblanc E, et al. Human parainfluenza type 4 infections, Canada. Emerg Infect Dis. 2006; 12 (11): 1755–8.
14. Downham MA, McQuillin J, Gardner PS. Diagnosis and clinical significance of parainfluenza virus infections in children. Arch Dis Child. 1974; 49 (1): 8–15.
15. Marx A, Torok TJ, Holman RC, et al. Pediatric hospitalizations for croup (laryngotracheobronchitis): biennial increases associated with human parainfluenza virus 1 epidemics. J Infect Dis. 1997; 176 (6): 1423–7.
16. Schomacker H, Schaap-Nutt A, Collins PL, et al. Pathogenesis of acute respiratory illness caused by human parainfluenza viruses. Curr Opin Virol. 2012; 2 (3): 294–9.
17. Calvo C, Garcia-Garcia ML, Ambrona P, et al. The burden of infections by parainfluenza virus in hospitalized children in Spain. Pediatr Infect Dis J. 2011; 30 (9): 792–4.
18. Fathima S, Simmonds K, Invik J, et al. Use of laboratory and administrative data to understand the potential impact of human parainfluenza virus 4 on cases of bronchiolitis, croup, and pneumonia in Alberta, Canada. BMC Infect Dis. 2016; 16 (1): 402.

Helena Ribič[1], Irena Grmek Košnik[2], Edita Eberl Gregorič[3], Matej Dolenc[4], Gordana Sivec[5], Miroslav Petrovec[6]

Primer izbruha gripi podobne bolezni v regionalni bolnišnici

Outbreak of an Influenza-like Disease in a Regional Hospital

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: rinovirusi, izbruh okužbe dihal, starostniki, oddelek za zdravstveno nego

IZHODIŠČA. Virusi so pogosti povzročitelji resnih okužb dihal in izbruhov pri starostnikih in osebah z oslabljeno imunostjo. Prikazujemo izbruh okužb dihal na Oddelku za zdravstveno nego Splošne bolnišnice Jesenice. METODE. V času od 24. 2. do 27. 2. 2014 je na oddelku zbolelo deset od sedemnajstih bolnikov in ena zdravstvena delavka. Pri vseh obolelih smo zbrali podatke o pojavu bolezni, klinični sliki in osnovnih boleznih. Pri vseh smo opravili mikrobiološko diagnostiko gripe, pri petih bolnikih in pri zdravstveni delavki pa tudi diagnostiko na viruse parainfluence, respiratorni sincicijski virus, človeški metapnevmovirus in na respiratorne adenoviruse. Ker so bili rezultati vseh mikrobioloških preiskav negativni, smo pri treh bolnikih in pri zdravstveni delavki diagnostiko razširili še na ostale viruse okužb dihal vključno z rinovirusi, bokavirusi in respiratornimi enterovirusi. REZULTATI. Pri vseh bolnikih je bila preiskava na virus gripe negativna; pri dveh bolnicah sta bila pozitivna hkrati rinovirus in respiratorni enterovirus, pri eni bolnici je bil pozitiven človeški bokavirus. Pri zdravstveni delavki je bil rezultat vseh preiskav negativen. Z ukrepi za obvladovanje okužb smo izbruh zamejili v štirih dneh, od 28. 2. 2014 dalje novih primerov nismo zaznali. ZAKLJUČKI. Glede na mikrobiološke rezultate, časovno in geografsko povezanost primerov ter klinično sliko zaključujemo, da je bil izbruh najverjetneje povzročen z rinovirusom. Z dobrim timskim delom smo izbruh hitro in uspešno omejili.

[1] Helena Ribič, dr. med., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj, Center za medicinsko mikrobiologijo, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj; helena.ribic@nlzoh.si

[2] Doc. dr. Irena Grmek Košnik, dr. med., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj, Center za medicinsko mikrobiologijo, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj; Območna enota Kranj, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj

[3] Mag. Edita Eberl Gregorič, univ. dipl. biol., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj, Center za medicinsko mikrobiologijo, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj

[4] Matej Dolenc, dr. med., Splošna bolnišnica Jesenice, Cesta maršala Tita 112, 4270 Jesenice

[5] Gordana Sivec, dipl. m. s. Splošna bolnišnica Jesenice, Cesta maršala Tita 112, 4270 Jesenice

[6] Prof. dr. Miroslav Petrovec, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 7, 1000 Ljubljana

ABSTRACT

KEY WORDS: rhinovirus, outbreak of lower respiratory infection, elder patients, long-term care

BACKGROUNDS. Viruses are a frequent causing agent of serious respiratory infections and outbreaks in elderly and immune-deficient persons. We present the outbreak in the long-term-care department of the Regional hospital Jesenice. METHODS. Between February 24 and 27, 2014, ten patients (of seventeen) and one health care worker showed respiratory symptoms. We collected data about the illness onset, clinical signs and symptoms, chronic diseases and performed flu diagnostics in all patients and the care worker. In five patients and the health care worker, an additional microbiological test, which included parainfluenza virus, syncytial respiratory virus, human metapneumovirus, and respiratory adenovirus, was performed. All test results were negative; therefore, microbiology diagnostics was expanded to other respiratory viruses, including rhinoviruses, respiratory enteroviruses and human bocaviruses in three patients and health care worker. RESULTS. All patients were negative for flu, two patients were positive for rhinovirus and respiratory enterovirus, one patient was positive for human bocavirus. The health care worker was negative with all tests. With all infection control measures in place, the outbreak ended in four days on February 28. CONCLUSIONS. According to the microbiological results, the geographical and temporal relatedness of cases, clinical signs and symptoms, we concluded the outbreak was most probably caused by rinoviruses. Good teamwork resulted in a rapid end of the outbreak.

UVOD

Gripa in gripi podobne bolezni (GPB) so pogost povzročitelj izbruhov okužb dihal v zdravstvenih in socialno-varstvenih ustanovah v zimskih mesecih. Med povzročitelji so najpogostejši virusi gripe, virusi parainfluence, respiratorni sincicijski virusi (RSV), v zadnjih letih pa vse pogosteje poročajo tudi o rinovirusih (RV), respiratornih enterovirusih (REV), humanih bokavirusih (HBoV) in humanih metapnevmovirusih (hMPV) *(1, 2)*.

RV in REV uvrščamo v družino *Picornaviridae*, rod *Enterovirus*. Pri RV poznamo 101 serotip, razdelimo jih v skupine A, B in C, pri enterovirusih pa 66 serotipov, ki jih uvrščamo v štiri skupine: A, B, C in D *(1)*. RV so najpogostejši povzročitelj okužb zgornjih dihal v vseh starostnih skupinah. Okužba je običajno blaga in mine brez zapletov sama od sebe. Povsem drugače je pri starostnikih in imunsko oslabljenih, pri katerih se lahko razvije huda pljučnica, poslabšanje kronične obstruktivne bolezni ali zagon astme, lahko se pojavijo tudi obsežni izbruhi *(1, 3–8)*. Pri skoraj dveh tretjinah starostnikov z okužbo z RV se razvije tudi okužba spodnjih dihal *(8)*. Pomembno vlogo pri nastanku hude okužbe imajo osnovne bolezni, kot so kronična obstruktivna pljučna bolezen, astma, cistična fibroza in kajenje *(1, 8)*. Enterovirusi so obsežna skupina virusov s tropizmom za številne vrste celic (npr. celice srčne mišice, perikarda). V skupinah C in D so enterovirusi, ki jih najdemo le v dihalih in jih imenujemo REV. Sorodni so rinovirusom in povzročajo podobne okužbe *(1)*.

