

# 10. Baničevi dnevi

Mikrobiologija  
v javnem zdravstvu

# 10. Baničevi dnevi

Mikrobiologija v javnem zdravstvu

## **10. BANIČEVI DNEVI: MIKROBIOLOGIJA V JAVNEM ZDRAVSTVU**

23. in 24. november 2018, Postojna  
Zbornik predavanj z recenzijo

### **UREDNIK**

izr. prof. dr. Miroslav Petrovec, dr. med.

### **ORGANIZATORJI**

Sekcija za klinično mikrobiologijo  
in bolnišnične okužbe SZD  
Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje  
in hrano, Oddelek za javnozdravstveno  
mikrobiologijo Ljubljana

### **STROKOVNO ZNANSTVENI ODBOR**

izr. prof. dr. Miroslav Petrovec, dr. med.  
doc. dr. Mateja Pirš, dr. med.  
Helena Ribič, dr. med.  
dr. Metka Paragi, univ. dipl. biol.  
mag. Andrej Golle, dr. med.  
mag. Tjaša Žohar Čretnik, dr. med.

### **ORGANIZACIJSKI ODBOR**

dr. Metka Paragi, univ. dipl. biol.  
mag. Katarina Prosenč, univ. dipl. biol.  
dr. Marija Trkov, univ. dipl. inž. živil. tehn.  
dr. Tamara Kastrin, univ. dipl. mikrobiol.  
Verica Mioč, univ. dipl. mikrobiol.  
Vesna Šubelj, univ. dipl. mikrobiol.  
Špela Hostnik, dipl. ing. lab. biomed.,  
univ. dipl. org.

### **RECENZENTI**

izr. prof. dr. Miroslav Petrovec, dr. med.  
doc. dr. Mateja Pirš, dr. med.  
prof. dr. Alojz Ihan, dr. med.  
prof. dr. Katja Seme, dr. med.

### **LEKTORICA ZA SLOVENSKI JEZIK**

Nada Mulej, prof. slov. j. in prim. knjiž.

### **LEKTORICA ZA ANGLEŠKI JEZIK**

Maja Šukarov, univ. dipl. prevajalka

### **IZDALA**

Sekcija za klinično mikrobiologijo  
in bolnišnične okužbe SZD

### **TEHNIČNA UREDNIKA**

Miha Oražem, Valentina Ahac

### **PRELOM**

Boex DTP, d. o. o.

### **TISK**

ltagraf d.o.o.

### **NAKLADA**

230 izvodov

---

CIP - Kataložni zapis o publikaciji  
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

579.61(082)  
616.9(082)

BANIČEVI dnevi (10 ; 2018 ; Postojna)

Mikrobiologija v javnem zdravstvu : [zbornik predavanj z recenzij] /  
10. Baničevi dnevi, [23. in 24. november 2018, Postojna ; organizatorji  
Sekcija za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe SZD [in] Nacionalni  
laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Oddelek za javnozdravstveno  
mikrobiologijo Ljubljana ; urednik Miroslav Petrovec]. - Ljubljana :  
Sekcija za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe SZD, 2018

ISBN 978-961-6956-87-1

1. Gl. stv. nasl. 2. Petrovec, Miroslav 3. Slovensko zdravniško društvo.  
Sekcija za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe  
297512704

---

## 10. BANIČEVI DNEVI

Vloga mikrobiologije v javnem zdravstvu danes in jutri – <i>Tjaša Žohar Čretnik, Miroslav Petrovec</i> . . . . .	5
Razvoj mikrobiologije v javnem zdravstvu v Sloveniji – <i>Metka Paragi, Katarina Prosenec, Verica Mioč</i> . . . . .	13
Cepiva v razvoju – priložnosti in izzivi za javno zdravje – <i>Alojz Ihan</i> . . . . .	23
Napredek in ovire cepljenja proti človeškim papilomavirusom – <i>Polona Maver Vodičar, Anja Šterbenc, Mario Poljak</i> . . . . .	29
Nadzor prenašalcev porajajočih se mikroorganizmov v Sloveniji – <i>Nataša Knap, Miša Korva, Vladimir Ivović, Katja Kalan Pavletič, Samo Zakotnik, Tatjana Avšič-Županc</i> . . . . .	39
<i>Clostridioides difficile</i> – porajajoča se zoonoza – <i>Maja Rupnik</i> . . . . .	51
Sumljive pošiljke z belim prahom – bioterorizem ali potegavščina? – <i>Miša Korva, Jana Avberšek, Matjaž Ocepek, Miroslav Petrovec, člani intervencijske skupine IMI–MF in IMP–VF.</i> . . . . .	55
Strategija spremljanja odpornosti bakterij proti antibiotikom – <i>Iztok Štrumbelj, Helena Ribič</i> . . . . .	63
Eliminacija javnozdravstvenega problema virusnih hepatitisov – mit ali resničnost? – <i>Mojca Matičič, Jerneja Videčnik Zorman</i> . . . . .	71
Odpornost bakterij proti kolistinu – <i>Julija Germ, Mateja Pirš</i> . . . . .	77
Pomen mikrobiologije v transfuzijski medicini – <i>Urška Rahne Potokar, Snežna Levičnik Stezinar</i> . . . . .	87
Občutljivost za antibiotike pri povzročiteljih nezapletenega cistitisa v Sloveniji – <i>Helena Ribič, Urška Dermota, Iztok Štrumbelj, Irena Grmek Košnik, Ingrid Berce, Tatjana Harlander, Ljudmila Sarjanović, Marica Lugovski, Tjaša Žohar Čretnik</i> . . . . .	95
Vpliv turizma na kakovost zraka v Postojnski jami in Škocjanskih jamah – <i>Rok Tomazin, Saša Simčič, Tadeja Matos, Andreja Nataša Kopitar, Sanja Stopinšek, Alenka Mauko, Vesna Zalar Serjun, Janez Mulec</i> . . . . .	105
Izzivi mikrobiološke obravnave ošpic in drugih vročinskih boleznih z izpuščajem v okoljih z redkimi primeri – <i>Katarina Prosenec Trilar, Nataša Berginc</i> . . . . .	117

Spremljanje enterovirusnih okužb v času izkoreninjenja in po izkoreninjenju poliovirusov – <i>Nataša Berginc, Vesna Šubelj, Katarina Prosenc Trilar</i> . . . . .	123
Epidemije in pandemije gripe – sto let od pandemije španske gripe – <i>Katarina Prosenc Trilar, Nataša Berginc</i> . . . . .	131
Javnozdravstveni pomen spremljanja oslovskega kašlja v Sloveniji – <i>Tamara Kastrin, Metka Paragi, Toni Oražem, Alex-Mikael Barkoff, Qiushui He</i> . . . . .	139
Uporaba sekvenciranja celotnega genoma za spremljanje invazivnih izolatov <i>Neisseria meningitidis</i> v javnem zdravstvu – <i>Tamara Kastrin, Nataša Toplak, Simon Koren, Slovenska skupina za meningitise, Metka Paragi</i> . . . . .	145
Uporaba sekvenciranja genomov za tipizacijo bakterij v molekularni epidemiologiji – <i>Sandra Janežič</i> . . . . .	153
Spremljanje salmonel, listerij in <i>E. coli</i> , ki povzročajo črevesne okužbe, z molekularnimi metodami – <i>Marija Trkov, Manica Mueller - Premru, Mateja Pirš, Ingrid Berce, Alenka Štorman, Mateja Ravnik, Metka Paragi, Eva Grilc, Tjaša Žohar Čretnik</i> . . . . .	161
Pomen molekularne epidemiologije pri spremljanju gripe – <i>Nataša Berginc, Katarina Prosenc Trilar</i> . . . . .	171

Tjaša Žohar Čretnik<sup>1</sup>, Miroslav Petrovec<sup>2</sup>

## Vloga mikrobiologije v javnem zdravstvu danes in jutri

### *Present and Future Role of Microbiology in Slovene Public Health Care System*

#### IZVLEČEK

---

KLJUČNE BESEDE: mreža mikrobioloških laboratorijev, razvoj dejavnosti

Mineva skoraj sto let od ustanovitve prvega slovenskega mikrobiološkega laboratorija, zato je prav, da razmislimo, kakšne smeri razvoja se stroki ponujajo v prihodnje. Jo je potrebno ohraniti kot del javne zdravstvene mreže in jo regulirati skladno s to odločitvijo? Je bolj primerno izvajanje te dejavnosti prepustiti prostemu trgu? Če jo ohranimo kot del javne zdravstvene mreže, kako velika naj bo? Spada mikrobiološki laboratorij v vsako od 24 slovenskih bolnišnic in 63 zdravstvenih domov? Kako se nenehno prilagajati razvoju sodobnih tehnologij? V stroki se zavedamo, da je različnih odgovorov na ta in druga pomembna vprašanja več, verjetno pa se vsi strinjamo, da je za sistem najslabše, če ni jasne vizije in odločevalci ne sprejemajo konsistentnih odločitev. V prispevku želita avtorja predstaviti razloge za podporo viziji razvoja medicinske mikrobiološke dejavnosti, kot jo je opredelil Razširjeni strokovni kolegij za mikrobiologijo in imunologijo v letu 2016.

#### ABSTRACT

---

KEY WORDS: network of microbiology laboratories, development of the field

Almost 100 years have passed since the establishment of the first microbiology laboratory in Slovenia. It is therefore appropriate to address the questions related to the possibilities of further development of our profession. Should it be kept in the domain of the public health care system and regulated accordingly? Or is it better to put it on the open market? How many laboratories do we need in the public network? Do we want to establish an independent microbiology laboratory in each of the 24 hospitals and 63 primary health care centres? How to constantly adapt to technological changes? We are all aware that there are many different answers to these questions but all of us also probably agree that the worst situation in any system is lack of a vision and inconsistencies in the decision-making process. The authors would like to present the reasons for their support of the vision for the development of medical microbiology as defined by the Expanded Professional Board for Clinical Microbiology and Immunology in 2016.

---

<sup>1</sup> Mag. Tjaša Žohar Čretnik, dr. med., spec. med. mikrobiol., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; tjasa.zohar.cretnik@nlzoh.si

<sup>2</sup> Izr. prof. dr. Miroslav Petrovec, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1104 Ljubljana; mirc.petrovec@mf.uni-lj.si

## UVOD

Kadar želimo postaviti vprašanje organiziranosti in pristojnosti neke dejavnosti v državi, je potrebno to dejavnost najprej pravilno opredeliti. Za vse nas je to storilo Evropsko združenje za klinično mikrobiologijo in infekcijske bolezni (*European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases – ESCMID*) in definicijo zapisalo v Evropski priročnik klinične mikrobiologije (*European Manual of Clinical Microbiology*). Po definiciji, kot je podana v priročniku, klinična mikrobiologija vključuje izvajanje preiskav za odkrivanje povzročiteljev okužb in/ali njihovih sestavin v vzorcih odvzetih pacientu, izvajanje preiskav za ugotavljanje imunskega odziva na povzročitelje okužb in/ali njihovih sestavin v vzorcih odvzetih pacientu, in odkrivanje povzročiteljev okužb in/ali njihovih sestavin v vzorcih odvzetih iz neživega okolja za namen preprečevanja in obvladovanja okužb povezanih z zdravstveno oskrbo (1). Poleg diagnostične dejavnosti pa mikrobiološki laboratoriji v različnih deležih izvajajo še druge funkcije, ki sodijo na področje medicinske mikrobiologije, in sicer javnozdravstveno mikrobiološko dejavnost in odzivanje na izredne dogodke, pedagoško in raziskovalno dejavnost, ter skrb za stalni profesionalni razvoj.

Kot javnozdravstveno mikrobiološko dejavnost in odzivanje na izredne dogodke štejemo izvajanje aktivnosti, katerih namen je zaznavanje, spremljanje in obvladovanje nalezljivih bolezni ter hiter odgovor na epidemije. Med seboj se povezujejo področja humane, veterinarske, živilske, vodne in okoljske mikrobiologije ter področje javnega zdravja in klinične vede. Naloge, ki sodijo na področje javnozdravstvene mikrobiologije in ki bodo podrobneje predstavljena v drugem prispevku tega srečanja so med drugim:

- stalno spremljanje in nadzor nad nalezljivimi boleznimi v državi v sodelovanju s specialisti javnega zdravja – epidemiologi;

- vzpostavljanje mrež za spremljanje nalezljivih bolezni, v primerih, ko podatki iz diagnostičnih laboratorijev ne zadoščujejo za oceno epidemiološke situacije;
- raziskovanje in sledenje mikroorganizmov in njihovih sprememb, ki bi lahko vodile k spremenjeni klinični sliki in/ali spremenjeni epidemiologiji bolezni, ki jih povzročajo;
- sodelovanje in priprava navodil za celosten nadzor nad nalezljivimi boleznimi;
- uvajanje novih znanstveno potrjenih metod v povezavi z ECDC (Evropskim centrom za nadzor bolezni) in WHO (Svetovno zdravstveno organizacijo), ki so potrebne za doseganje ciljev nadzora, kot jim sledimo na evropskem ali svetovnem nivoju;
- nadzor nad povzročitelji bolezni proti katerim cepimo;
- povezovanje mikrobioloških, kemijskih, veterinarskih in živilskih ekspertov pri nadzoru epidemij in raziskavah kroženja in obnašanja mikroorganizmov;
- tesno povezovanje z mednarodnimi mrežami in organizacijami pri hitri izmenjavi podatkov, validaciji metod in pripravi navodil;
- stalno spremljanje državnih in mednarodnih epidemij.

Raziskovalna mikrobiološka dejavnost je usmerjena v temeljne in aplikativne mikrobiološke raziskave. V slovenskih laboratorijih delujejo ugledne raziskovalne skupine z mednarodnimi referencami najvišjega nivoja. Medsebojno povezovanje laboratorijev je pogoj za krepitev raziskovalnega dela skozi povezovanje informacij, ki izhajajo iz diagnostične, javnozdravstvene in temeljne raziskovalne dejavnosti. Znanstvene in strokovne publikacije so eno od pomembnih meril strokovnega ugleda laboratorija.