HBoV so razmeroma novi virusi, znani dobrih deset let. Uvrščamo jih v družino *Parvoviridae*, poddružino *Parvovirinae* in rod *Bocavirus*. Razdelimo jih v štiri skupine (HBoV 1 do 4), okužbe dihal povzroča

le prva (HBoV1) *(2, 10, 11)*. Okužbe dihal so najpogostejše pri majhnih otrocih. Pri odraslih se pojavljajo predvsem pri imunsko oslabljenih, o okužbah pri starostnikih pa so podatki skopi. Sicer so okužbe s HBoV pogoste, protitelesa proti HBoV so ugotovili pri 94 % odraslih *(10)*. Galvan in sodelavci navajajo, da virusi gripe povzročijo 8 % doma pridobljenih virusnih pljučnic pri odraslih, RV 6 % in HBoV < 1 % *(11)*.

Hitra prepoznava GPB in mikrobiološka diagnostika sta pomembni za zgodnjo zamejitev širjenja okužbe in za pravočasno zdravljenje gripe, za druge virusne okužbe dihal protivirusnih zdravil ni. Še pred nekaj leti so v večini kliničnih mikrobioloških laboratorijev za diagnostiko okužb dihal uporabljali le direktni imuno-fluorescenčni test (DIF), ki vključuje diagnostiko virusov influence A in B, parainfluence 1, 2 in 3, hMPV, RSV in respiratornih adenovirusov. Pomanjkljivost DIF je razmeroma majhna občutljivost *(12)*. Večji laboratoriji so imeli na voljo tudi teste za verižno pomnoževanje nukleinskih kislin s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) za viruse influence, nekateri tudi za RSV. To je veljalo tudi za laboratorije v Sloveniji. Če s temi testi povzročitelja okužbe niso ugotovili, je ostal večinoma neopredeljen; redko so vzorce pošiljali v referenčne in druge laboratorije z večjim naborom testov. Šele sodobne molekularne metode, ki vključujejo tudi diagnostiko RV, REV in HBoV, so omogočile širše dokazovanje teh virusov in prepoznavanje njihovega pomena, tako pri posamičnih primerih kot tudi pri izbruhih okužb. Ne glede na izboljšano diagnostiko pa nekaj retrospektivnih raziskav dokazuje, da se incidenca in prevalenca okužb z RV in REV večata *(1)*.

V pričujočem prispevku prikazujemo primer izbruha GPB v februarju 2014 na Oddelku za zdravstveno nego (OZZN) v Splošni bolnišnici Jesenice.

METODE

Potek izbruha

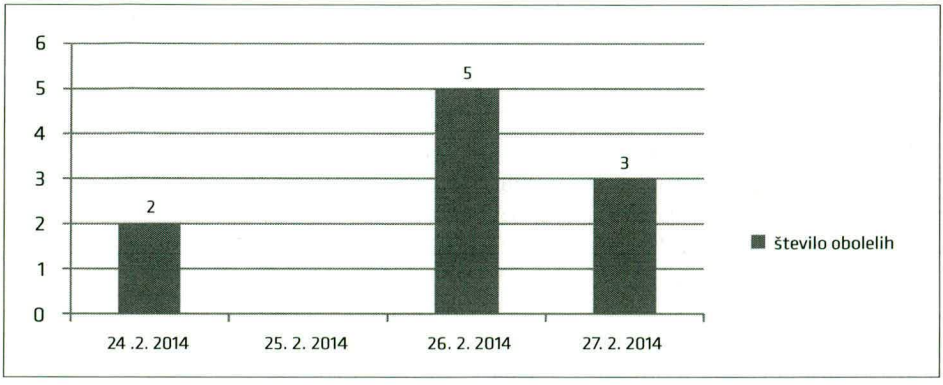
Na OZZN je 15 postelj za neakutno obravnavo in pet postelj, ki so namenjene pacientom s kronično rano in so akutno obravnavani. Oddelek vodi diplomirana medicinska sestra. Pacienta na OZZN premestijo iz drugih oddelkov bolnišnice. Bivanje je omejeno na 30 dni. Ob spremembi zdravstvenega stanja se v obravnavo ponovno vključi zdravnik, ki je pacienta obravnaval pred prihodom na OZZN. Izbruh GPB se je na OZZN začel 24. 2. 2014, ko sta v sobi 56 zboleli dve bolnici (bolnica 1: 73 let; bolnica 2: 90 let). Imeli sta vročino (38,5 °C in 37,9 °C), kašelj, 90-letna je navajala slabo počutje in utrujenost. V isti sobi so 26. 2. in 27. 2. 2014 s podobnimi znaki zbolele še tri bolnice (bolnica 3: 91 let; bolnica 4: 88 let, bolnica 5: 93 let), imele so povišano telesno temperaturo (37,8 °C do 38,8 °C), kašelj in utrujenost. Dva dni po začetku izbruha, 26. 2. 2014, sta z znaki okužbe dihal zbolela tudi dva bolnika v sobi 53 (bolnik 6: 73 let in bolnik 7: 62 let). Bolnik 7 je bil na oddelek premeščen po ortopedski operaciji, pred leti je prebolel možgansko kap, imel je kronično obstruktivno pljučno bolezen (KOPB) in bronhiektazije. Zbolel je s temperaturo 39 °C, težkim dihanjem in splošno oslabelostjo. Iz vzorca aspirata traheje, odvzetega 27. 2. 2014, je bila ugotovljena bakterija *Moraxella catarrhalis*. Zaradi naglega slabšanja stanja in dihalne stiske je bil še isti dan premeščen v internistično intenzivno enoto, kjer je naslednji dan umrl. Vzrok smrti je bil septični šok ob obojestranski pljučnici. V enoti intenzivne terapije so bili izpostavljeni štirje bolniki in devet zaposlenih, vendar v času dveh tednov po stiku z zbolelim pri nobenem ni bilo ugotovljenih znakov virusne okužbe dihal.

Do 27. 2. je bilo na OZZN izpostavljenih 17 bolnikov, skupaj jih je zbolelo 10.

Časovni potek izbruha je prikazan na sliki 1. Devet bolnikov je bilo sprejetih na oddelek 48 ur ali več pred pojavom prvih znakov, ena bolnica pa okrog 24 ur. Vsi bolniki so bili v bolnišnico sprejeti najmanj štiri dni pred pojavom prvih znakov. Dva bolnika sta bila na OZZN premeščena z internega oddelka, osem pa s kirurškega. Sedem jih je navajalo utrujenost, dva bolečine v mišicah, pri sedmih je bil prisoten kašelj. Bolniki so bili stari od 52 do 93 let, povprečna starost je bila 77 let. Vsi bolniki so bili stari in/ali imeli resno osnovno bolezen: KOPB (3 bolniki), sladkorno bolezen (3 bolniki), demenco (2 bolnika) in po en bolnik srčno popuščanje, kronično ledvično bolezen, stanje po možganski kapi in multiplo sklerozo s paraplegijo. Trije bolniki so bili nepokretni, sedem pa jih je bilo delno pokretnih. Samo en bolnik je bil v sezoni 2013/2014 cepljen proti gripi. Simptomi so trajali od 2 do 7 dni. Od 28. 2. 2014 dalje novih primerov okužb ni bilo. Razen umrlega so vsi bolniki okrevali brez posledic. Na OZZN je bilo času izbruha izpostavljenih 21 zaposlenih zdravstvenih delavcev (ZD), med katerimi je ena zbolela 24. 2. 2014. Nekaj dni pred tem je bila na dopustu. Povezava z izbruhom je bila vprašljiva.