Kot pedagoško dejavnost štejemo različne oblike sodelovanja v procesih usposabljanja:

- izvajanje obveznih praks za dijake in študente različnih profilov;
- izvajanje programov pripravnštva za poklice v zdravstvu;
- sodelovanje sodelavcev kot izpraševalcev na strokovnih izpitih;
- izvajanje programov specializacije za specializante klinične mikrobiologije;
- sodelovanje sodelavcev kot predavateljev in asistentov pri izvajanju programov na obeh slovenskih medicinskih fakultetah, na fakultetah za zdravstvo, fakulteti za farmacijo, biotehniški fakulteti, visokih šolah za zdravstvo in podiplomskih programih izobraževanja.

## OPIS STANJA

Da bi medicinski laboratorij lahko izvajal svojo dejavnost, mora izpolnjevati zahteve Pravilnika, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine (Ur. l. RS 64/04 in 1/16) in mu je Ministrstvo za zdravje izdalo dovoljenje za delo (2). Trenutno v Sloveniji deluje 10 mikrobioloških laboratorijev z dovoljenjem za delo, ki delujejo znotraj šestih pravnih oseb na skupaj 14 lokacijah. Seznam posodablja Ministrstvo za zdravje in je objavljen na spletni strani ministrstva (3). Kljub temu, da pravilnik velja od leta 2004 in da so se prva dovoljenja za delo podelila v letu 2009, pa še vedno ni rešeno vprašanje pristojnosti posameznih strok. Posledično laboratoriji delujejo zunaj obsegov, kot jih kot svojo, mednarodno priznano pristojnost razumemo posamezne laboratorijske stroke. Tako nam – mikrobiologom, nikakor ni doumljivo, da lahko procesiranje najbolj kritičnih vzorcev v mikrobiologiji – hemokultur področje medicinske biokemije razume kot svojo pristojnost in da tudi za številne druge mikrobiološke preiskave, kot so na primer preiskava blata na parazite, preiskave razmazov na krvne parazite in praktično vse serološke preiskave menijo, da jih lahko

izvaja katerikoli laboratorij z dovoljenjem za delo s področja medicinske biokemije, ki jih je v Sloveniji več kot 100 (4).

Po oceni, ki jo je Razširjeni strokovni kolegij za mikrobiologijo in imunologijo (v nadaljevanju RSK) v letu 2016 pripravil za namen izdelave predloga izvajalcev mikrobiološke dejavnosti in posledično sprememb zakonodaje, ki bi takšno mrežo podprle, so laboratoriji z dovoljenjem za delo s področja medicinske mikrobiologije v letu 2016 opravili 1.577.000 preiskav (5). V letu 2016 je to delo opravljajo 43 specialistov mikrobiologov in še približno 350 zaposlenih z drugimi izobrazbami, ki so potrebne za delovanje sodobnega mikrobiološkega laboratorija (5). Kolikšen del preiskav s področja medicinske mikrobiologije se izvaja v medicinskih biokemijskih in drugih laboratorijih, RSK ni mogel oceniti. Glede na prihodke Centra za medicinsko mikrobiologijo Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano in Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, ki izvajata večino preiskav, smo ocenili, da stroški za medicinsko mikrobiologijo ne presegajo 1 % sredstev, ki se v Sloveniji namenijo za delovanje zdravstvenega sistema in da v stroških posameznih bolnišnic stroški za mikrobiološke preiskave, narečeni v navedenih inštitucijah, dosega od 0,3 do 2 % stroškov določene bolnišnice.

V strokovnem smislu smo slovenski mikrobiološki laboratoriji našim deležnikom sposobni ponuditi preko 600 različnih preiskav, ki jih izvajamo z najsodobnejšimi metodami in tehnikami. Pacientom in vsem prebivalcem v Sloveniji so dostopne praktično vse vrste preiskav, ki jih mikrobiološka stroka ta trenutek premore.

Podatki, ki nastanejo v mikrobiološkem laboratoriju so pomembni za naročnike mikrobiološke diagnostične preiskave, ki so:

- lečeči zdravniki v katerikoli zdravstveni ustanovi ali domu starejših občanov (DSO), zdravniki, ki delujejo kot konce-



sionarji ali zasebni izvajalci zdravstvene dejavnosti brez koncesije;

- mikrobiologi, kadar gre za preiskave terciarne ravni;
- epidemiologi, ki raziskujejo sporadične primere nalezljivih bolezni ali primere nalezljivih bolezni, ki so del izbruha;
- pacienti samoplačniki, ki so v takšen status pogosto prisiljeni zaradi pomanjkljivosti v delovanju zdravstvenega sistema.

V mikrobioloških laboratorijih pripravljamo tudi zbirne laboratorijske podatke, ki jih potrebujejo:

- različne komisije delujoče v zdravstvenih ustanovah in DSO (za preprečevanje in obvladovanje okužb povezanih z zdravstvom, za racionalno rabo antibiotikov itd.);
- mednarodne mreže pod okriljem WHO, ECDC, EFSA itd.;
- Zavod za zdravstveno zavarovanje Slovenije;
- Nacionalni inštitut za javno zdravje;
- Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije;
- ministrstva drugih resorjev v državi;
- zainteresirane javnosti.

Samo v laboratorijih Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano letno pripravimo preko 1.000 poročil z zbirnimi laboratorijskimi podatki za različne deležnike letno. Prav zaradi potrebe, da so različnim deležnikom dostopni celoviti, pravočasno pripravljani in na zaupanja vrednih rezultatih temelječi zbirni laboratorijski podatki in ob dejstvu, da širjenje večkratno odpornih mikroorganizmov pomeni eno od največjih tveganj za varnost pacienta, avtorja menita, da bi morali mikrobiološko dejavnost opredeliti kot strateško za državo in sprejeti dopolnitve zakonodaje, ki bi celovito regulirala delovanje mreže izvajalcev.

## MOŽNOSTI RAZVOJA MIKROBIOLOŠKE DEJAVNOSTI V SLOVENIJI

Da bi lahko načrtovali mrežo izvajalcev mikrobiološke dejavnosti, urejali zakonske podlage in način financiranja ter izbrali najboljšo organizacijsko obliko delovanja laboratorijev, je potrebno opredeliti razvojne cilje in določiti standarde, ki jih mora dosegati stroka. V dokumentu Predlog izvajalcev mikrobiološke dejavnosti v republiki Sloveniji, smo člani RSK opredelili naslednje razvojne cilje za področje medicinske mikrobiologije:

- zagotavljanje zaupanja vrednih rezultatov v čim krajšem času;
- zagotavljanje enakih odzivnih časov za vsa področja v Sloveniji;
- zagotavljanje vseh razpoložljivih metod in tehnik pomembnih v mikrobiološki diagnostiki v državi;
- izvajanje vseh javnozdravstvenih mikrobioloških aktivnosti, ki so potrebne za preprečevanje in obvladovanje nalezljivih bolezni, okužb povezanih z zdravstveno oskrbo in obvladovanje širjenja odpornosti mikroorganizmov;
- zagotavljanje kapacitet za izvajanje učnih programov in usposabljanj za vse vrste profilov povezanih z medicinsko mikrobiologijo;
- krepitev raziskovalnega dela za promocijo Slovenije v mednarodnem prostoru in domačem okolju (5).

Kot standarde, ki jih moramo dosegati pri strokovnem delu, pa smo opredelili:

- obravnavanje vzorcev v času, ki ne presega dopustnih transportnih časov;
- dnevno izvajanje vseh tistih preiskav, ki omogočajo pridobitev rezultata isti dan;
- zagotavljanje uporabe enakih ali vsaj enakovrednih tehnologij vsem naročnikom preiskav;
- ustrezna organiziranost dežurne službe in stalne pripravljenosti;

- dosegljivost rezultata isti dan, kot je bil pridobljen v laboratoriju;
- elektronsko naročanje preiskav;
- prisotnost specialista mikrobiologa ves obratovalni čas laboratorija, ki omogoča konzultacijo z ustreznim specialistom klinične mikrobiologije pred odvzemanjem vzorca in po opravljeni preiskavi za razlago rezultatov preiskave;
- uporaba najsodobnejših metod in tehnik.

Da bi lahko dosegali zastavljene cilje in delovali v skladu z željenimi standardi so nam v stroki na razpolago naslednje organizacijske oblike:

- le ena organizacija, ki izvaja mikrobiološko dejavnost;
- obstoječa oblika organiziranosti;
- delovanje mikrobioloških laboratorijev znotraj bolnišnic;
- izvajanje dela ali celotnega obsega mikrobiološke dejavnosti v tujini;
- model mreže združenih regionalnih laboratorijev z organiziranimi dislociranimi enotami v bolnišnicah (5).

V stroki ne smemo nikoli zanemariti tudi pravnega statusa izvajalcev dejavnosti in njihovega financiranja. Trenutno vsi mikrobiološki laboratoriji z dovoljenjem za delo delujemo znotraj javnih zavodov, katerih lastnica in ustanoviteljica je država. V stroki zagovarjamo stališče, da se mora mikrobiološka dejavnost zaradi strateškega pomena, v Sloveniji izvajati kot javna služba v okviru mreže javnih zdravstvenih zavodov in da mora država preko svojih inštitucij in mehanizmov prevzeti vlogo regulatorja in nadzornika cen.

V precejšnjem delu naše zakonodaje država potrjuje željeni koncept. Že v 51. členu Ustave Republike Slovenije je določeno, da ima vsakdo pravico do zdravstvenega varstva pod pogoji, ki jih določa zakon ter da se z zakonom določa pravice do zdravstvenega varstva iz javnih sredstev (6). Za-

kon o zdravstveni dejavnosti nato v tretjem členu določa, da javna zdravstvena služba obsega zdravstvene storitve, katerih trajno in nemoteno opravljanje zagotavljajo v javnem interesu država in lokalne skupnosti in ki se, temelječe na načelu solidarnosti, v skladu s predpisi, ki urejajo zdravstveno varstvo in zdravstveno zavarovanje, zagotavljajo kot pravice obveznega zdravstvenega zavarovanja ter se v celoti ali deloma financirajo iz javnih sredstev, predvsem iz obveznega zdravstvenega zavarovanja. Zdravstvene storitve iz prejšnjega stavka kot negospodarske storitve splošnega pomena izvajalci zdravstvene dejavnosti opravljajo na nepridobiten način, tako da se presežek prihodkov nad odhodki porabi za opravljanje in razvoj zdravstvene dejavnosti (7). Čeprav je s 23.c členom Zakona o Zdravstveni dejavnosti izvajanje mikrobioloških preskušanj za potrebe izvajalcev zdravstvene dejavnosti kot javna služba opredeljeno le za Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, pa z umestitvijo vseh mikrobioloških laboratorijev v javne zavode potrjuje interes, da se ta dejavnost izvaja kot javna služba in kot neprofitna dejavnost v celotni mreži, saj Zakon o zavodih določa, da se javni zavodi ustanovijo za področja, kjer cilj opravljanja dejavnosti ni pridobivanje dobička (7, 8). V Resoluciji o nacionalnem planu zdravstvenega varstva 2015–2025 Skupaj za družbo zdravja, se je resorno ministrstvo nadalje zavezalo, da bo na področju dejavnosti laboratorijske medicine izvedlo dva ukrepa in sicer določilo strategijo razvoja laboratorijske dejavnosti in izvedlo projekt vzpostavitve referenčnih centrov in mreže medicinskih laboratorijev ter opredelilo mrežo izvajalcev laboratorijske dejavnosti, ki se financira iz javnih sredstev (9). Nazadnje je potrebno upoštevati še določila drugega odstavka 24. člena Splošnega dogovora za leto 2018, ki so v letni pogodbi med Zavodom za zdravstveno zavarovanje republike Slovenije in iz-

vajalci zdravstvene dejavnosti zapisana že leta, in sicer, da cene storitev javnih zavodov in drugih izvajalcev, ki opravljajo zdravstvene storitve za izvajalce, ki se financirajo iz sredstev zdravstvenega zavarovanja, niso pa pogodbeni partnerji Zavoda, odobrava minister za zdravje (10). Ob vsem tem je praktično nemogoče razumeti, zakaj ista lastnica ob odločitvi, da se mikrobiološka dejavnost izvaja v okviru javnih zavodov kot javna služba, ne razreši situacije, ko smo si laboratoriji primorani v praksi za pridobivanje »posla« na trgu konkurirati v postopkih javnega naročanja, se podvajajo kapacitete, financirane iz istega vira, in razkraja dobro delujoč sistem.

Ko se odločamo o smeri razvoja in obliki organiziranosti, za katero ocenjujemo, da nam bo prinesla pričakovane rezultate, je tako potrebno upoštevati najmanj politične usmeritve, razpoložljive vire, geografske okoliščine in pričakovane cilje. Tudi v tem prispevku bi avtorja želela poudariti, da sta mnenja, da je model mreže združenih regionalnih laboratorijev z organiziranimi dislociranimi enotami v bolnišnicah najprimernejša oblika organiziranosti mreže slovenskih mikrobioloških laboratorijev, kar nenazadnje potrjuje praksa, ki se v zadnjih letih razvija najmanj na Švedskem, Finskem v Franciji in Italiji. V Sloveniji je bila dislocirana enota matičnega laboratorija Bolnišnici Topolšica in Bolnišnici Brežice s strani Oddelka za medicinsko mikrobiologijo Zavoda za zdravstveno varstvo Celje ponujena že v letu 2012. Žal so različne okoliščine preprečile realizacijo projekta, žal tudi zato, ker bi bili v primeru postavitve takšne enote pravzaprav pionirji koncepta, ki se zdaj uveljavlja v tujini.