Mikrobiološka diagnostika

Vsem desetim bolnikom in oboleli ZD so bili za diagnostiko gripe z metodo PCR odvzeti vzorci nosno-žrelnega predela; rezultati so bili pri vseh negativni. Pri petih bolnikih je bil opravljen tudi test DIF na RSV, hMPV, viruse parainfluence in respiratorne adenoviruse, vsi rezultati so bili negativni. Teste PCR in DIF so opravili na Oddelku za medicinsko mikrobiologijo Centra za medicinsko mikrobiologijo NLZOH Kranj. Da bi razširili diagnostiko še na druge viruse okužb dihal, smo vzorce nosno-žrelnega predela treh bolnic in obolele ZD poslali na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, kjer je bil opravljen multiplex PCR--test na viruse: RSV, hMPV, rinoviruse, človeške koronaviruse, viruse parainfluence, viruse influence A in B, adenoviruse, človeške bokaviruse in enteroviruse (FilmArray, BioFire Diagnostics, LLC, Utah, ZDA). Izbrali smo prvo zbolelo in dve bolnici, stari 91 in 88 let, ki sta bili najbolj prizadeti. Pri bolnici 1 je bil ugotovljen bokavirus, pri bolnicah 3 in 4 sta bila ugotovljena REV in RV, pri ZD je bil rezultat negativen.



Slika 1. Časovni potek izbruha s številom obolelih glede na datum začetka znakov okužbe v obdobju od 24. 2. do 27. 2. 2014.

Ukrepi za omejitev izbruha

Za viruse, ki povzročajo okužbe dihal, na splošno velja, da se prenašajo predvsem kapljično s kihanjem, kašljanjem in govorjenjem ter z drobnimi delci v zraku, ki se sprožijo predvsem pri invazivnih posegih v dihalih. Pri RV pa je pomembnejši prenos s stikom (neposredno, posredno), ki ga olajšuje tesen stik z onesnaženimi rokami in/ali z onesnaženimi površinami *(1, 13)*. RV na onesnaženih rokah preživi tudi več ur *(1)*. Vstopno mesto za okužbo so nos ali oči, iz slednjih se virusi širijo v nos preko solznega kanala.

Po prvih dveh primerih je osebje oddelka aktivno spremljalo pojavljanje novih primerov z rednim merjenjem telesne temperature in ugotavljanjem znakov okužbe dihal, predvsem kašlja. Pri bolnikih so izvajali standardne higienske ukrepe, ukrepe kapljične in kontaktne izolacije. Zaposleni so bili opozorjeni, da je potrebno dosledno izvajanje higiene rok in uporaba osebne varovalne opreme (zaščitne maske, po potrebi zaščite za oči in zaščitnih rokavic). Okrepili so higienske ukrepe v bolnikovi neposredni okolici in drugih površinah v bolniški sobi, uporabljali so pripomočke za enkratno uporabo. Prevoz bolnikov so omejili le na nujne preiskave, pred prevozom so bolniku namestili zaščitno masko. V 5 sob, kjer so bili bolniki z znaki okužbe dihal, novih bolnikov do konca izbruha niso sprejemali. Obiski na oddelku so bili omejeni na eno zdravo odraslo osebo. Medicinske sestre so izvajale zdravstveno vzgojno delo z bolniki in obiskovalci (higiena kašlja: ob kašljanju in kihanju si mora bolnik pokriti nos in usta s papirnatim robčkom, ki ga po uporabi odvrže v posebej pripravljeno vrečko za odpadke; po vsakem kašljanju, kihanju in drugem onesnaženju rok z izločki dihal si mora roke umiti ali razkužiti). Če je bolnik nosil kirurško masko, mu jo je ZD zamenjal, ko je bila mokra oz. najkasneje po 30 minutah in po tem izvedel higieno rok. Izbruh so prijavili epidemiološki službi Nacionalnega inštituta za javno zdravje, enota Kranj.

REZULTATI IN RAZPRAVA

Hkratna ugotovitev RV in REV pri dveh bolnicah ni pomenila, da sta bili okuženi z obema, ampak, da sta pri metodi PCR hkrati reagirala gena na obeh tarčah *(1)*. Zaradi genetske podobnosti obeh vrst je bilo namreč v času izbruha z metodo PCR praktično nemogoče popolno ločevanje. Virusa bi bilo možno ločiti s sekveniranjem, za kar se nismo odločili, ker je bil izbruh hitro omejen. Čeprav je bil RV/REV ugotovljen le pri dveh od treh testiranih bolnikov, pa geografska in časovna povezanost primerov ter klinična slika kažejo na to, da je bil izbruh najverjetneje povzročen z RV. RV in REV v zimskem času intenzivno krožijo med prebivalstvom, na OZZN bi ga lahko zanesel obiskovalec ali zdravstveni delavec. Ker so bili na oddelku le starostniki in resno bolni, se je virus razširil, najverjetneje preko rok zdravstvenih delavcev in/ali preko onesnaženih površin in opreme. Nekaj bolnikov je bilo delno pokretnih, zato so lahko z virusom onesnažili površine, ki so se jih dotikali. Z učinkovitimi ukrepi je bil izbruh hitro omejen, po štirih dneh novih primerov nismo več ugotovili.

Natančnejši pregled strokovnih člankov je pokazal, da so RV med najpogostejšimi povzročitelji izbruhov okužb dihal med oskrbovanci v varstvenih ustanovah. Longtin in sodelavci navajajo, da so RV v drugi polovici leta 2009 povzročili kar 59 % izbruhov okužb dihal v varstvenih ustanovah v Kanadi *(5)*. Smrtne primere so zabeležili v štirih izbruhih; med skupaj 102 obolelima je bilo smrtnih primerov 13 (13 %) *(5)*. Tudi v obravnavnem izbruhu so zboleli bolniki, starejši od 65 let. Le dva bolnika sta bila mlajša, stara 52 in 62 let, vendar sta imela resno kronično bolezen. Pri 62-letnem bolniku po ortopedski

operaciji, možganski kapi, s KOPB in bronhiektazijami se je dan po pojavu kliničnih znakov razvila huda dihalna stiska, bolnik je bil premeščen v intenzivno enoto in je naslednji dan umrl. Iz dokumentacije je bilo razvidno, da se je septični šok razvil ob obojestranski pljučnici, h kateri je lahko poleg okužbe z bakterijo *M. catarrhalis* pripomogla tudi okužba z RV. Med obolelimi je bila tudi zdravstvena delavka, vendar povezave z izbruhom nismo mogli potrditi.

Ker so v tem času (februar 2014) med prebivalstvom krožili tudi drugi respiratorni virusi in glede na to, da je bil pri eni izmed bolnic ugotovljen humani bokavirus, je možno, da je bilo nekaj primerov povzročenih tudi s tem virusom. Okužbe z bokavirusi so praviloma blage, poročila o izbruhih so izjemno redka *(2, 11)*.

V času izbruha smo v laboratoriju Oddelka za medicinsko mikrobiologijo NLZOH Kranj uporabljali multiplex PCR-preiskavo za ugotavljanje virusov gripe, preiskav na RV, REV in HBoV nismo izvajali. Danes uporabljamo PCR-preiskavo tudi za druge viruse, ki povzročajo okužbe dihal, vključno z RV, in pričakujemo, da bomo imeli v prihodnjih letih veliko podatkov o razširjenosti RV in drugih virusov v regiji in o njihovi povezavi z izbruhi.

ZAKLJUČEK

Izbruh okužb dihal na OZZN je bil najverjetneje posledica okužbe z RV. Kot je razvidno iz drugih raziskav, so RV pogosti povzročitelji okužb spodnjih dihal pri starostnikih in pri odraslih bolnikih z motnjami imunosti ter so med virusi najpogostejši povzročitelj izbruhov okužb pri starostnikih. Izbruh je bil razmeroma hitro zamejen, kar je posledica učinkovite obravnave, doslednega izvajanja higienskih ukrepov in zelo dobrega sodelovanja ter pretoka informacij med zdravniki, zaposlenimi v zdravstveni negi, mikrobiologi in epidemiologi.

ZAHVALA

Za pomoč pri obravnavi izbruha se zahvaljujemo gospe Lidiji Ahec, dipl. m. s., ki je bila v času izbruha sestra za obvladovanje bolnišničnih okužb v Splošni bolnišnici Jesenice. Za sodelovanje se zahvaljujemo tudi zaposlenim v zdravstveni negi in drugemu osebju Oddelka za zdravstveno nego Splošne bolnišnice Jesenice.

LITERATURA

1. Royston L, Tapparel C. Rhinoviruses and respiratory enteroviruses: not so simple as ABC. Viruses. 2016; 8 (1). pii: E16.
2. Schildgen O. Human Bocavirus: Lessons Learned to Date. Pathogens. 2013; 2: 1–12
3. Louie JK, Yagi S, Nelson JA, et al. Rhinovirus Outbreak in a Long Term Care Facility for Elderly Persons Associated with Unusually High Mortality. CID. 2005; 41: 262–5.
4. Asner S, Peci A, Marchand-Austin A, et al. Respiratory viral infections in institutions from late stage of the first and second waves of pandemic influenzaA(H1N1) 2009, Ontario, Canada. Influenza Other Respir Viruses. 2012; 6 (3): e11–5.
5. Longtin J, Marchand-Austin A, Winter AL, et al. Rhinovirus outbreaks in long-term care facilities, Ontario, Canada. Emerg Infect Dis. 2010; 16: 1463–5.
6. Falsey AR, Walsh EE, Hayden FG. Rhinovirus and coronavirus infection-associated hospitalizations among older adults. J Infect Dis. 2002; 185: 1338–41.
7. Lejko Zupanc T. Pljučnice-specialni del. In: Tomažič J, Sterle F, eds. Infekcijske bolezni. 1st ed. Ljubljana: Združenje za infektologijo, Slovensko zdravniško društvo; 2014/2015. p. 281–8.

8. Nicholson KG, Kent J, Hammersley V, et al. Risk factors for lower respiratory complications of rhinovirus infections in elderly people living in the community: prospective cohort study. BMJ. 1996; 313: 1119–23.
9. Jartti L, Langen H, Söderlund-Venermo M, et al. New Respiratory Viruses and the Elderly. Open Respir Med J. 2011; 5: 61–9.
10. Berry M, Gamieldien J, Fielding BC. Identification of New Respiratory Viruses in the New Millennium. Viruses. 2015; 7, 996–1019.
11. Galvan JM, Rajas O, Aspa J. Review of Non-bacterial Infections in Respiratory Medicine: Viral Pneumonia. Arch Bronconeumol. 2015; 51 (11): 590–7.
12. Ginocchio CC, McAdam AJ. Current best practises of respiratory virus testing. J Clin Microbiol. 2011; 49 (9): S44–8.
13. Gwaltney Jm Jr. Rhinovirus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005. p. 2185–94.

Monika Jevšnik[1], Tina Uršič[2], Lara Lusa[3], Miroslav Petrovec[4]

Diagnostika virusov, ki povzročajo okužbe dihal, s testom Film Array (Idaho Technology): prednost ali slabost?

Detection of Respiratory Viruses with FilmArray (Idaho Technology): Advantage or Disadvantage?

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: respiratorni virusi, akutna virusna okužba dihal, FilmArray, RT-PCR v realnem času

IZHODIŠČA. Diagnostika virusov, ki povzročajo okužbe dihal, je zelo pomembna zaradi epidemiološkega vidika ter predvsem zaradi zmanjševanja nepotrebne uporabe antibiotikov. METODE. V tej raziskavi smo primerjali FilmArray panel za respiratorne viruse (Idaho Technology, Inc., Salt Lake city, UT) z molekularno diagnostiko (RT-PCR v realnem času), ki jo rutinsko uporabljamo za dokazovanje virusov, ki povzročajo okužbe dihal. REZULTATI. Med 234 vzorci bolnikov, ki so bili v obdobju med junijem 2012 in julijem 2016 poslani na diagnostiko virusov, ki povzročajo okužbe dihal, smo z metodo FilmArray RP potrdili etiologijo akutne okužbe dihal pri 135/234 (57,7 %) bolnikov, z RT-PCR v realnem času pa pri 122/234 (52,1 %). ZAKLJUČKI. Metodi se popolnoma ujemata le pri določanju respiratornega sincicijskega virusa (RSV). Največja odstopanja so se pokazala pri določanju rinovirusov (HRV) in enterovirusov (EV). Predvsem pa metoda ni primerna za testiranje majhnih otrok z akutnim bronhiolitisom, saj ne vključuje človeškega bokavirusa (HBoV). Zaradi nizke občutljivosti metoda ni primerna za testiranje virusa influence A (FluA). Metoda FilmArray je zaradi visoke cene, enostavne in hitre izvedbe primerna predvsem za nujne bolnike, predvsem tiste poslane izven delovnega časa. Metoda ni primerna za uporabo v času epidemij, ko se srečujemo s povečanim številom vzorcev.

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

[2] Asist. dr. Tina Uršič, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

[3] Prof. dr. Lara Lusa, univ. dipl. stat., Inštitut za biostatistiko in medicinsko informatiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1104 Ljubljana

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

ABSTRACT

KEY WORDS: respiratory viruses, acute viral respiratory tract infection, FilmArray, real time RT-PCR

BACKGROUNDS. Diagnostic of respiratory viruses is very important from the epidemiological point of view and due to over-prescription of antibiotics. METHODS. We compared the FilmArray RP (Idaho Technology, Inc., Salt Lake City, UT) and Real Time PCR which is used for routine diagnostic of respiratory viruses. RESULTS. Viral etiology was confirmed in 135/234 (57.7%) patients by FilmArray RP and in 122/234 (52.1%) patients by RT-PCR that were sent to the laboratory between June 2012 and July 2016. Among pathogens tested for by both methods, the results converged only in the case of respiratory syncytial virus (RSV). CONCLUSIONS. The greatest comparative difference in agreement between the methods was in detection of rhinoviruses (HRV) and enteroviruses (EV). The FilmArray RP is not suitable for diagnostic of small children with bronchiolitis, because human bocavirus (HBoV) was not included in the respiratory panel. In addition, the method is not suitable for detection of influenza virus A (FluA). FilmArray RP is easy to use and fast. Therefore, and because of high costs, the method is suitable only for urgent patients as point of care testing. The method is not suitable for detection of respiratory viruses during times of outbreaks, when the number of samples increases.