Odgovor na vprašanje, ali je v Sloveniji potrebno in primerno ustanavljati dodatne samostojne mikrobiološke laboratorije, se ponuja pravzaprav sam, vsakomur, ki je pripravljen iskreno odgovoriti na naslednja vprašanja:

1. Glede na to, da je država Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano ustanovila z namenom, da racionalizira mrežo devet od trenutnih 14 lokacij delovanja mikrobioloških laboratorijev, ali ustanovitev laboratorijev v 24 bolnišnicah in 63 zdravstvenih domovih sledi namenu države, da dejavnosti zagotovi kritično maso analiziranih vzorcev, ustrezno strokovno moč in racionalno rabo virov?
2. Če laboratorijev ne bomo ustanovili v vseh 24 bolnišnicah in 63 zdravstvenih domovih, po kakšnih kriterijih nekaterim bolnišnicam in zdravstvenim domovom mikrobiološki laboratorij pripada in katerim ne?
3. Ali nas zgodba otroške srčne kirurgije ni naučila, da laboratorij z enim specialistom mikrobiologom nima zagotovljenega dolgoročno stabilnega in strokovno ustreznega delovanja?
4. Kaj storiti z laboratorijem, kjer je edini specialist na dolgotrajni bolniški odsotnosti, je zapustil laboratorij ali celo umrl?
5. Kdo bo prevzel odgovornost za rezultate preiskav v laboratoriju, ki deluje brez specialista mikrobiologa?
6. Če upoštevamo zgodovino razvoja medicinskih biokemijskih laboratorijev in njene posledice (100 delujočih laboratorijev z manj kot 50 specialisti, med katerimi ni več zdravnikov), ali iskreno verjamemo, da mikrobiološki laboratorij lahko deluje brez zdravnika specialista mikrobiologa in da ga lahko nadomešča kdorkoli?
7. Ali ustanavljanje dodatnih mikrobioloških laboratorijev pomeni racionalno rabo javnih sredstev ob predpostavki, da so razpoložljive kapacitete dovolj velike in v celoti vzpostavljene iz javnih sredstev?

## ZAKLJUČEK

Ukrepi za razrešitev okoliščin, ki ogrožajo razvoj mikrobiološke dejavnosti v Sloveniji, niso preprosti in zahtevajo strokovno odgovorne sogovornike, ki imajo hkrati tudi pristojnosti, da takšne ukrepe izvedejo. Ker je slovenska mikrobiološka stroka majhna in deležnikom ta trenutek zagotavlja vse kar potrebujejo, se zdi, da tveganja niso visoka. Zaradi majhnosti trga

se zavedamo, da velikim zasebnim laboratorijskim verigam iz tujine ne moremo konkurirati. Če želimo dejavnost v Sloveniji ohraniti, mora mreža delovati znotraj javnega zdravstvenega sistema, država mora njegovo delovanje natančno in strogo regulirati in po več kot 20 letih opozarjanja na pravne nedoslednosti si želimo, da bi stroka stoletnico delovanja dočakala v urejenem sistemu.

## LITERATURA

1. Pascual A, Peigue-Lafeuille H. The principles of microbiological work and good laboratory practices. In: Cornaglia G, Courcol R, Herrmann JL, et al., eds. *European Manual of Clinical Microbiology*. Eprenay (Marne); 2012. p. 21–8.
2. Pravilnik o pogojih, ki jih morajo izpolnjevati laboratoriji za izvajanje preiskav na področju laboratorijske medicine. Uradni list RS št. 64/04.
3. Seznam laboratorijev, ki so oddali vloge, bili pregledani in ki majo izdana dovoljenja Ministrstva za zdravje [internet]. Ljubljana: Ministrstvo za zdravje. 2018 [citirano 2018 Okt 27]. Dosegljivo na: [http://www.mz.gov.si/si/delovna\\_podrocja\\_in\\_prioritete/zdravstveno\\_varstvo/mreza\\_na\\_primarni\\_sekundarni\\_in\\_terciarni\\_ravni/laboratoriji\\_za\\_izvajanje\\_preiskav\\_na\\_podrocju\\_laboratorijske\\_medicine/](http://www.mz.gov.si/si/delovna_podrocja_in_prioritete/zdravstveno_varstvo/mreza_na_primarni_sekundarni_in_terciarni_ravni/laboratoriji_za_izvajanje_preiskav_na_podrocju_laboratorijske_medicine/)
4. Seznam preiskav s področja medicinske biokemije [internet]. Ljubljana: RSK za laboratorijsko diagnostiko; 2015 [citirano 2018 Okt 27]. Dosegljivo na: [http://www.mz.gov.si/si/delovna\\_podrocja\\_in\\_prioritete/zdravstveno\\_varstvo/mreza\\_na\\_primarni\\_sekundarni\\_in\\_terciarni\\_ravni/laboratoriji\\_za\\_izvajanje\\_preiskav\\_na\\_podrocju\\_laboratorijske\\_medicine/](http://www.mz.gov.si/si/delovna_podrocja_in_prioritete/zdravstveno_varstvo/mreza_na_primarni_sekundarni_in_terciarni_ravni/laboratoriji_za_izvajanje_preiskav_na_podrocju_laboratorijske_medicine/)
5. Poročilo o delu Razširjenega strokovnega kolegija za mikrobiologijo in imunologijo za leto 2016 [internet]. Ljubljana: Razširjeni strokovni kolegij za mikrobiologijo in imunologijo; 2017 [citirano 2018 Okt 27]. Dosegljivo na: [http://www.mz.gov.si/file-admin/mz.gov.si/pageuploads/zdravstveni\\_svet/RSK\\_letna\\_porocila/](http://www.mz.gov.si/file-admin/mz.gov.si/pageuploads/zdravstveni_svet/RSK_letna_porocila/)
6. Ustava Republike Slovenije. Uradni list RS št. 33/91-l.
7. Zakon o zdravstveni dejavnosti. Uradni list RS št. 23/05.
8. Zakon o zavodih. Uradni list RS št. 12/91.
9. Resolucija o nacionalnem planu zdravstvenega varstva 2016–2025 »Skupaj za družbo zdravja«. Uradni list RS št. 25/16.
10. Splošni dogovor za pogodbeno leto 2018 [internet]. Ljubljana: Ministrstvo za zdravje, Zdravniška zbornica Slovenije, Združenje zdravstvenih zavodov Slovenije, Lekarniška zbornica Slovenije, Skupnost slovenskih naravnih zdravilišč, Skupnost socialnih zavodov Slovenije, Skupnost organizacij za usposabljanje Slovenije, Zavod za zdravstveno zavarovanje Slovenije; 2018 [citirano 2018 Okt 27]. Dosegljivo na: <http://www.zzs.si/egradivap/39FA2567791B276AC12582490028D-9BC>



Metka Paragi<sup>1</sup>, Katarina Prosenc<sup>2</sup>, Verica Mioč<sup>3</sup>

# Razvoj mikrobiologije v javnem zdravstvu v Sloveniji

## *Development of Public Health Microbiology in Slovenia*

### IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: mikrobiologija, javno zdravje, javnozdravstvena mikrobiologija, javnozdravstveni laboratoriji, referenčni laboratoriji

Nedvomno začetkov mikrobiologije v javnem zdravstvu ni moč jasno opredeliti, saj je mikrobiologija kot celota vedno z enim delom spremljala tudi nacionalne javnozdravstvene mikrobiološke parametre, tako v povezavi z epidemiologijo kot ostalimi deležniki na področju veterine, hrane, vode in okolja. Vendar je leta 2004 z ustanovitvijo Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje nalezljivih bolezni (ECDC) dobila jasno opredeljeno vlogo in mesto, tako v stroki kot v politični organiziranosti držav Evropske Unije. Slovenija je tako v skladu s smernicami ECDC znotraj svojega sistema laboratorijev za medicinsko mikrobiologijo organizirala diagnostične, referenčne laboratorije in javnozdravstveni laboratorij. Za oceno zmogljivosti mikrobiološke diagnostike je bil vzpostavljen sistem EULabCap, ki ga Slovenija vsako leto izpolnjuje. Rezultati kažejo visoko zmogljivost oz. sposobnost implementacije in uporabe testov, hitro širjenje in uporabo molekularnih metod za nadzor ter karakterizacijo številnih bolezni in spremljanje odpornosti proti protimikrobnim zdravilom. V letu 2016 je Slovenija dosegla visoko oceno za laboratorijski prispevek k nacionalnemu nadzoru, pripravljenosti za na novo porajajoče se bolezni in podporo pri odzivu na izbruhe. Izboljšana je bila referenčna diagnostična potrditev in identifikacija patogenov. Slovenija je tudi pripravljena na implementacijo metode sekvenciranja celotnega genoma za nadzor nad povzročitelji nalezljivih bolezni po smernicah ECDC. Slovenijo in njeno Ministrstvo za zdravje čaka še veliko dela pri imenovanju in zakonodaji na področju referenčne mikrobiološke laboratorijske dejavnosti ter pri izdelavi posameznih diagnostičnih smernic na nacionalnem nivoju.

### ABSTRACT

KEY WORDS: public health, microbiology, public health laboratory, reference laboratory

Undoubtedly, the beginnings of microbiology in public health cannot be clearly defined, as microbiology as a whole has always involved national public health microbiological parameters both in relation to epidemiology and other sectors (veterinary

<sup>1</sup> Dr. Metka Paragi, univ. dipl. biol., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Grablovičeva ulica 44, 1000 Ljubljana; metka.paragi@nlzoh.si

<sup>2</sup> Mag. Katarina Prosenc, univ. dipl. biol., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Grablovičeva ulica 44, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Verica Mioč, univ. dipl. mikrobiol., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Grablovičeva ulica 44, 1000 Ljubljana

medicine, food, water and the environment). However, in 2004, with the establishment of the European Centre for Disease Prevention and Control – ECDC, its role and place were clearly defined, both in the professional field and in the political organization of EU countries. Slovenia has organized diagnostic reference (de facto) laboratories and a public health laboratory within its own system of medical microbiology laboratories. The EULabCap system was established for microbiological diagnostics assessment with Slovenia meeting its requirements each year. Results show high performance, that is, the ability to implement and use tests, rapid spread and use of molecular methods to control and characterize many diseases as well as to monitor resistance to antimicrobials. In 2016, Slovenia achieved a high score for laboratory contribution to national surveillance, preparedness for emerging diseases, and outbreak response support. Reference diagnostic confirmation and identification of pathogens have been improved. Slovenia is also ready to implement the WGS (whole genome sequencing) method for controlling infectious disease agents in line with ECDC guidelines. Much work is still ahead for Slovenia and its Ministry of Health with regard to designation and legislation in the area of reference microbiological laboratory activities and development of individual diagnostic guidelines at the national level.

## ZAČETKI MIKROBIOLOGIJE V JAVNEM ZDRAVSTVU

Nedvomno začetkov mikrobiologije v javnem zdravstvu ni moč jasno opredeliti, saj je mikrobiologija kot celota vedno z enim delom spremljala tudi nacionalne javnozdravstvene mikrobiološke parametre, tako v povezavi z epidemiologijo kot ostalimi deležniki na področju veterine, hrane, vode, okolja in živil. Vendar je leta 2004 z ustanovitvijo Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje nalezljivih bolezni (angl. *European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) dobila jasno opredeljeno vlogo tako v stroki kot v politični organiziranosti držav EU (1).

V strategiji Evropske Unije (EU) je napisano, da imajo vsi državljani znotraj EU pravico do visoko kvalitetne klinične in javnozdravstvene mikrobiologije ter da je naloga držav članic in ECDC, da poskrbijo za razvoj in krepitev mikrobiologije (2). Javno zdravstvo mikrobiologijo opredeljuje kot presečno dejavnost, ki povezuje mikrobiologijo s področij človeka, veterine, vode, hrane in okolja z osredotočenostjo na zdravje človeka in njegove bolezni. Za to

potrebuje laboratorijske strokovnjake, ki so se sposobni strokovno povezovati z ostalimi disciplinami, predvsem z epidemiologijo in kliniki. Za te namene je bila nujna postavitev javnozdravstvenih mikrobioloških laboratorijev ali laboratorijev s temi funkcijami, ki igrajo ključno vlogo pri detekciji, spremljanju, odgovorih na epidemije in lahko nudijo znanstvene kazalce za preprečevanje in kontrolo nad nalezljivimi boleznimi.

ECDC nima lastnih laboratorijev, zato znotraj svoje organiziranosti skrbi, da vsaka država članica jasno in določeno prispeva s svojimi podatki o nalezljivih boleznih k skupnemu nadzoru in preprečevanju bolezni znotraj EU (3). Hkrati se povezuje z ameriškim CDC (angl. *Centers for Disease Control and Prevention*) in svetovno zdravstveno organizacijo (angl. *World Health Organization*, WHO) za namene svetovnega spremljanja, zlasti na področju bioterorizma.

Da bodo javnozdravstveni laboratoriji posameznih držav članic delovali na skupen jasno koordiniran način, se morajo znotraj države in na evropskem nivoju povezovati z nacionalnimi referenčnimi labo-

ratoriji, v kolikor niso le-ti že njihov sestavni del. Tako je naloga vsake države članice vzpostavitev nacionalne mreže referenčnih laboratorijev (NRL-jev) pod okriljem in imenovanjem Ministrstva za zdravje (MZ). Za ta namen smo na ECDC oblikovali dokument s tehničnimi zahtevami za opredelitev in imenovanje NRL-jev znotraj držav članic (4). Te laboratorije mora vsaka država članica uradno imenovati in financirati. Med osnovne aktivnosti referenčnih laboratorijev štejemo:

- obvladovanje referenčnih metod za detekcijo in tipizacijo povzročiteljev (potrjevanje povzročiteljev kot podpora diagnostičnim laboratorijem),
- zagotavljanje in nadzor nad referenčnim materialom (vzdrževanje nacionalne banke izolatov),
- strokovno svetovanje javnozdravstvenim deležnikom in odločevalcem,
- sodelovanje in razvoj na nacionalnem in mednarodnem nivoju,
- spremljanje, pripravljenost in odziv pri obvladovanju izbruhov.

NRL-ji posameznih držav članic pa se strokovno povezujejo med seboj na evropskem nivoju za namene izmenjave znanj in spremljanja posameznih patogenov.