IZHODIŠČA

Virusne okužbe dihal so zelo pogost vzrok za obisk zdravnika. Okužbe se najpogosteje pojavljajo pri otrocih, starostnikih in imunsko oslabljenih posameznikih, pri katerih lahko potekajo v težji obliki. Klinična slika je pri večini virusov, ki povzročajo okužbe dihal, zelo podobna, zato je diagnoza brez laboratorijskega testiranja skoraj nemogoča. Prednosti diagnostike virusov, ki povzročajo okužbe dihal, so predvsem epidemiološke narave (spremljanje in sledenje lokalnih izbruhov in epidemij ter posledično pravilno ukrepanje) ter zmanjševanje nepotrebne uporabe antibiotikov. Hitra identifikacija virusov, ki povzročajo okužbe dihal, je še posebno pomembna pri virusu gripe, ker imamo na razpolago protivirusno terapijo *(1–3)*.

Za diagnostiko virusnih okužb dihal je na voljo veliko različnih hitrih diagnostičnih testov, ki temeljijo ali na principu določanja virusnih antigenov z metodo imunokromatografije ali na molekularni diagnostiki s pomočjo verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR). Hitri testi so enostavni za uporabo in zato namenjeni izvajanju ob samem bolniku. Slabost teh testov je običajno nizka občutljivost, ki se v različnih starostnih skupinah zelo razlikuje, in ne pokrivanje vseh virusnih povzročiteljev *(4–7)*. Metoda izbire za določanje virusov, ki povzročajo okužbe dihal, je zaradi visoke občutljivosti in specifičnosti še vedno PCR *(2, 8)*.

V tej raziskavi smo primerjali FilmArray panel za respiratorne viruse (RP) (Idaho Technology, Inc., Salt Lake city, UT) z molekularno diagnostiko (RT-PCR v realnem času), ki jo rutinsko uporabljamo za dokazovanje virusnih povzročiteljev okužb dihal.

POTEK RAZISKAVE

V raziskavo smo vključili 234 vzorcev bolnikov, ki so bili med junijem 2012 in julijem 2016 rutinsko poslani na diagnostiko

virusov, ki povzročajo okužbe dihal v Laboratorij za virusne infekcije na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete v Ljubljani. Vzorce smo sočasno testirali še s testom FilmArray RP. V vzporedno testiranje smo vključili vzorce, ki so bili poslani izven rednega delovnega časa, in tako zagotovili, da so ti bolniki prejeli izvid še isti dan.

PRIMERJAVA METOD ZA DOLOČANJE VIRUSOV, KI POVZROČAJO OKUŽBE DIHAL: FILMARRAY PANEL ZA RESPIRATORNE VIRUSE/ RT-PCR V REALNEM ČASU

V laboratorij za virusne infekcije smo leta 2015 prejeli 9.026 vzorcev za določanje virusov, ki povzročajo okužbe dihal, od tega 7.133 vzorcev za določanje celotnega panela respiratornih virusov in 1.893 za določanje virusa gripe, ki ga izvajamo v panelu skupaj z virusom RSV. V najbolj kritičnih zimskih mesecih (od decembra do aprila) smo v laboratorij v povprečju prejeli 35 vzorcev na dan, maksimalno tudi do 120. Za dokazovanje vseh virusov, ki povzročajo okužbe dihal v našem prostoru, imamo rutinsko v respiratorni panel vključenih 16 različnih virusnih tarč, ki jih določamo ločeno v 8 reakcijskih mešanicah z metodo RT-PCR v realnem času in uporabo TaqMan (MGB) lovk (tabela 1). Vse reakcije potekajo v instrumentu StepOne (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) ter pod enakimi reakcijskimi pogoji. V vsak vzorec sta v sam postopek osamitve nukleinske kisline vključeni tudi interni kontroli, in sicer EHV1 (*Equine herpesvirus 1*) za viruse z DNA in EAV (*Equine arthritis virus*) za viruse z RNA. V eni mikrotiterski plošči s 96 vdolbinami lahko hkrati določamo vseh 16 tarč in 2 interni kontroli pri desetih bolnikih oziroma vzorcih. Za to potrebujemo strokovno usposobljeno osebje, primerno ločene prostore in instrumente. Za posameznega bolnika izdamo izvid najkasneje v 3 urah od sprejema vzorca, 6 dni na teden vse leto in 7 dni na teden v sezonskih mesecih.

Metoda FilmArray RP je v primerjavi z našo obstoječo metodo veliko bolj preprosta, enostavna za izvedbo in popolnoma avtomatizirana. Omogoča nam določanje 17 različnih virusnih tarč in 3 bakterij (tabela 1) v 1 uri in 3 minutah *(9, 10)*. V respiratorni panel ni vključen človeški bokavirus (HBoV), ki je takoj za respiratornim sincicijskim virusom (RSV) in rinovirusi (HRV) zelo pomemben povzročitelj bronhiolitisov pri otrocih do treh let *(2, 11–13)*. Metoda nam omogoča ločeno testiranje vsakega vzorca v posameznih kartušah in z minimalno predhodno pripravo vzorca, brez osamitve nukleinske kisline. Popolnoma avtomatiziran sistem omogoča lizo celic, osamitev nukleinske kisline ter detekcijo tarčnih organizmov s pomočjo vgnezdene hkratne PCR in talilne krivulje, s čimer med seboj ločimo različne hkrati prisotne patogene. Zaradi zaprtega sistema, ki je namenjen samo enemu vzorcu, je v primerjavi s standardnimi drugimi molekularnimi metodami zelo majhna verjetnost kontaminacije *(9)*.

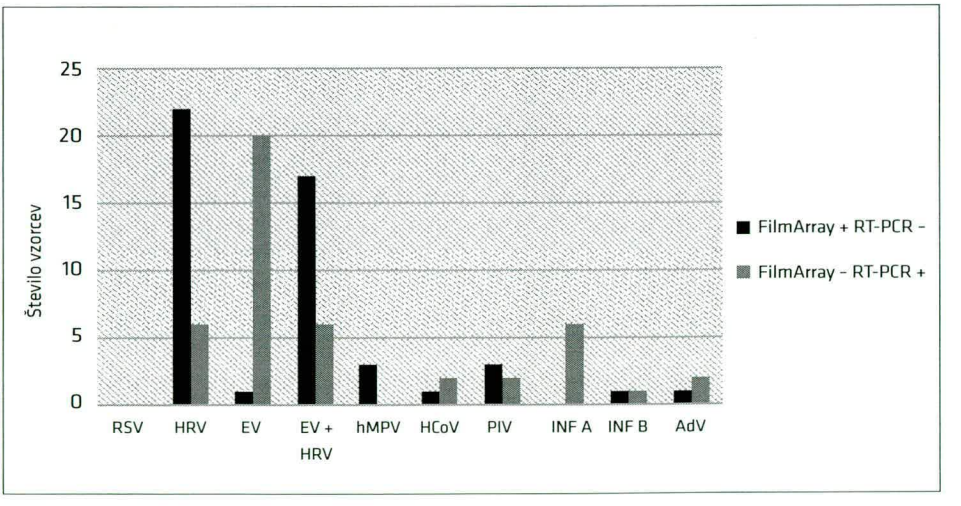
Tabela 1. Pregled nabora tarčnih organizmov pri primerjalnih metodah (RT-PCR v realnem času in Film Array RP). RSV – respiratorni sincicijski virus, HRV – človeški rinovirus, EAV – *Equine arthritis virus*, hMPV – človeški metapnevmovirus, EHV1 – *Equine herpesvirus 1*, HCoV 229E – človeški koronavirus 229E, HCoV HKU1 – človeški koronavirus HKU1, HCoV OC43 – človeški koronavirus OC43, HCoV NL63 – človeški koronavirus NL63, HBoV – človeški bokavirus, AdV – adenovirus, PIV1-4 – parainfluenca virusi 1–4, Flu A – virus influence A, FluB – virus influence B, EV – enterovirus.

Organizem	Tarčni gen (RT-PCR)	RT-PCR	Tračni geni (Film Array RP)
RSV	polimeraza		matriks
HRV	5' UTR	hkratna	5' UTR
EAV	nukleokapsida		/
hMPV	nukleoprotein	hkratna	nukleoprotein
EHV1	glikoprotein		/
HCoV 229E	polimeraza 1b	hkratna	polimeraza
HCoV HKU1	polimeraza 1b		nukleoprotein
HCoV OC43	polimeraza 1b		nukleoprotein
HCoV NL63	polimeraza 1b		nukleoprotein
HBoV	NS1	hkratna	/
AdV	hekson		hekson
PIV1	polimeraza	hkratna	hemaglutinin
PIV2	polimeraza		fuzijski
PIV3	matriks		fuzijski
PIV4			fuzijski
Flu A	matriks	hkratna	matriks, NS1[d], HA1, HA3
Flu B	matriks		hemaglutinin
EV	5' UTR		5' UTR
Bordatela pertusis	/		toksin
Chlamydia pneumoniae	/		ompA
Mycoplasma pneumoniae	/		toksin

PRIMERJAVA REZULTATOV

Vzporedno smo testirali 234 brisov nosnožrelnega prostora pri bolnikih z akutno okužbo dihal s FilmArray RP in RT-PCR v realnem času, ki ga uporabljamo v vsakodnevni diagnostiki. Z metodo FilmArray RP smo potrdili etiologijo akutne okužbe dihal (dokazan vsaj en virus) pri 135/234 (57,7 %) bolnikov, z RT-PCR v realnem času pa pri 122/234 (52,1 %). Med 18 bolniki, pri katerih je bila etiologija bolezni potrjena s FilmArray RP ne pa tudi z RT-PCR v realnem času, smo pri 11 bolnikih dokazali prisotnost HRV, pri dveh metapnemovirus (hMPV), pri dveh bakterijo *Mycoplasma pnemoniae* (*M. pnemoniae*), pri enem virus influence B (Flu B) in pri enem bakterijo *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*). Metodi se popolnoma ujemata le pri določanju RSV (slika 1, tabela 2). Največja odstopanja so se pokazala pri določanju HRV in enterovirusov (EV), ki sta najbolj zahtevna virusa za diagnostiko in ločevanje med vrstami ter je nepravilna tipizacija lahko posledica navzkrižne reaktivnosti med HRV in EV *(10)*. Veliko boljša se je izkazala naša obstoječa metoda predvsem pri določanju virusa influence A (Flu A), kakor tudi pri določanju EV, človeških koronavirusov (HCoVs) in

adenovirusov (AdV). Metoda FilmArray RP je boljša pri določanju hMPV in parainfluenca virusov (PIV), vendar sta 2/3 PIV, ki sta bili z RT-PCR v realnem času negativni in s FilmArray RP pozitivni, tipizirani kot PIV4, ki še ni bila vključena v naš respiratorni panel. Zelo podobne rezultate so dobili tudi Pierce in sodelavci, ki so prav tako primerjali FilmArray RP z RT-PCR v realnem času. Oba testa sta se popolnoma ujemala v 98,6 % (kappa = 0,92), največja odstopanja pa so dokazali pri AdV, saj FilmArray RP ni pokrival serotipov 6 in 41 in je imel zmanjšano občutljivost za serotipe 2, 20, 35 in 37. V tej raziskavi so s FilmArray RP zgrešili približno polovico kliničnih vzorcev, ki so bili pozitivni na AdV *(10)*. Določanje AdV je zelo velik izziv za molekularne hkratne PCR-teste, saj je do sedaj znanih kar 57 človeških adenovirusnih serotipov. Popowitch in sodelavci so ugotovili veliko nižjo občutljivost za AdV, kot jo je navajal proizvajalec, in sicer 57,1 % namesto 88,9 % *(14)*. Proizvajalec Biofire zaradi nižje občutljivosti pri AdV priporoča, da se vzorce, ki so negativni na AdV, še dodatno testira z alternativnim testom. Občutljivost metode FilmArray RP (BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT) za AdV je v primerjavi z RT-PCR v realnem času 89,4 % in specifičnost 99,6 % *(10)*. Pri primerjavi FilmArray RP s tremi komercialnimi molekularnimi metodami (eSensor RVP (respiratory viral panel; GenMark Dx, Carlsbad, CA), Luminex xTAG RVPv1 ter Luminex xTAGRVP fast (Luminex Molecular Diagnostics, Austin, TX) so ugotovili, da je občutljivost FilmArray RP za hMPV, FluA/A3, PIV1-3, RSVB > 92 %, medtem ko je občutljivost za AdV, FluA/H1N1/2009, FluB, RSV A, HRV/EV nižja *(14)*. Zelo podobne rezultate so dobili še s tremi drugimi raziskavami, kjer so dokazali nižjo občutljivost FilmArray za AdV in PIV v primerjavi z RT-PCR v realnem času *(15)* ter za AdV, HRV/EV in FluA v primerjavi s Luminex xTAG RVP (16). Občutno nižjo občutljivost za PIV4 pa so dokazali za FilmArray v primerjavi s xTAG RVP fast, saj je bila ta le 50 % *(17)*.



Slika 1. Prikaz ujemanja metod FilmArray RP in RT-PCR v realnem času po različnih virusih. RSV – respiratorni sincicijski virus, HRV – človeški rinovirus, EV – enterovirus, hMPV – človeški metapnevmovirus, HCoV – človeški koronavirus, PIV – parainfluenca virusi, Flu A – virus influence A, FluB – virus influence B, AdV – adenovirus.

Tabela 2. Pregled dokazanih povzročiteljev pri bolnikih z akutno okužbo dihal z dvema primerjalnima metodama (RT-PCR in FilmArray RP). RSV – respiratorni sincicijski virus, HRV – človeški rinovirus, EV – enterovirus, hMPV – človeški metapnevmovirus, HCoV – človeški koronavirus, PIV – parainfluenca virusi, Flu A – virus influence A, FluB – virus influence B, AdV – adenovirus, HBoV – človeški bokavirus.