## ZAČETKI MIKROBIOLOGIJE V JAVNEM ZDRAVSTVU V SLOVENIJI

Organiziranje mikrobiologije v javnem zdravstvu v Sloveniji ni bilo dovolj vodeno in načrtovano s strani države. Trenutno stanje je predvsem posledica zavezujočega upoštevanja smernic ECDC posameznih držav članic in dela strokovnjakov, ki so se borili za neodvisno javnozdravstveno politiko tudi na področju mikrobiologije. Organiziranost mreže ECDC zahteva v vsaki državi članici v eni od javnozdravstvenih inštitucij nacionalno kontaktno točko, ki je odgovorna za zbiranje in poročanje podatkov ter koordiniranje z drugimi labo-

ratoriji znotraj države in povezovanje z MZ (3). V takratni organiziranosti je v Sloveniji ta vloga smiselno pripadla Inštitutu za varovanje zdravja (IVZ), ki je skupaj z MZ imel kompetenco in dolžnost imenovati kontaktne točke (osebe) za področji mikrobiologije (angl. *national microbiology focal point*, NMFP) in epidemiologije (angl. *national surveillance focal point*, NSFP) in enako vse kontaktne točke (angl. *operational contact points*, OCP) za posamezne povzročitelje na področju epidemiologije in mikrobiologije. Na MZ so imenovali še strokovnjake v svetovalna in strokovna telesa na ECDC.

Takratni IVZ je, po dogovoru z MZ, znotraj svoje inštitucije iz obstoječega medicinskega mikrobiološkega laboratorija, ki je že vsa leta deloval tesno z epidemiologi, ustanovil neodvisni javnozdravstveni laboratorij, tako da je leta 2007 temu laboratoriju skoraj v celoti odvzel rutinsko klinično diagnostiko in mu dodelil poglobljeno delo na javnozdravstveno pomembnih povzročiteljih nalezljivih bolezni. V javnozdravstvenem laboratoriju je bil imenovan NMFP, ki ima nalogo koordinacije z ostalimi NRL-ji znotraj države in skupnega poročanja epidemiologom ter na ECDC. Osnovne naloge tega javnozdravstvenega laboratorija so ohranjene in poglobljene še danes:

- kontinuirano spremljanje in nadzor nad nalezljivimi boleznimi v tesnem sodelovanju z epidemiologi;
- poseben nadzor nad infekcijskimi boleznimi, kjer podatki iz diagnostičnih laboratorijev niso zadostni za realno oceno situacije;
- spremljanje in proučevanje mikroorganizmov in njihovih sprememb, ki bi lahko vodile k spremenjeni klinični sliki in/ali spremenjeni epidemiologiji bolezni;
- sodelovanje pri pripravi smernic za skupno standardizirano spremljanje nalezljivih bolezni;
- vpeljevanje novih metod v skladu z



- ECDC, smernicami WHO ter zadnjimi znanstvenimi dosežki za boljši in ustrezen nadzor nad nalezljivimi boleznimi;
- nadzor nad boleznimi, proti katerim cepimo;
  - sposobnost povezovanja mikrobiologije, kemije, veterine in strokovnjakov za predelavo hrane pri nadzoru izbruhov, preučevanju kroženja in obnašanja povzročiteljev;
  - tesno sodelovanje z mednarodnimi mrežami za nadzor, kot so ECDC, WHO in Evropska agencija za varnost hrane (angl. European Food Safety Authority, EFSA) pri izmenjavi podatkov, pripravi poročil, validaciji metod in oblikovanju smernic;
  - 24-urni nadzor nad nacionalni in mednarodni izbruhi.

V skladu s sklepom 2119/98/ES Evropskega parlamenta 2008 je Slovenija na zahtevo ECDC pripravila tudi lasten seznam *de facto* NRL-jev za patogene, ki jih zajema ta uredba. Od 53 zahtevanih patogenov je naslednje število NRL-jev po posameznih inštitucijah:

- 29 znotraj Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo (IMI) Medicinske fakultete v Ljubljani,
- 20 znotraj Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (NLZOH),
- 2 znotraj Nacionalnega veterinarskega inštituta (NIV),
- 1 znotraj Klinike Golnik,
- 1 znotraj Medicinske fakultete v Ljubljani.

Vsi NRL-ji svoje naloge opravljajo *de facto*, ker MZ še do danes ni opravilo imenovanja le-teh. Enako vsi NRL-ji znotraj države opravljajo vse strokovne funkcije, ki so zahtevane v ECDC smernicah (4). Z reorganizacijo laboratorijev leta 2014 je nacionalni javnozdravstveni laboratorij IVZ prišel pod okrilje NLZOH skupaj s kontaktno toč-

ko NMFP. Nacionalna kontaktna točka za ECDC pa je skupaj z NSFP ostal takratni IVZ oz. sedanji NIJZ (Nacionalni inštitut za javno zdravje), ki je ohranil tudi vse najvišje kompetence glede imenovanj, skupaj z MZ. Strokovnjaki v svetovalnih in strokovnih telesih na ECDC pa niso bili odvisni od te reorganizacije in so ostali več ali manj isti.

### **EVROPSKI SISTEM SPREMLJANJA ZMOGLJIVOSTI IN KAPACITET LABORATORIJEV S PODROČJA MIKROBIOLOGIJE V JAVNEM ZDRAVSTVU (EULABCAP)**

Cilj večletnih strateških programov ECDC za razvoj mikrobiologije v javnem zdravstvu je spodbuditi in okrečiti evropsko mikrobiološko mrežo javnega zdravja za zagotovitev pravočasnih in zanesljivih informacij na področju odkrivanja nalezljivih bolezni in s tem njihovega učinkovitega preprečevanja in nadzora v državi in Evropi (5, 6). V ta namen so na ECDC v tesnem sodelovanju z nacionalnimi kontaktnimi točkami NMFP iz vseh držav članic in pridruženih članic ter Svetovalnim forumom ECDC (angl. *Advisory Forum*) razvili in implementirali t. i. Evropski sistem za spremljanje laboratorijskih zmogljivosti (angl. *EU Laboratory Capability Monitoring System*, EULabCap) na področju javnozdravstvene mikrobiologije. Sistem vključuje EULabCap vprašalnik (angl. *EULabCap Tool*), ki na letni ravni od leta 2014 ocenjuje ključne zmogljivosti in kapacitete posameznih laboratorijev in držav na področju javnozdravstvene mikrobiologije za namen spremljanja nalezljivih bolezni in pripravljenosti na epidemije na področju EU. Cilj je oceniti in spremljati laboratorijske kapacitete mikrobiologije v javnem zdravstvu, opredeliti prednostna področja za izboljšave ter spremljati vpliv dejavnosti na področju krepitve zmogljivosti in sistemskih

reform na nacionalnem, regionalnem in evropskem nivoju.

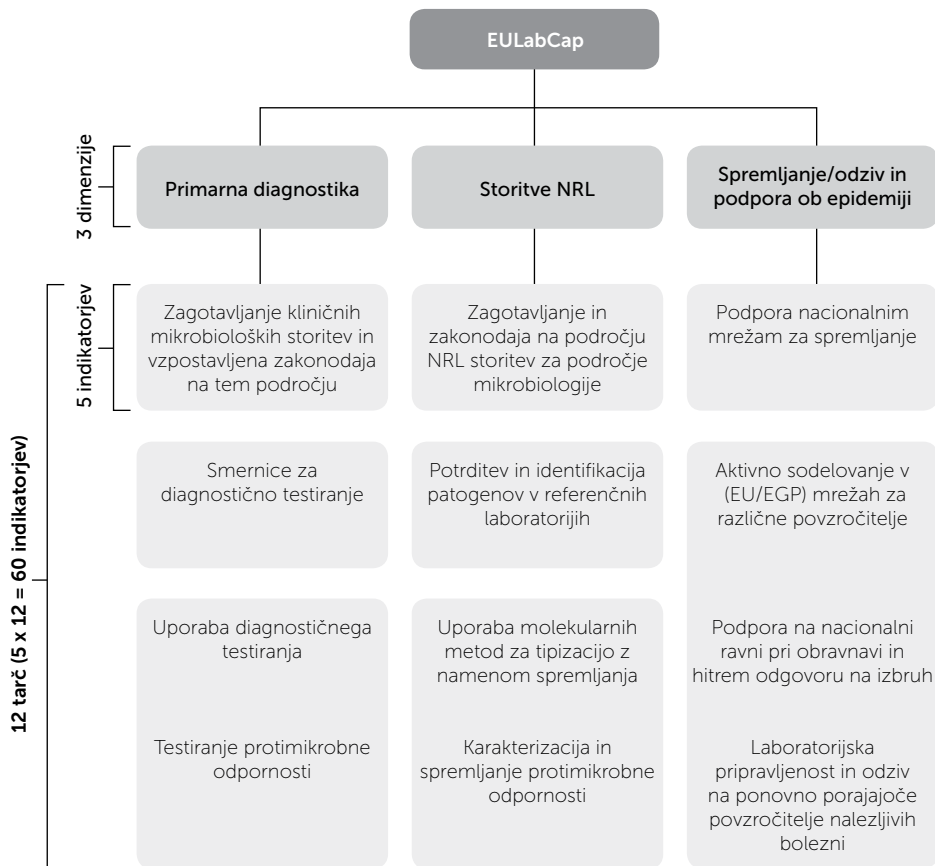
### **Struktura vprašalnika in ocenjevalni sistem**

EULabCap vprašalnik združuje 60 kazalcev/indikatorjev, s pomočjo katerih se ocenjuje zmožnost in kapaciteto mikrobioloških javnozdravstvenih laboratorijev v zagotavljanju bistvenih javnozdravstvenih funkcij, kot je to navedeno v zakonodaji in akcijskih planih EU, v mednarodni zdravstveni zakonodaji in tehničnih standardih (7). Indikatorji so večplastni in jih ločujemo glede na element (strukturo ali proces) mikrobiologije javnega zdravstva, ki ga merijo, oz. kako ga merijo (funkcionalna zmogljivost/storitvena kapaciteta).

Vprašalnik vključuje 24 strukturnih in 36 procesnih indikatorjev, ki se, glede na to, katero funkcijo laboratorija ocenjujejo, delijo na 38 indikatorjev za oceno zmogljivosti in 22 za oceno kapacitete (tabela 1). Usmerjeni so v 12 ciljnih področij oziroma tarč, razporejenih v treh nivojih (slika 1): primarna diagnostika, nacionalno mikrobiološko referenčno testiranje, laboratorijsko spremljanje nalezljivih bolezni in podpora

odzivu na epidemije (7, 8). Vsak indikator je opredeljen s tremi možnimi ocenami: nizka (ocena 0, zmogljivosti/kapacitete ni ali je omejena), srednja (ocena 1, zmogljivost/kapaciteta je prisotna, a ne dosega ali delno dosega evropska merila) ali visoka (ocena 2, popolna zmogljivost/kapaciteta v evropskem merilu) funkcionalna zmogljivost/kapaciteta (8). Indikatorji, za katere v državi ni podatka ali se ne uporabljajo, se ne upoštevajo in se v vprašalniku označijo s kratico NA (angl. *information not available, not applicable*). Skupni indeksi uspešnosti so izračunani za vsako tarčo in dimenzijo posebej kot povprečje vseh ocen indikatorjev, ki tarčo ali dimenzijo sestavljajo, pri čemer so vrednosti indeksov pretvorjene v merilu od 0 do 10. Tri četrtine indikatorjev temelji na političnih ciljih EU ali mednarodnih tehničnih standardih, medtem ko preostali del ocenjuje prispevek države k nadzoru in sistemu hitrega obveščanja v EU (8).

Za zbiranje podatkov in točkovanje ECDC poleg vprašalnika uporablja tudi podatkovne baze, kot so TESSy (angl. *The European Surveillance System*) in poročila EU mrež za različne povzročitelje.



Slika 1: Strukturni pregled EULabCap indikatorjev po dimenzijah in tarčah (9).

Tabela 1: Razdelitev EULabCap indikatorjev po dimenzijah, elementih in funkcijah, ki jih merijo (9).

Dimenzija	Število indikatorjev glede na element		Število indikatorjev po funkciji	
	Struktura	Proces	Zmožnost	Kapaciteta
Primarno diagnostično testiranje	11	9	11	9
Nacionalno mikrobiološko referenčno testiranje	5	15	14	6
Laboratorijsko spremljanje nalezljivih bolezni in podpora odzivu na epidemije	8	12	13	7
Skupaj	24	36	38	22

## Zbiranje, vrednotenje podatkov in objava rezultatov

Zbiranje in vrednotenje podatkov za predhodno leto poteka od oktobra do decem-

bra v tekočem letu. Enkrat letno (oktobra) ECDC pošlje vprašalnik predstavnikom posameznih držav (Nacionalnim kontaktnim točkam za področje mikrobiologije

v javnem zdravstvu) in jih pozove, da podatke za svojo državo zberejo in posredujejo nazaj na ECDC. Nacionalna kontaktna oseba vprašalnik oz. dele vprašalnika pošlje v izpolnitev odgovornim osebam za različna področja znotraj države (predstavnikom referenčnih laboratorijev za različne povzročitelje oz. operativnim kontaktnim točkam za posamezno bolezen (angl. *Operational Contact Points*), nato vse podatke zbere in vprašalnik v celoti pregleda. Morebitne nejasnosti oz. vprašanja razjasni z odgovornimi osebami za posamezna področja in izpolnjen vprašalnik pošlje na ECDC. Vprašalnik pregledajo odgovorne osebe na ECDC-ju. V primeru vprašanj se ponovno obrnejo na nacionalne kontaktne točke, ki jim, če je to potrebno, s pomočjo odgovornih oseb za posamezna področja znotraj svoje države, le-te razjasnijo.

Takoj ko so potrjeni podatki na voljo, ECDC pripravi in pošlje, nacionalnim kontaktnim osebami individualna, zaupna poročila za posamezno državo (angl. *EULabCap Country Profile*). Poročilo oz. EULabCap profil države vsebuje prilagojen povzetek, namenjen oblikovalcem politike v državi. V povzetku so predstavljena merila uspešnosti države na področju mikrobiologije v javnem zdravstvu. Opisane so dobre in šibke »točke« (oz. področja, ki potrebujejo dodatno pozornost), sposobnosti/zmogljivosti nacionalnih sistemov.

Kvalitativno je podana skupna ocena (angl. *Overall EULabCap index*) za državo, ki raven sposobnosti/zmogljivosti sistema za mikrobiologijo v javnem zdravstvu lahko ocenjuje kot nizko (indeksna vrednost: 0–5,9), srednjo (6,0–7,9) ali visoko (8,0–10). Podan je tudi odstotek indikatorjev, ki jih je država zbrala in posredovala (10). Skupna ocena vključuje grafični prikaz primerjave rezultatov (indeksov) države s kvartilnim razponom indeksov držav EU/EGP za 12 tarč, razporejenih v treh dimenzijah EU-

LabCap vprašalnika in grafični prikaz ocen, ki jih je dosegla država za posamezne indikatorje (0–2), in distribucija ocen indikatorjev za vse države EU/EGP.

ECDC v naslednjem koraku na svoji internetni strani objavi EULabCap poročilo. V poročilu so predstavljeni in obravnavani rezultati vseh držav EU/EGP z uporabo histogramov, radarskih grafov, črtnih grafov in grafikonov. Podatki so objavljeni tudi v obliki zemljevidov za vizualizacijo porazdelitve indeksov EULabCap med državami po indikatorjih, tarči in dimenziji.

### EULabCap profil Slovenije

Slovenija je aktivno sodelovala že v prvi EULabCap raziskavi leta 2014. V letu 2017 je za leto 2016 posredovala podatke za 98 % kazalnikov (11). S splošnim indeksom EULabCap 7,9/10 (2016) v primerjavi z 6,2, 6,8 in 7,1 v letih 2013, 2014 in 2015 so podatki, ki jih je predložila Slovenija, pokazali še vedno vmesno, a vztrajno povečevanje ravni široko uravnoveženih sposobnosti/zmogljivosti na področju mikrobiologije v javnem zdravju (11, 12).

Slovenija je dosegla visoke ocene za implementacijo zakonodaje na področju kliničnih diagnostičnih storitev, uspešno vpeljavo EU standardnih metod testiranja občutljivosti za antibiotike (implementacija EUCAST standardov) in aktivno sodelovanje v EU laboratorijskih mrežah za posamezne patogene oz. bolezni (11). Rezultati so pokazali visoko zmogljivost oz. sposobnost implementacije in uporabe testov, hitro širjenje in uporabo molekularnih metod za nadzor ter karakterizacijo številnih bolezni in spremljanje odpornosti na protimikrobna zdravila, vključno z odkrivanjem odpornosti proti kolistinu (11). V letu 2016 je Slovenija ravno tako dosegla visoko oceno za laboratorijski prispevek k nacionalnemu nadzoru, pripravljenost za na novo porajajoče se bolezni in podporo pri odzivu na izbruhe. Izboljšana je bila referenčna diag-

nostična potrditev in identifikacija patogenov (11). Slovenija je tudi pripravljena na implementacijo metode sekvenciranja celotnega genoma (angl. *whole genome sequencing*, WGS) za nadzor nad povzročitelji nalezljivih bolezní po smernicah ECDC (13–15).

Področja, ki so bila izpostavljena kot pomanjkljiva, so predvsem ureditev in zakonodaja na področju referenčne mikrobiološke laboratorijske dejavnosti ter pomanjkanje posameznih diagnostičnih smernic na nacionalnem nivoju (11).

### **ENLabCap (angl. *Enlargement countries Laboratory Capability Monitoring System*)**

V središču tehnične pomoči ECDC so že od leta 2006 tudi države širšega področja izven EU. To so države kandidatke in potencialne kandidatke za vstop v EU (angl. *EU enlargement countries*): Črna gora, Srbija, Makedonija, Albanija, Turčija, Bosna in Hercegovina, Kosovo (16). Država, ki se želi pridružiti EU, Evropskemu svetu predloži prošnjo za članstvo v EU. Evropska komisija oceni sposobnost prosilca za izpolnitev potrebnih zahtev in pristopnih meril. Za oceno napredka na področju preprečevanja in nadzora nalezljivih bolezní je Generalni direktorat Evropske komisije za zdravje in varnost hrane (angl. *European Commission's Directorate-General Health and Food Safety, DG SANTE*) zaprosil ECDC, naj razvije metodologije in orodja za ocenjevanje razvoja zmogljivosti, nadzora, pripravljenosti, odziva in zakonodaje na tem področju. Na podlagi te zahteve je ECDC razvil in preizkusil vrsto orodij, ki zdaj predstavljajo popoln paket ocenjevanja (16).

Za namen letnega spremljanja stanja in napredka na področju mikrobiologije v javnem zdravstvu je tako nastal in se razvija tudi ENLabCap vprašalnik, ki predstavlja prilagojeno inačico EULabCap vprašalnika za zgoraj omenjene države. Z

vprašalnikom želi ECDC okrepiti sposobnost in zmogljivost sistemov javnozdravstvene mikrobiologije v državah zahodnega Balkana in Turčije za zagotovitev pravočasnih in zanesljivih informacij, ocen tveganja ter učinkovitega nadzora, preprečevanja in obvladovanje nalezljivih bolezní. Cilj letnega ocenjevanja ranljivosti javnozdravstvene mikrobiologije je opredeliti prednostne naloge ter spremljati vpliv dejavnosti na področju krepitve zmogljivosti, sistemskih reform na nacionalnem, regionalnem in evropskem nivoju. Države Zahodnega Balkana in Turčija med drugim ocenjujejo, da jim lahko orodje ENLabCap pomaga pri spodbujanju potrebnih sprememb in njihovem izvajanju, kot tudi pri zagovarjanju trajnostnih mehanizmov financiranja mikrobiologije v javnem zdravstvu. Slovenija je tako kot tudi nekatere druge države članice EU sodelovala pri nastajanju vprašalnika, ki služi kot primer dobre prakse držav članic EU/EGP pri uporabi EULabCap orodja, in tako imela priložnost predstaviti svoje izkušnje, vrzeli in izzive, s katerimi se je soočala pri izpolnjevanju in analizi stanja na področju mikrobiologije v javnem zdravstvu.

### **ZAKLJUČEK**

Povzamemo lahko, da ima Slovenija močno mrežo medicinskih mikrobioloških laboratorijev z visokim indeksom uspešnosti glede na EULabCap sistem, ki služijo glede na status kot diagnostični, javnozdravstveni in referenčni laboratoriji in so zmožni zagotavljati vse diagnostične storitve, vključno z nadzorom nad nalezljivimi boleznimi, z zgodnjim odkrivanjem izbruhov ter odzivi nanje. Referenčni javnozdravstveni laboratoriji *de facto* zagotavljajo referenčne metode ter se povezujejo tudi z veterinarskimi laboratoriji in laboratoriji za vodo in hrano. Poročanje na ECDC poteka delno neposredno iz referenčnih laboratorijev in delno preko NIJZ,

kjer se mikrobiološki in epidemiološki podatki združijo. Slovenija prispeva v evropsko bazo vse ključne zahtevane podatke in si s tem zagotavlja zanesljiv nadzor in obvladovanje nalezljivih bolezni znotraj države, na evropskem in svetovnem nivoju.

Hkrati ugotavljamo, da Slovenijo in njeno MZ čaka še veliko dela pri imenovanju in zakonodaji na področju referenčne mikrobiološke laboratorijske dejavnosti ter pri izdelavi posameznih diagnostičnih smernic na nacionalnem nivoju.

## LITERATURA

1. European Commission. Regulation (EC) No 851/2004 of the European Parliament and of the Council of 21 April 2004 establishing a European Centre for disease prevention and control. Official Journal L 1422004 p. 0001-11.
2. ECDC Management Board. General Strategy and Framework of Actions (2007-2013) for ECDC Cooperations with Microbiology Laboratories and Research institutes in the EU. Eleventh Meeting. Stockholm; December 2007.
3. European Centre for Disease Prevention and Control. Coordinating Competent Bodies - 7<sup>th</sup>: structures, interactions and terms of reference [internet]. December, 2012 [citirano 2018 Sep 25]. Dosegljivo na: <http://ecdc.europa.eu/en/aboutus/governance/competent-bodies/Documents/coordinating-competent-bodies-structures-terms-of-reference-and-interactions-w-Annexes.pdf>
4. European Centre for Disease Prevention and Control. Core functions of microbiology reference laboratories for communicable diseases. Stockholm: ECDC; 2010. Stockholm. ISBN 978-92-9193-211-5, doi 10.2900/29017.
5. European Centre for Disease Prevention and Control. Updated Public Health Microbiology Strategy and Work Plan 2012-2016 [internet]. Stockholm: ECDC; 2011 [citirano 2018 Sep 24]. Dosegljivo na: [http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/microbiology/Documents/1203\\_updated-ECDC-public-health-microbiology-strategy-work-plan-2012-2016.pdf](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/microbiology/Documents/1203_updated-ECDC-public-health-microbiology-strategy-work-plan-2012-2016.pdf)
6. European Centre for Disease Prevention and Control. Public Health Microbiology Strategy 2018-2022 [internet]. Stockholm: ECDC; 2018. [citirano 2018 Okt. 5]. Dosegljivo na: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/ecdc-public-health-microbiology-strategy-2018-2022>
7. European Centre for Disease Prevention and Control. EU Laboratory Capability Monitoring System (EULabCap) – Report on 2013 survey of EU/EEA country capabilities and capacities. Stockholm: ECDC; 2016. ISBN 978-92-9193-738-7, doi 10.2900/63194
8. European Centre for Disease Prevention and Control. EU Laboratory Capability Monitoring System (EULabCap) – Report on 2015 survey of EU/EEA country capabilities and capacities. Stockholm: ECDC; 2017.
9. European Centre for Disease Prevention and Control. EU Laboratory Capability Monitoring System (EULabCap) – Report on 2014 survey of EU/EEA country capabilities and capacities. Stockholm: ECDC; 2016. Stockholm, 2016 ISBN 97892-9193-985-5, doi 10.2900/99341
10. European Centre for Disease Prevention and Control. EU Laboratory Capability Monitoring System (EULabCap) – Report on 2016 survey of EU/EEA country capabilities and capacities. Stockholm: ECDC; 2018.
11. European Centre for Disease Prevention and Control. EU Laboratory Capability Monitoring System (EULabCap) - Country profile Slovenia, Report on 2016 data. Stockholm: ECDC; 2017
12. European Centre for Disease Prevention and Control. EU Laboratory Capability Monitoring System (EULabCap) - Country profile Slovenia, Report on 2015 data. Stockholm: ECDC; 2016.
13. European Centre for Disease Prevention and Control. Monitoring the use of whole-genome sequencing in infectious disease surveillance in Europe. Stockholm: ECDC; 2018. Stockholm, ISBN 978-92-9498-190-5, doi: 10.2900/037665
14. European Centre for Disease Prevention and Control. ECDC roadmap for integration of molecular and genomic typing into European-level surveillance and epidemic preparedness – Version 2.1, 2016-19. Stockholm: ECDC; 2016. ISBN 978-92-9193-884-1, doi 10.2900/492985.

15. European Centre for Disease Prevention and Control. Expert opinion on whole genome sequencing for public health surveillance. Stockholm: ECDC; 2016. ISBN 978-92-9193-888-9, doi 10.2900/12442
16. European Centre for Disease Prevention and Control. Assessing communicable disease control and prevention in EU enlargement countries. Stockholm: ECDC; 2016. Stockholm, February 2016. ISBN 978-92-9193-734-9, doi 10.2900/411660

Alojz Ihan<sup>1</sup>

## Cepiva v razvoju – priložnosti in izzivi za javno zdravje

### *Vaccines in Development – Opportunity and Challenges for Public Health*

#### IZVLEČEK

---

KLJUČNE BESEDE: zasvojenost, cepiva, nosečnost, etika

Danes je več kot 300 novih cepiv v različnih fazah kliničnega preizkušanja (faza 1, 2 in 3). Med temi je večina cepiv proti okužbam (137), rakastim boleznim (101), alergijam (15) in nevrološkim boleznim (10); med preostalimi cepivi prevladujejo cepiva proti avtoimunskim obolenjem. Med antiinfektivnimi cepivi je nenehen problem pri pripravi cepiv proti gripi, ker so antigeni v cepivih visoko variabilni in imunogeni, med antigeni z nizko variabilnostjo pa gre pretežno za slabo imunogene antigene. Zato iskanje novih antigenov virusa gripe, ki bi delovali zaščitno in ne bi bili variabilni. Velik javnozdravstveni pomen ima tudi razvoj cepiv, ki so namenjena nosečnicam za zaščito njihovih otrok pred nalezljivimi boleznimi v prvih mesecih življenja. Med cepivi v razvoju pa veliko javno pozornost vzbujajo cepiva proti drogam (kokain, nikotin, fentanil, heroin, oksikodon), katerih namen je nevtralizacija učinkovin, ki jih uživajo odvisniki. Ob tehnoloških izzivih tovrstnih cepiv so v ospredju tudi etični.