Organizem	RT-PCR Število pozitivnih (%), N = 234	FilmArray RP Število pozitivnih (%), N = 234	RT-PCR pozitiven, FilmArray negativen Število (%)	RT-PCR negativen, FilmArray pozitiven Število (%)	Kappa (SD)
RSV	17 (7,3)	17 (7,3)	0	0	1 (0)
HRV	45 (19,2)	61 (26,1)	6/45 (13,3)	22/61 (36,1)	0,66 (0,06)
EV	22 (9,4)	3 (1,3)	20/22 (90,9)	1/3 (33,3)	0,14 (0,09)
EV + HRV	51 (21,8)	62 (26,5)	6/51 (11,8)	17/62 (27,4)	0,73 (0,05)
hMPV	6 (2,6)	9 (3,8)	0	3/9 (33,3)	0,79 (0,12)
HCoV	16 (6,8)	15 (6,4)	2/16 (12,5)	1/15 (6,7)	0,9 (0,06)
PIV	18 (7,7)	19 (8,1)	2/18 (11,1)	3/19 (15,8)	0,85 (0,06)
INF A	32 (13,7)	26 (11,1)	6/32 (18,7)	0	0,88 (0,05)
INF B	13 (5,5)	13 (5,5)	1/13 (7,7)	1/13 (7,7)	0,92 (0,06)
AdV	10 (4,3)	9 (3,8)	2/10 (20)	1/9 (11,1)	0,84 (0,09)
HBoV	14 (6)	/	/	/	/
Bordetella pertusis	/	1 (0,4)	/	/	/
Chlamydia pneumoniae	/	0	/	/	/
Mycoplasma pneumoniae	/	4 (1,7)	/	/	/

PREDNOSTI IN SLABOSTI OBEH METOD

Obe metodi imata mnogo prednosti kakor tudi slabosti, odvisno od tega, kakšen je laboratorij in koliko vzorcev prejme dnevno za diagnostiko virusov, ki povzročajo okužbe dihal. Metoda FilmArray RP ne zahteva visoko strokovno usposobljenega osebja in opremljenega prostora ter je namenjena, kot hitri test, uporabi ob samem bolniku *(14)*. Za izvedbo testa potrebujemo manjšo količino vhodnega materiala v primerjavi z našo metodo (100 µl/200 µl), vendar je primerna le za brise, ne pa tudi za druge kužnine (aspirati, bronhoalveolarne lavaže, biopti in kri). Metoda je zelo hitra, vendar lahko z enim panelom naenkrat testiramo le en vzorec. To je praktično nemogoče izvesti v laboratorijih, kjer je dnevni nabor vzorcev velik. Na voljo je že nadgradnja tega instrumenta (FilmArray Torch), ki omogoča hkratno določanje pri 12 vzorcih in je sestavljen iz 12 ločenih a hkrati v en instrument povezanih enot. Za razliko od omenjene metode lahko z RT-PCR v realnem času, hkrati testiramo 10 vzorcev na enem instrumentu in 30 na treh instrumentih, ki jih imamo v laboratoriju. Prednost te metodologije v primerjavi s klasičnim RT-PCR je tudi zelo nizka stopnja kontaminacije. Pri Film Array RP so vključene še tri bakterije, ki jih mi v našem panelu ne določamo. Izmed 234 vzorcev smo pri petih (2,1 %) dokazali bakterije, in sicer pri štirih vzorcih bakterijo *M. pneumoniae* in pri enem vzorcu bakterijo *B. pertussis*. Glede na podatke te bakterije ne igrajo velike vloge pri teh kliničnih vzorcih, ki smo jih zajeli v to primerjavo, saj so bili poslani na dia-

gnostiko virusov, ki povzročajo okužbe dihal in temu primerna je bila tudi klinična slika bolnikov. Bolniki, katerih klinična slika kaže na okužbo s temi bakterijami, je v večini primerov tako značilna, da se njihovi vzorci pošiljajo ciljano na določanje teh bakterij. Velika pomanjkljivost testa je, da ne vključuje HBoV, saj je ta zelo pomemben povzročitelj bronhiolitisov pri majhnih otrocih. V Sloveniji smo v treh različnih raziskavah dokazali zelo visoko pogostnost okužbe s HBoV pri majhnih otrocih, in sicer od 12,3 % (neobjavljeni podatki) do 20,9 % *(11, 18)*. Zato FilmArray RP pri tej starostni skupini ni primeren za diagnostiko. Zelo velika slabost FilmArray RP je neprimerno višja cena na posamezen vzorec v primerjavi z RT-PCR v realnem času. Glede na to, da so rezultati izdani zgolj kvalitativno in nimamo nobenega vpogleda v analizo vzorca, teh rezultatov ne moramo naknadno analizirati in se sami odločiti, ali je vzorec pozitiven ali negativen. Pogosto je količina določenih virusov tako nizka, da je njihov klinični pomen vprašljiv. Pri brisih nosnega dela žrela je kvantifikacija virusov nemogoča, ker nimamo nobenega nadzora o samem odvzemu. Prav tako je določitev enih virusov bolj pomembna kot drugih, saj lahko DNA predvsem HBoV in AdV dokažemo še zelo dolgo po preboleli akutni okužbi. Zato je razumevanje okužb z več virusi hkrati in vpogled v njihovo količino ter sodelovanje s kliniki in razumevanje klinične slike pri posameznih bolnikih zelo pomembno.

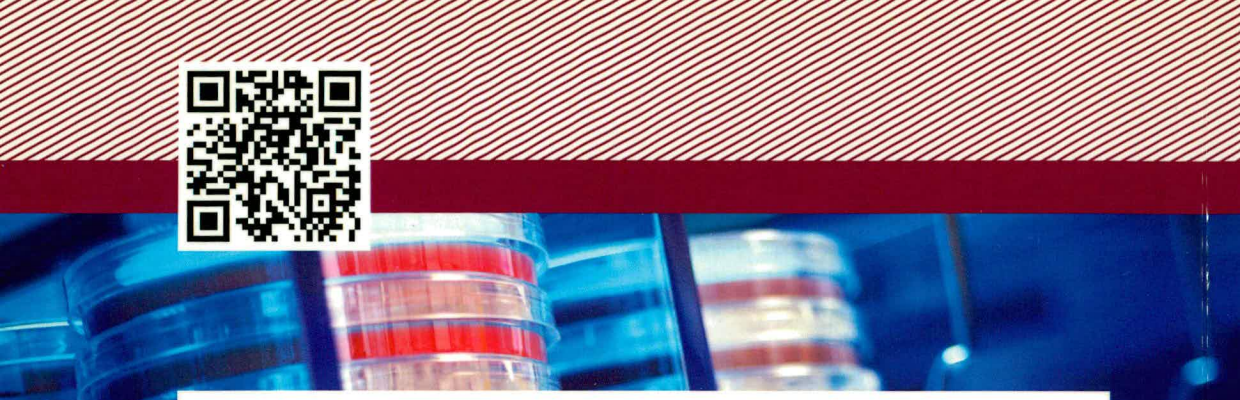
ZAKLJUČEK

Film Array RP je zaradi visoke cene in omejenega števila testiranih vzorcev primeren le za nujne primere, pri katerih je potrebna zelo hitra obravnava in ki so poslani izven delavnega časa, ter za bolnike, ki potrebujejo sindromski pristop. Ker v panel ni vključen HBoV, metoda ni primerna za majhne otroke (mlajše od 3 let), predvsem tiste z diagnozo akutnega bronhiolitisa. Predvsem pa ni primerna metoda izbire v času epidemije z virusom influence A.

LITERATURA

1. Templeton KE. Why diagnose respiratory viral infection? J Clin Virol. 2007; 40 (Suppl 1): S2–4.
2. Mahony JB. Detection of respiratory viruses by molecular methods. Clin Microbiol Rev. 2008; 21 (4): 716–47.
3. Fox JD. Respiratory virus surveillance and outbreak investigation. J Clin Virol. 2007; 40 (Suppl 1): S24–30.
4. Takahashi H, Otsuka Y, Patterson BK. Diagnostic tests for influenza and other respiratory viruses: determining performance specifications based on clinical setting. J Infect Chemother. 2010; 16 (3): 155–61.
5. Chartrand C, Leeflang MM, Minion J, et al. Accuracy of rapid influenza diagnostic tests: a meta-analysis. Ann Intern Med. 2012; 156 (7): 500–11.
6. Casiano-Colon AE, Hulbert BB, Mayer TK, et al. Lack of sensitivity of rapid antigen tests for the diagnosis of respiratory syncytial virus infection in adults. J Clin Virol. 2003; 28 (2): 169–74.
7. Brendish NJ, Schiff HF, Clark TW. Point-of-care testing for respiratory viruses in adults: The current landscape and future potential. J Infect. 2015; 71 (5): 501–10.
8. Mahony JB. Nucleic acid amplification-based diagnosis of respiratory virus infections. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010; 8 (11): 1273–92.
9. Poritz MA, Blaschke AJ, Byington CL, et al. FilmArray, an automated nested multiplex PCR system for multi-pathogen detection: development and application to respiratory tract infection. PloS One. 2011; 6 (10): e26047.