#### ABSTRACT

---

KEY WORDS: flu vaccine, pregnancy, addiction, vaccines, ethics

Today, there are over 300 vaccines in different phases of clinical trials (phase 1, 2 or 3). The majority of them are against infectious diseases (137), cancers (101), allergies (15), neurologic disorders (10), while vaccines against autoimmune diseases are prevalent among other vaccines. With regard to anti-infective vaccines problems persist in the preparation of vaccines against influenza because the antigens in vaccines are either highly variable and immunogenic, and the antigens with low variability are mainly poorly immunogenic antigens. That is why we are still searching for new influenza virus antigens which would have protective action and would not be variable. The development of vaccines for pregnant mothers and protection of their children against infectious diseases in the first months of their lives is also of great significance for public health. Among the vaccines in development a lot of media attention is directed at anti-addiction vaccines (cocaine, nicotine, fentanyl, heroin, oxycodone), as their aim is to neutralise substances addicts use. In addition to technological challenges with such vaccines, ethical challenges are also in the foreground

---

<sup>1</sup> Prof. dr. Alojz Ihan, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana



## CEPLJENJE IN RAZVOJ NOVIH CEPIV

Cepljenje spada med največje uspehe v zgodovini medicine in hkrati tudi med največja upanja za medicino prihodnosti. Osnovna ideja cepljenja se je porodila iz opazovanja, da ljudje, ki so preboleli (in preživel) nekatere kužne bolezni (npr. črne kože, davico, ošpice, norice), pozneje niso več zboleli za enako boleznijo, čeprav so bili v stiku z okuženimi osebami. S klasično tehniko cepljenja, ko v človekovo telo vbrizgamo nežive mikrobnne delce, na nenevaren način posnemamo okužbo in izrabimo naravno zmožnost človeškega imunskega sistema, ki ob vdoru tujka v organizem spodbudi imunske celice, da v tednu ali dveh izdelajo protitelesa, ki potem uničijo vsiljivce.

Na žalost je število infekcijskih bolezni, pri katerih je bilo mogoče izdelati učinkovito cepivo na opisan, klasičen način, omejeno. Pri mnogih boleznih poskusi izdelave cepiva nimajo dobrih obetov. V tovrstno skupino spada vrsta izredno obremenjujočih bolezni, na primer malarija, sezonske okužbe dihal in aids. Zato je izdelava cepiv proti tem boleznim svojevrsten izziv za raziskovalce, saj bi morala biti cepiva na nek način 'pametnejša od narave'. Želje po izdelavi tovrstnih 'inovativnih' cepiv so sicer številne, in se ne zamejujejo samo na preprečevanje okužb. Zlasti z razvojem bioloških zdravil, ki temeljijo na proizvodnji protiteles, s katerimi nato zdravimo številne bolezni, je tudi proizvodnja cepiv dobila nove, širše ambicije preprečevanja in zdravljenja različnih, tudi neinfekcijskih bolezni.

Danes je več kot 300 novih cepiv v različnih fazah kliničnega preizkušanja (faza 1, 2 in 3). Med temi je večina cepiv proti okužbam (137), a zelo veliko novih cepiv je namenjeno preprečevanju ali zdravljenju rakastih bolezni (101), alergij (15) in nevroloških bolezni (10), med preostalimi cepivi prevladujejo cepiva proti avtoimunskim obolenjem (1).

Med antiinfektivnimi cepivi je zaradi bioloških lastnosti virusa gripe tradicionalen problem priprava bolj učinkovitih cepiv proti gripi z uporabo novih antigenov, ki ne bi bili variabilni in bi v cepivu povzročili nastanek zaščitnih protiteles. Trenutno so namreč antigeni v cepivih proti gripi bodisi visoko variabilni in imunogeni, med antigeni z nizko variabilnostjo pa gre pretežno za slabo imunogene antigene. Velik javnozdravstveni pomen ima tudi razvoj cepiv, ki so namenjena nosečnicam za zaščito njihovih otrok pred nalezljivimi boleznimi v prvih mesecih življenja. Med cepivi v razvoju pa veliko javno pozornost vzbujajo cepiva proti drogam (kokain, nikotin, fentanyl, heroin, oksikodon), katerih namen je nevtralizacija učinkovin, ki jih uživajo odvisniki. Ob tehnoloških izzivih tovrstnih cepiv so pomembni tudi etični (2).

## CEPIVA PROTI GRIPI

Antigenske prilagoditve virusa gripe omogočajo pretežno spremembe virusnega hemaglutinina (HA), kar virusu omogoča izogibanje pred ustvarjenimi imunskimi odzivi preteklih sezon. Antigenski epitopi HA so bodisi močno imunogeni in variabilni (tipično locirani v glavi HA domene) bodisi konstantni, a slabo imunogeni (tipično locirani v ročici HA domene). Z analizo epitopov v glavi HA domene, ki so konstantno vzbujali nastanek protiteles v sezonah gripe preteklih desetletij, so raziskovalci Univerze v Oxfordu nedavno objavili odmevno študijo. V njej so s pomočjo podatkov o genski variabilnosti virusa in seroloških odzivih nanj v zadnjih desetletjih opredelili nevariabilne epitope, ki so imunogeni in povzročajo nastanek nevtralizacijskih protiteles. Z matematičnim modeliranjem epitopskih struktur so opredelili pripravljive ključnih antigenov, ki bi vzbudili nastanek nevtralizacijskih protiteles proti konstantnim konformacijskim epitopom HA, skupnim kateremukoli virusu gripe (2).

## NAPREDEK V RAZVOJU CEPIV PROTI *HELICOBACTER PYLORI*

Leta 2011 je Moss s sodelavci razvil še danes aktualno inovativno platformo za napovedovanje T-celičnih epitopov *Helicobacter pylori* (HP), ki bi pri določenem posamezniku najbolj učinkovito aktivirali specifični odziv limfocitov T (3). Na ta način so za mišji model cepljenja pripravili polipeptidno, multiepitopsko cepivo v liposomih z dodatkom adjuvantnih CpG oligonukleotidov in toplotno labilnega enterotoksina. Cepivo povzroča širok imunski odziv, vključno s sterilizacijsko imunostjo (4). Podoben učinek so na mišjih modelih dosegla tudi nekatera druga multiepitopska cepiva s himernimi adjuvantnimi antigeni (5). Song s sodelavci je leta 2015 s tehnologijo napovedovanja T-celičnih epitopov razvil multiepitopsko cepivo, s katerim je v mišjem modelu preprečil nastanek želodčnega raka (6).

Pri razvoju klinično uporabnih cepiv je zadnji, zelo odmeven rezultat poročilo o oralnem cepivu, ki vsebuje podenoto ureaze B v kombinaciji z enterotoksinom B. Študija faze III na 4.464 otrocih, predhodno neokuženih s HP, je pokazala nad 70 % učinkovitost pri zaščiti pred okužbo s HP v treh letih po začetku študije, cepivo je bilo brez neželenih učinkov in je primerno za resen epidemiološki razmislek o tem, kje bi ga bilo smiselno uporabiti (7, 8).

## RAZVOJ CEPIV ZA NOSEČNICE Z NAMENOM ZAŠČITE NOVOROJENCA

### Oslovski kašelj

Otroke proti oslovskemu kašlju cepijo s tremi odmerki cepiva v prvem letu starosti in s četrtnim odmerkom v drugem letu. Prvi odmerek cepiva otroci pri nas dobijo pri treh mesecih starosti, a so zaščitene šele po drugem ali tretjem odmerku cepiva. Ker lahko v času, ko cepivo otroka še

ne ščiti, otrok ohranja zaščito proti boleznim zaradi protiteles, ki jih je med nosečnostjo pridobil iz krvi zaščitene mame, v zadnjih letih zdravniki močno priporočajo cepljenje nosečnic proti oslovskemu kašlju, da so otroci zaščiteni v teh prvih mesecih, dokler ne opravijo cepljenja (9).

Oslovski kašelj je bolezen, ki jo povzroča bakterija *Bordetella pertussis* in ogroža zlasti manjše otroke. Cepljenje učinkovito zaščiti pred zbolevanjem, ne pa pred naselitvijo bakterije na dihalni sluzici. Zato lahko tudi precepljen človek okužbo, ki jo je dobil od bolnega človeka, nekaj tednov ohrani na svoji dihalni sluznici in jo razširja na druge ljudi, čeprav sam ne zboli. Zato oslovski kašelj pri nas kljub visoki precepljenosti nikoli ni povsem izginil, letno pri nas zboli nekaj sto ljudi, pred uvedbo cepljenja pa je bilo obolelih nekaj tisoč. Po letu 2003 ponovno opažajo več zbolelih. Pri zelo majhnih otrocih je to lahko zelo naporna in ogrožajoča bolezen, pri kateri lahko otrok zaradi dihalne stiske ob napadu kašlja tudi umre ali pridobi trajne možganske poškodbe (9).

Če se nosečnica cepi, protitelesa, ki se tvorijo po cepljenju, preko posteljice vstopijo v otrokov krvni obtok in ga v prvih mesecih po rojstvu varujejo pred okužbo. Protitelesa začnejo skozi posteljico prehajati po 16. tednu nosečnosti, optimalen čas za cepljenje pa je čimprej po 24. tednu nosečnosti. Povsod po svetu nosečnice cepijo z mrtvim kombiniranim cepivom proti davici, tetanusu in oslovskemu kašlju. Cepljenje je prav zaradi zaščite novorojenčkov proti oslovskemu kašlju priporočljivo v vsaki nosečnosti (10).

Nosečnicam se priporoča tudi cepljenje proti gripi, saj spadajo med skupine, pri katerih gripa težje poteka. To cepljenje opravijo glede na sezono gripe, najbolj smiselno je oktobra in novembra, ne glede na obdobje nosečnosti. Sicer pa se med nosečnostjo zaradi slabšega imunskega odziva nosečnice in nezrelega imunskega odziva ploda

odsvetujejo cepljenja z živimi cepivi; to so cepiva proti ošpicam, mumpsu in rdečkam, rumeni mrzlici in noricam (11).

## Streptokokna sepsa novorojencev

Smiselnost cepljenja nosečnic proti streptokokom skupine B (SGB) temelji na pred več kot 40 leti opisanem pojavu, da je smrtno nevarna invazivna okužba s SGB pogostnejša pri novorojenčkih mater, ki imajo nizke serumske koncentracije protiteles proti serotipu SGB, ki je povzročil invazivno bolezen novorojenčka (12). Ker se bolezen pojavlja v zgodnjem obdobju novorojenčkovega življenja, je bolj kot cepljenje novorojenčka smiselno cepljenje nosečnice, katere zaščitna protitelesa IgG proti SGB nato transplacentarno preidejo v otrokovo kri. Rezultati imunizacije nosečnic z glikokonjugiranimi pripravki cepiv kažejo, da materina protitelesa proti SGB v novorojenčku ostajajo 2–3 mesece. Poglavitni prehod protiteles v novorojenčka se zgodi po 33. gestacijskem tednu, zato imajo nedonošenci, rojeni pred 34. gestacijskim tednom, kljub cepljenju zmanjšan nivo zaščitnih protiteles (13).

Polisaharidna cepiva proti kapsularnemu polisaharidu (CPS) so prva, ki so jih začeli preizkušati proti SGB že od leta 1930. Za izboljšanje imunogenosti so začeli kasneje izdelovati poskusna glikokonjugirana cepiva s CPS. V konjugiranih cepivih je polisaharid kovalentno vezan na proteinski nosilec. Konjugat protein-polisaharid je veliko bolj imunogen kot sam polisaharid. Pri poskusnih konjugiranih cepivih proti SGB se je kot proteinski nosilec za CPS najpogosteje uporabljal tetanusni toksoid (TT) in netoksična mutirana oblika difterijskega toksina (CRM). Oba nosilca sta tudi splošno uveljavljena v konjugiranih cepivih in z obema nosilcema so v fazi 2 preizkušanja cepiv proti SGB dosegali primerljive imunogene učinke (14).

Slabost polisaharidnih cepiv je poleg njihove slabše imunogenosti tudi omejena učinkovitost zgolj na serotipe SGB, proti katerim je izdelano cepivo. S tem lahko cepivo hitro postane neučinkovito ob menjanju serotipov SGB, ki prevladujejo v populaciji. Zato se je z napredkom analiz genoma SGB začel razvoj cepiv proti proteinom SGB, ki so skupni vsem tipom SGB. S tehniko sekvencioniranja celotnega bakterijskega genoma (angl. *whole genome sequencing*, WGS) je v letu 2015 podjetje MinervaX začelo 1. fazo kliničnega preizkušanja proteinskega cepiva proti SGB, ki je zasnovano na fuziji N-terminalnih delov dveh površinskih proteinov SGB, AlphaC and Rib (GBS-NN) (NCT02459262). MinervaX pričakuje, da bo cepivo z antigenom GBS-NN omogočilo zaščito proti 95 % sevom SGB (15).

## Respiratorni sincicijski virus

Respiratorni sincicijski virus (RSV) je najpomembnejši povzročitelj virusnih okužb dihal pri otrocih v prvih dveh letih starosti. Čeprav je za ogrožene otroke na voljo pasivna zaščita z protitelesi proti RSV, pa je poglavitna strategija za kontrolo RSV usmerjena v razvoj cepiva, ki bi ga prejele nosečnice, in bi zaradi prenosa zaščitnih protiteles proti virusu zaščitilo novorojenca pred zbolevanjem z RSV. V začetku leta 2018 je ameriški *National Institutes of Health* (NIH) objavil začetek kliničnega testiranja cepiva proti RSV (SeVRSV), izdelano na osnovi mišjega virusa Sendai, ki bo v imuniziranem prejemniku izražal RSV fuzijski protein in s tem izzval specifični protitelesni in T-celični odziv (16).

## CEPIVA PROTI DROGAM

Osnovna zamisel pri izdelavi cepiv proti drogam je oblikovanje protitelesnega odziva proti dejavni učinkovini v drogi. Protitelesa bi ob jemanju droge nevtralizirala učinkovino že v krvi, s tem bi bil preprečen prehod droge v možgane. Na ta način

zasvojenec kljub uživanju droge ne bi občutil njenih učinkov in bi zato izgubil interes za jemanje droge. Ob tem bi cepljenje, ki bi vzbudilo nastanek protiteles proti drogi, dolgoročno ohranilo nevtralizacijski učinek za več let naprej. To bi temeljito spremenilo pristop k terapiji zasvojenosti, saj bi odločitev za cepljenje pomenila nepovratno nevtralizacijo učinkov droge, medtem ko so današnja farmakološka sredstva, ki pomagajo pri odvajanju od drog, odvisna od njihovega stalnega jemanja, ki ga zasvojenec lahko tudi prekine in nato nadaljuje z zasvojenostjo (17).