10. Pierce VM, Elkan M, Leet M, et al. Comparison of the Idaho Technology FilmArray system to real-time PCR for detection of respiratory pathogens in children. J Clin Microbiol. 2012; 50 (2): 364–71.
11. Uršic T, Jevšnik M, Zigon N, et al. Human bocavirus and other respiratory viral infections in a 2-year cohort of hospitalized children. J Med Virol. 2012; 84 (1): 99–108.
12. Allander T, Jartti T, Gupta S, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. Clin Infect Dis. 2007; 44 (7): 904–10.
13. Chen ZR, Ji W, Wang YQ, et al. Etiology of acute bronchiolitis and the relationship with meteorological conditions in hospitalized infants in China. J Formos Med Assoc. 2014; 113 (7): 463–9.
14. Popowitch EB, O'Neill SS, Miller MB. Comparison of the Biofire FilmArray RP, Genmark eSensor RVP, Luminex xTAG RVPv1, and Luminex xTAG RVP fast multiplex assays for detection of respiratory viruses. J Clin Microbiol. 2013; 51 (5): 1528–33.
15. Loeffelholz MJ, Pong DL, Pyles RB, et al. Comparison of the FilmArray Respiratory Panel and Prodesse real-time PCR assays for detection of respiratory pathogens. J Clin Microbiol. 2011; 49 (12): 4083–8.
16. Rand KH, Rampersaud H, Houck HJ. Comparison of two multiplex methods for detection of respiratory viruses: FilmArray RP and xTAG RVP. J Clin Microbiol. 2011; 49 (7): 2449–53.
17. Babady NE, Mead P, Stiles J, et al. Comparison of the Luminex xTAG RVP Fast assay and the Idaho Technology FilmArray RP assay for detection of respiratory viruses in pediatric patients at a cancer hospital. J Clin Microbiol. 2012; 50 (7): 2282–8.
18. Jevšnik M, Uršic T, Zigon N, et al. Coronavirus infections in hospitalized pediatric patients with acute respiratory tract disease. BMC Infect Dis. 2012; 12: 365.



8. BANIČEVI DNEVI: OKUŽBE DIHAL

5 Epidemiology of Tuberculosis, Examinations and Testing of Health Care Workers – Presentation of Guidelines – *Petra Svetina, Sanja Grm Zupan*

11 Special Features and Novelties of Laboratory Diagnostics of Active Tuberculosis and Mycobacteriosis in Slovenia – *Manca Žolnir – Dovč, Irma Perko, Eva Sodja*

21 Laboratory Diagnosis of Latent Tuberculosis–11-Years' Experience with QuantiFERON Testing – *Eva Sodja, Sandra Ažman, Manca Žolnir – Dovč*

31 Challenges in Treating Patients with Nontuberculous Mycobacteriosis – *Petra Svetina, Sanja Grm Zupan*

35 Clinical and Microbiological Characteristics of Nocardia Isolates in Slovenia in 2004–2015 – *Katarina Osolnik, Manca Žolnir – Dovč, Viktorija Tomič*

39 Community-Acquired Pneumonia in Adults–Experience from Golnik Hospital – *Renato Eržen, Luka Rebolj, Viktorija Tomič*

45 Pulmonary Infections and Non-invasive Mechanical Ventilation – *Irena Šarc*

53 Respiratory Infections in Patients with Cystic Fibrosis – *Ana Kotnik Pirš*

61 Brief Report from EMBARC (European Multicentre Bronchiectasis Audit and Research Collaboration) and the Role of Inhaled Antibiotics and Macrolides in non Cystic Fibrosis Bronciectasis – *Sabina Škrgat, Daša Naglič*

65 Microbiological Diagnostics of Bacterial Respiratory Tract Infections – *Katja Seme, Viktorija Tomič*

73 Recent Advances in Laboratory Diagnostics of Atypical Bacteria – *Darja Keše, Rok Kogoj*

79 Microbiological Diagnostics of Viral Respiratory Tract Infections – *Miroslav Petrovec*

87 Filamentous Fungi and Respiratory Infections – *Rok Tomazin, Tadeja Matos*

101 *Pneumocystis jirovecii* – Colonisation or Pneumonia – Review of Diagnostic Methods – *Andrej Glaser, Erika Robič, Petra Rogina Skvarč, Barbara Šoba Šparl, Saša Simčič, Miha Skvarč*

111 Whooping Cough in Slovenia–Epidemiology and Updates in Microbiological Diagnostics – *Tamara Kastrin, Metka Paragi, Marta Grgič – Vitek, Irena Grmek Košnik, Tjaša Žohar Čretnik*

121 Invasive Pneumococcal Diseases After the Introduction of Conjugate Vaccine in the National Immunization Program – *Metka Paragi, Verica Mioč, Tamara Kastrin, Alenka Kraigher, Tjaša Žohar Čretnik, Slovenska skupina za meningitise*

133 Legionella from Environmental Samples in Relation to Human Infections – *Maja Gošnjak, Andrej Rojnik, Alenka Štorman, Darja Keše*

143 Influenza Surveillance in Slovenia Between Seasons 2000/2001 and 2015/2016 – *Katarina Prosenc Trilar, Nataša Berginc, Maja Sočan*

149 Influenza Vaccination of Healthcare Workers–Myths and Truths – *Tatjana Lejko Zupanc*

157 Managment of an Influenza Outbreak in a Health Care Institution – *Irena Grmek Košnik, Helena Ribič, Matej Dolenc, Jana Lavtižar, Tanja Čebin Skale, Metka Velušček*

165 Acute Bronchiolitis – *Tatjana Mrvič, Uroš Krivec*

175 Respiratory Syncytial Virus Infection in Children and Immunoprophylaxis with Palivizumab – Slovenian Experience – *Lilijana Kornhauser Cerar*

187 The Importance of Respiratory Syncytial Virus Detection in Elderly – *Darja Duh, Andrej Golle, Nina Gorišek Miksić, Dušanka Vidovič*

197 Parainfluenza Viruses Type 4–Increased Number of Detected Infections in Children in 2015 – *Darja Duh, Barbara Blažič, Andrej Golle, Vojko Berce*

205 How Important is Parainfluenza Virus 4 in Slovene Children? – *Tina Uršič, Marko Kozjek, Martin Sagadin, Monika Jevšnik, Uroš Krivec, Marko Pokorn, Miroslav Petrovec*

213 Outbreak of an Influenza-like Disease in a Regional Hospital – *Helena Ribič, Irena Grmek Košnik, Edita Eberl Gregorič, Matej Dolenc, Gordana Sivec, Miroslav Petrovec*

221 Detection of Respiratory Viruses with FilmArray (Idaho Technology): Advantage or Disadvantage? – *Monika Jevšnik, Tina Uršič, Lara Lusa, Miroslav Petrovec*