V kliničnih ali predkliničnih študijah so testiranja nekaterih cepiv proti zasvojenosti s kokainom, nikotinom, heroinom in sintetičnima opiatoma fentanilom in oksikodonom. Pri izdelavi cepiv proti učinkovinom v drogah še vedno ostaja vrsta tehnoloških problemov, ki so posledica majhnih molekul učinkovin v drogah. Te molekule naravno ne izzovejo nastanka protiteles kljub njihovemu pojavljanju v krvi, zato so v projektih izdelave cepiv raziskovalci morali obiti nezmožnost spontanega nastajanja protiteles proti malim molekulam učinkovin v drogah. Izdelovalci cepiv težavo razrešijo s tem, da majhne molekule drog medsebojno povečajo v večje molekularne strukture (hapteni), ki jih nato naredijo dodatno imunogene še z dodajanjem ustreznih adjuvansov. Tako oblikovani cepilni pripravki proti učinkovinom drog nato vzbudijo uspešne protitelesne odzive (18).

Med cepivi proti drogam, ki so v različnih fazah preizkušanja, je cepivo proti kokainu (za boljšo imunogenost je kokain vezan z adenovirusom), nikotin (vezan na nanodelce), fentanil (vezan na tetanusni toksoid) in heroin (vezan na tetanusni toksoid). Poleg tehnično zahtevne indukcije protiteles proti drogi je potrebno v nekaterih primerih za uspeh cepiva zagotoviti še zelo veliko količino nastalih protiteles. To je zlasti pomembno pri naglo delujočih dro-

gah, kot je kokain, ki po aplikaciji na nosno sluznico pride v možgane v petih do desetih sekundah. Zato je potrebna zelo velika koncentracija protiteles v krvi, da lahko ta preprečijo nagli prehod kokaina iz nosne sluznice po krvi v možgane (19).

Dodatne, tudi etične in pravne probleme pa bo uporaba cepiv proti zasvojenosti izzvala zaradi nekaterih dejstev, ki odstopajo od običajnega pojmovanja cepiva in vloge cepljenja. Pojav protiteles proti drogi v krvi bo povzročil trajno inaktivacijo večjega dela zaužite droge, a hkrati cepljenje samo po sebi še ne ozdravi zasvojenosti. Povsem mogoče je torej, da zasvojenec po cepljenju še naprej poskuša z drogo dosegati njene učinke, le da po cepljenju zaradi nevtralizacije droge potrebuje deset in večkratne količine. To ne prinaša le velikih finančnih posledic za zasvojenca, ampak je mogoča tudi zdravstvena škoda, naprimer pri kadilcu tobaka, ki bi po cepljenju želel obnoviti učinek nikotina. Ker bi za enak učinek potreboval veliko večjo količino cigaret, bi to vodilo v veliko večjo nevarnost nastanka rakastih bolezni, kot pred cepljenjem proti nikotinu. Nekatera cepiva, zlasti proti opiatom (heroin), bi povzročila tudi inaktivacijo opiatnih protibolečinskih zdravil, in bi bil cepljen človek tako v primeru zdravljenja primoran uporabljati druga, neopiatna protibolečinska zdravila (20, 21).

Uvedba cepljenja proti odvisnostim bi morala biti zato zelo natančno pravno utemeljena: kakšen pritisk, poleg lastne želje odvisnika, bi bil dopusten za uvedbo cepljenja in kdo bi tak pritisk lahko izvajal? Bi lahko sodnik predpisal cepljenje za zaščito otroka pri noseči odvisnici od heroina ali kokaina? Bi lahko bil pristanek na cepljenje razlog za manjšo kazen pri odvisniku, ki je v stanju zmajšane prištevnosti zaradi droge izvedel kriminalno dejanje (22, 23)?

## LITERATURA

1. Ndaya-Oloo P, Pitisuttithum P, Tornieporth G, et al. Vaccine Update: Recent Progress With Novel Vaccines, and New Approaches to Safety Monitoring and Vaccine Shortage. *J Clin Pharmacol*. 2018; 58 Suppl 10: S123–S139.
2. Craig PT, Lourenço J, Walters AA, et al. A naturally protective epitope of limited variability as an influenza vaccine target. *Nat Commun*. 2018; 9 (1): 3859.
3. Moss SF, Moise L, Lee DS, et al. HelicoVax: Epitope-based therapeutic *Helicobacter pylori* vaccination in a mouse model. *Vaccine*. 2011; 29 (11): 2085–91.
4. Stubljar D, Jukić T, Ihan A. How far are we from vaccination against *Helicobacter pylori* infection? *Expert Rev Vaccines*. 2018; 17 (10): 935–45.
5. Mori J, Vranac T, Ihan A, et al. Chimeric flagellin as the self-adjuvanting antigen for the activation of immune response against *Helicobacter pylori*. *Vaccine*. 2012; 30: 5856–63.
6. Song H, Lv X, Yang J et al. A novel chimeric flagellum fused with the multi-epitope vaccine CTB-UE prevents *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer in a BALB/c mouse model. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015; 99: 9495–502.
7. Zeng M, Mao XH, Li JX, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of an oral recombinant *Helicobacter pylori* vaccine in children in China: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2015; 386: 1457–64.
8. Ihan A, Pinchuk IV, Beswick EJ. Inflammation, immunity, and vaccines for *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2012; 17: 16–21.
9. Leask J. Pregnant women's intention to take up a postpartum pertussis vaccine, and their willingness to take up the vaccine while pregnant: a cross sectional survey. *Vaccine*. 2013; 31: 3972–8.
10. Amirthalingam G, Andrews N, Campbell H, et al. Effectiveness of maternal pertussis vaccination in England: an observational study. *Lancet*. 2014; 384: 1521–8.
11. Regan AK, Mak DB, Hauck YL, et al. Trends in seasonal influenza vaccine uptake during pregnancy in Western Australia: implications for midwives. *Women Birth*. 2016; 29: 423–9.
12. Edmond KM, Kortsalioudaki C, Scott S, et al. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2012; 379: 547–56.
13. Heath PT, Schuchat A. Perinatal group B streptococcal disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2007; 21: 411–24.
14. Verani JR, McGee L, Schrag SJ, Division of Bacterial Diseases NCFI, Respiratory Diseases CfDC, Prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal disease—revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep*. 2010; 59: 1–36.
15. Di Renzo GC, Melin P, Berardi A, et al. Intrapartum GBS screening and antibiotic prophylaxis: a European consensus conference. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2015; 28: 766–8.
16. Blanco JC, Pletneva LM, McGinnes-Cullen L, et al. Efficacy of a respiratory syncytial virus vaccine candidate in a maternal immunization model. *Nat Commun*. 2018; 9: 1904.
17. Volkow ND, Collins FS. The role of science in addressing the opioid crisis. *N Engl J Med*. 2017; 377: 391–4.
18. Haney M, Gunderson EW, Jiang H, et al. Cocaine-specific antibodies blunt the subjective effects of smoked cocaine in humans. *Biol Psychiatry*. 2010; 67 (1): 59–65.
19. Polosa R, Benowitz NL. Treatment of nicotine addiction: present therapeutic options and pipeline developments. *Trends Pharmacol Sci*. 2011; 32: 281–9.
20. Stowe GN, Vendruscolo LF, Edwards S, et al. A vaccine strategy that induces protective immunity against heroin. *J Med Chem*. 2011; 54: 5195–204.
21. Bremer PT, Schlosburg JE, Banks ML, et al. Development of a clinically-viable heroin vaccine. *J Am Chem Soc*. 2017; 139 (25): 8601–11.
22. Bremer PT, Kimishima A, Schlosburg JE, et al. Combating synthetic designer opioids: a conjugate vaccine ablates lethal doses of fentanyl class drugs. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016; 55 (11): 3772–5.
23. Baruffaldi F, Kelcher AH, Laudenbach M, et al. Pre-clinical efficacy and characterization of candidate vaccines for treatment of opioid use disorders using clinically viable carrier proteins. *Mol Pharm*. 2018; 15 (11): 4947–62.

Polona Maver Vodičar<sup>1</sup>, Anja Šterbenc<sup>2</sup>, Mario Poljak<sup>3</sup>

# Napredek in ovire cepljenja proti človeškim papilomavirusom

## *Progress and Barriers in Human Papillomavirus Vaccination*

### IZVLEČEK

---

KLJUČNE BESEDE: HPV, cepljenje, učinkovitost, varnost, implementacija

Rezultati številnih kliničnih raziskav in podatki uspešnih nacionalnih programov cepljenja po svetu potrjujejo, da je cepivo proti človeškim papilomavirusom (HPV) učinkovito in izjemno varno. V državah z visoko precepljenostjo že beležijo pomembno upadanje prevalence okužb s HPV, genitalnih bradavic in predrakavih sprememb na materničnem vratu. Ob pojavu domnevnih povezav cepiva s težko opredeljivimi sindromi se ponekod po svetu borijo z nezaupanjem v varnost cepiva proti HPV, vendar so velike populacijske raziskave te povezave ovrgle in potrdile odličen varnostni profil cepiva. Največji izziv predstavlja uvedba cepiva v državah v razvoju, kjer je težko zagotoviti trajnostno finančno podporo in primerno zdravstveno infrastrukturo. Univerzalno cepljenje, ki zajema tudi dečke/moške, je na voljo le v posameznih državah, vendar se njihovo število počasi povečuje. V Sloveniji je bilo cepivo proti HPV v letu 2009 uvedeno v nacionalni program cepljenja za deklice v 6. razredu osnovne šole, precepljenost je žal le okoli 50 %.

### ABSTRACT

---

KEY WORDS: HPV, vaccination, effectiveness, safety, implementation

The results of numerous clinical trials and data from successful national vaccination programs worldwide confirm that the human papillomavirus (HPV) vaccine is effective and extremely safe. In countries with high HPV vaccination coverage, a significant decline in the prevalence of vaccine-related HPV types, genital warts and precancerous cervical lesions has already been recorded. With several difficult-to-define and controversial syndromes allegedly linked to HPV vaccines, some countries have been struggling with mistrust in the safety of the vaccine, however, large population-based studies have dismissed any links and confirmed an excellent safety profile of the HPV vaccine. The main challenge is still the introduction of the vaccine in developing countries, where it is difficult to provide sustainable financial support and appropriate healthcare

---

<sup>1</sup> Doc. dr. Polona Maver Vodičar, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; polona.maver@mf.uni-lj.si

<sup>2</sup> Asist. dr. Anja Šterbenc, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; anja.sterbenc@mf.uni-lj.si

<sup>3</sup> Prof. dr. Mario Poljak, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

infrastructure. Universal, gender-neutral vaccination is available only in some countries, but their number is slowly increasing. In Slovenia, HPV vaccination was introduced in 2009 as part of a national vaccination program for girls in the 6<sup>th</sup> grade of elementary school, but HPV vaccination coverage remains around 50%.

## UVOD

Človeški papilomavirusi (angl. *human papillomaviruses*, HPV) so heterogena skupina virusov, ki so etiološko povezani z nastankom številnih benignih, predrakavih in rakavih sprememb epitelija sluznice in kože pri človeku. Klinično najpomembnejši genotipi HPV spadajo v rod Alfa; med njimi sta nizkorizična genotipa HPV-6 in HPV-11 glavna povzročitelja genitalnih bradavic in papilomov grla, visokorizični genotipi HPV (najpomembnejša sta HPV-16 in HPV-18, sledijo pa jim HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58 in HPV-59) pa so v svetovnem merilu etiološko povezani s praktično 100 % primerov raka materničnega vratu, 88 % raka zadnjika, 78 % raka penisa ter 31 % raka ustnega dela žrela (1).

Okužba s HPV je najpogostejša spolno prenosljiva okužba na svetu; ocenjujejo, da se vsaj enkrat v življenju s HPV okuži večina spolno aktivnih oseb (2). Čeprav je večina okužb s HPV prehodne narave, se pri 5–10 % okuženih žensk razvije trajna okužba, ki predstavlja višje tveganje za razvoj malignih novotvorb.

Trenutno imajo dovoljenje za splošno uporabo tri cepiva: dvovalentno cepivo Cervarix (GlaxoSmithKline Biologicals, Belgija), ki ščiti pred okužbo s HPV-16 in HPV-18, štirivalentno cepivo Gardasil/Silgard (Merck & Co., ZDA/Sanofi Pasteur MSD, Francija), ki ščiti pred okužbo s HPV-6/-11/-16/-18, in devetvalentno cepivo Gardasil 9 (Merck & Co.), ki ščiti pred okužbo s HPV-6/-11/-16/-18/-31/-33/-45/-52/-58.

## UPORABA CEPIV PROTI HPV – KOPIČENJE DOKAZOV IN ŠIRITEV INDIKACIJ

Učinkovitost in varnost dvovalentnega in štirivalentnega cepiva pri preprečevanju okužbe s tarčnimi genotipi HPV in posledično pri preprečevanju nastanka predrakavih sprememb, povezanih s HPV, sta bili obsežno opredeljeni v številnih kliničnih raziskavah v zadnjih dveh desetletjih. Velikim dvojno slepim randomiziranim nadzorovanim kliničnim poskusom faze III na ženskah v starosti 15–26 let so sledile raziskave učinkovitosti in varnosti na starejši populaciji žensk, populaciji moških in različnih subpopulacijah, kot so moški, ki imajo spolne odnose z moškimi, bolniki, okuženi s HIV, in drugi. Na podlagi ugotovitev kliničnih raziskav sta leta 2006 ameriška Agencija za zdravila in hrano (angl. *Food and Drug Administration*, FDA) in Evropska agencija za zdravila (angl. *European Medicines Agency*, EMA) odobrili štirivalentno cepivo proti HPV za preprečevanje genitalnih bradavic in predrakavih sprememb ter raka materničnega vratu, nožnice in zunanjega spolovila, povzročenimi z genotipi HPV-6/-11/-16/-18, za ženske v starosti 9–26 let. Dvovalentno cepivo proti HPV je EMA odobrila leta 2007, FDA pa leta 2009 za preprečevanje predrakavih sprememb in raka materničnega vratu, ki jih povzročata genotipa HPV-16/-18 pri ženskah v starosti 9–25 let. Indikacije štirivalentnega cepiva so bile v letu 2009 razširjene na moške v enaki starostni skupini za preprečevanje genitalnih bradavic, leta 2010 pa še na predrakave spremembe in rak zadnjika za oba spola.

Od oktobra 2014 dalje Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) priporoča uporabo dveh odmerkov dvovalentnega ali štirivalentnega cepiva proti HPV pri osebah, ki s cepljenjem začnejo pred dopolnjenim 15. letom (3). Odločitev temelji na rezultatih raziskav, ki so dokazale, da je protitelesni odgovor po dveh prejetih odmerkih tako po kvaliteti kot tudi trajanju zaščite v tej starostni skupini enakovreden odgovoru, ki ga v višjih starostnih skupinah sicer zagotovijo trije odmerki. Najnovejša raziskava na deklicah v starosti 10–18 let, ki trenutno poteka v Indiji, pa nakazuje, da se sicer 2- do 3-krat nižji, vendar še vedno ustrezen nivo protiteles, ki je stabilen vsaj štiri leta, vzpostavi že po enem samem odmerku cepiva (4).

V letu 2014 odobreno devetvalentno cepivo proti HPV, ki vključuje sedem visokorizičnih genotipov HPV, povečuje potencial za preprečevanje raka materničnega vratu z dosedanjih 70 %, doseženih z dvovalentnim in štirivalentnim cepivom, na več kot 90 % (5). Indikacije za preprečevanje s HPV povezanih sprememb pri devetvalentnem cepivu ostajajo enake kot pri štirivalentnem cepivu. Klinične študije so pokazale, da devetvalentno cepivo spodbudi enakovreden protitelesni odziv proti genotipom HPV-6/-11/-16/-18 kot štirivalentno cepivo, hkrati pa učinkovito zaščiti tudi pred okužbo s HPV-31/-33/-45/-52/-58, pri čemer je pogostnost stranskih učinkov primerljiva s štirivalentnim cepivom. Tudi za devetvalentno cepivo na podlagi raziskav imunogenosti od 2016 velja, da v starostni skupini do 15 let pri obeh spolih zadostuje cepljenje z dvema odmerkoma (6).

Čeprav je incidenca okužb s HPV najvišja pri mladih kmalu po začetku spolne aktivnosti, v nekaterih državah opažajo drugi višek okužb s HPV pri odraslih v srednjih letih, morda zaradi večjega števila ločitev in novih partnerstev v tem obdobju (7). Pri posameznikih tako ostaja tveganje za sve-

žo okužbo s HPV tudi v kasnejšem življenjskem obdobju, cepivo pa se je tudi pri kohortah starejših ljudi izkazalo za varno in je zagotovilo učinkovito zaščito pred svežo okužbo s tarčnimi genotipi HPV, predvsem pri ženskah brez dokazov predhodne okužbe z genotipi HPV, vključenimi v cepivo (8). Posledično je FDA 5. oktobra 2018 odobrila uporabo devetvalentnega cepiva tudi za ženske in moške v starostni skupini 27–45 let (9).

### UČINKOVITOST CEPIVA PROTI HPV V REALNEM ŽIVLJENJU

Glede na naravni potek bolezni, ki so vzročno povezane z okužbo s HPV, je bilo pričakovati, da se bo učinkovitost cepiva proti HPV na populacijski ravni najprej odražala v zmanjšanju incidence okužb z genotipi HPV, vključenimi v cepivo, ter zmanjšanju incidence genitalnih bradavic (v državah, kjer so uporabljali štirivalentno cepivo). Temu naj bi sledilo zmanjšanje incidence predrakavih sprememb, medtem ko lahko konkretnejše znižanje incidence raka materničnega vratu zaradi dolge karcinogeneze pričakujemo šele v daljšem časovnem obdobju.

Najobsežnejši sistematični pregled 26 randomiziranih kliničnih poizkusov je nedvomno potrdil, da cepivo proti HPV učinkovito preprečuje predrakave spremembe materničnega vratu pri cepljenih ženskah v kontroliranih pogojih kliničnih študij (10). V realnem življenju pa je bil opažen dramatičen populacijski učinek na prevalenco okužb s HPV, trajnih okužb s HPV, genitalnih bradavic in cervikalne intraepitelijske neoplazije (CIN) celo v državah z zgolj 50 % precepljenostjo (11). Sistematični pregled globalnih izkušenj s štirivalentnim cepivom v prvem desetletju je pokazal zmanjšanje števila okužb s HPV-6/-11/-16/-18 in genitalnih bradavic za 90 %, (CIN) nizke stopnje za 45 % in visoke stopnje za 85 %, učinek pa je bil viden že po štirih letih iz-



vajanja cepljenja proti HPV tudi v državah z nizko precepljenostjo (12).

O pomembnem upadu incidence okužb s tarčnimi genotipi HPV v zadnjih letih poročajo iz številnih razvitih držav: Avstralije, ZDA, skandinavskih držav, Anglije, Škotske, Nizozemske, pa tudi iz držav v razvoju kot je Gana. Poleg drastičnega upada okužb s tarčnimi genotipi HPV, ki so vključeni v dvovalentno oziroma štirivalentno cepivo, številne raziskave nakazujejo tudi pomembno zmanjšanje okužb s HPV-31/-33/-45, kar nakazuje na vzpostavitev navzkrižne zaščite pred sorodnimi genotipi HPV (11, 13, 14). Dodatno so v raziskavah ugotavljali pojav čredne imunosti, saj je bilo mogoče opaziti zmanjšanje incidence okužb s tarčnimi genotipi HPV in genitalnih bradavic tudi v kohortah necepljenih žensk in moških (12, 15–18).

V letu 2018 so bili objavljeni prvi dokazi o zmanjšanju incidence ponavljajoče respiratorne papilomatoze (redke bolezni, povzročene z okužbo s HPV-6/-11, najpogosteje pridobljene ob rojstvu) pri otrocih v obdobju 2012–2016 kot posledice uspešnega nacionalnega programa cepljenja v Avstraliji (19).

V državah z večletnim dobro izvajanim nacionalnim programom cepljenja je že opazen tudi znaten populacijski upad prevalence predrakavih sprememb materničnega vratu. V Avstraliji so prvi upad pri najmlajši kohorti žensk (<20 let) opažali že v prvih letih izvajanja programa, vpliv cepljenja na znižanje prevalence predrakavih sprememb materničnega vratu za 21 % pa je bil v letu 2014 opazen tudi pri kohorti žensk, ki so bile v času cepljenja stare 18–26 let in v velikem deležu spolno aktivne (20). Podobno spodbudni rezultati so vidni tudi na Švedskem, kjer so na podlagi analize 1,4 milijona žensk dokazali, da cepivo učinkovito preprečuje CIN druge ali višje stopnje (CIN2+) pri ženskah, ki so bile v času cepljenja stare 17 (75 %), 17–19 (46 %) oziroma 20–29 let (22 %) (21). V ekološki študiji v ZDA, ki je zajela več kot

9 milijonov žensk, so med 2007 in 2014 ugotavljali 59,2 % in 39,8 % zmanjšanje števila primerov CIN2+ pri ženskah v starosti 15–19 in 20–24 let (22). Da je učinkovitost cepiva pri deklisah tudi po več kot 10 letih nad 90 %, dokazuje študija, ki spremlja ženske iz štirih skandinavskih držav: po 12 letih spremljanja v celotni kohorti niso odkrili nobenega primera CIN2+, ki bi bil posledica okužbe s HPV-16 ali HPV-18 (23).

Nedavno sta bili objavljeni vmesni analizi finske raziskave, ki s pomočjo finskega registra raka spremljata dolgoročno učinkovitost dvovalentnega in štirivalentnega cepiva za preprečevanje CIN3 in invazivnega raka pri ženskah, ki so bile cepljene med leti 2003 in 2005 v okviru randomiziranih kliničnih poizkusov. Po 4,5–10 letih spremljanja so odkrili 75 primerov CIN3 pri necepljenih ženskah in štiri primere CIN3 pri cepljenih ženskah; od tega so bili trije primeri posledica okužbe s HPV-16, v vseh treh primerih pa je bila dokazana predhodna okužba s HPV-16 že v času cepljenja (24). V raziskavi, ki je opredeljevala učinkovitost cepiva za preprečevanje invazivnega raka, so v kohorti necepljenih žensk odkrili 10 primerov invazivnega raka (osem primerov raka materničnega vratu, en primer raka zunanjega spolovila in en primer raka ustnega dela žrela) in nobenega primera invazivnega raka v kohorti cepljenih žensk (25). To je prvi objavljeni dokaz, da cepivo učinkovito ščiti pred invazivnimi raki, povzročenimi s HPV (25).

Avstralija bo po vsej verjetnosti postala prva država na svetu, ki bo izkoreninila rak materničnega vratu. Nedavno objavljena modelna analiza predvideva, da bo umrljivost zaradi raka materničnega vratu v Avstraliji leta 2034 manj kot 1 na 100.000 žensk, kar potrjuje izjemno učinkovitost njihovega nacionalnega preventivnega programa (26).

## **VARNOST CEPIV PROTI HPV**

Varnost cepiv proti HPV je bila celovito preizkušana, od strogih evalvacij v števil-

nih raziskavah pred izdajo dovoljenja, do obsežnega spremljanja stranskih učinkov s pomočjo aktivnega in pasivnega nadzora v okviru uporabe cepiva v realnem življenju. Sistematični pregled randomiziranih kliničnih raziskav je glede varnosti cepiv z veliko gotovostjo pokazal, da je bilo tveganje za resne neželene učinke v skupinah cepljenih proti HPV primerljivo s skupinami, ki so prejele placebo ali katero koli drugo cepivo (10).

Kljub temu so vzniknile govorice o domnevni povezavi cepiva s težko opredeljivimi sindromi s heterogeno in pogosto nejasno etiologijo ter slabo opredeljeno epidemiologijo. Čeprav brez jasnih dokazov, so strahovi pred tovrstnimi »stranskimi učinki« in nezaupanje v varnost cepiva resno ogrozili že uveljavljene in ponekod tudi zelo uspešne nacionalne programe cepljenja.

Na Danskem, kjer so v prvih letih nacionalnega programa cepljenja dosegali 80–90 % precepljenost, je leta 2012 domnevna povezava cepiva proti HPV s sindromom posturalne ortostatske tahikardije (angl. *postural orthostatic tachycardia syndrome*, POTS), predstavljena v dokumentarnem filmu in razširjena preko socialnih medijev, povzročila dramatičen upad precepljenosti na zgolj 20–30 % (27). Čeprav je bila povezava jasno ovržena, se je precepljenost ponovno povzpela nad 70 % šele leta 2018. Posledično je tretjina deklet, ki bi lahko bila cepljena pravočasno, cepivo prejela šele v času, ko so že bile spolno aktivne, dobre začetne možnosti za vzpostavitev čredne imunosti pa so bile preložene za približno 4–5 let (27).

Na Japonskem je senzacionalistično poročanje medijev o pojavu kompleksnega regionalnega bolečinskega sindroma (angl. *complex regional pain syndrome*, CRPS) pri redkih cepljenih leta 2013 povzročilo umik vladnega priporočila za cepljenje proti HPV, kljub pomanjkanju znanstvenih dokazov ali podrobnih medicinskih preiskav prime-

rov. Precepljenost je z več kot 70 % v trenutku strmoglavila na 3,9 % (28).

Globalni svetovalni odbor za varnost cepiv pri SZO (angl. *Global Advisory Committee on Vaccine Safety*, GACVS) je po pregledu podatkov konec leta 2015 zaključil, da ni dokazov za povezavo med cepivom proti HPV in POTS ali CRPS. Poleg tega so številna znanstvena poročila v zadnjem času ovrгла povezavo med cepivom proti HPV in sindromi, kot so POTS, CRPS, sindrom kronične utrujenosti, primarna odpoved ovarijev in drugimi težko opredeljivimi stanji, pa tudi med različnimi avtoimunskimi in nevrološkimi boleznimi, vensko tromboembolijo in možgansko kapjo, anafilakso in ostalimi resnimi neželenimi učinki. Tako je poročilo o varnosti cepiva po 80 milijonih apliciranih odmerkov v ZDA pokazalo, da ima cepivo proti HPV odličen varnostni profil brez zaznanih varnostnih signalov, z izjemo sinkope, ki pa je znan možni neželeni dogodek po vsakem cepljenju in ga je mogoče preprečiti (29). Dve veliki skandinavski študiji sta pokazali odsotnost povezav med štirivalentnim cepivom in nastankom avtoimunskih bolezni tako pri deklicah kot tudi pri dečkih (30, 31). V raziskavi, ki je zajela skoraj 135.000 cepljenih žensk na Finskem, niso potrdili nobene povezave med dvovalentnim cepivom in 38 preiskovanimi možnimi neželenimi učinki, med katerimi so pod drobnogled vzeli tudi razvpite POTS, CRPS in sindrom kronične utrujenosti (32).

Treba je poudariti, da časovna povezanost med cepljenjem proti HPV in pojavom različnih simptomov ne pomeni tudi vzročne povezanosti. Vse neželene dogodke je potrebno natančno prijavljati, poročila podrobno pregledati in oceniti pomen in povezanost s cepljenjem.

## IZZIVI IN OVIRE PRI UVEDBI CEPLJENJA PROTI HPV

Cepivo proti HPV je bilo v prvih letih obstoja na voljo le v nacionalnih programih viso-

ko razvitih držav. V globalni študiji precepljenosti s cepivom proti HPV so ocenili, da je bilo do oktobra 2014 v nacionalni program cepljenja zajetih 118 milijonov žensk, vendar so od tega predstavljale ženske iz držav v razvoju le 1 % (33). Najmanj en odmerik cepiva proti HPV je prejelo 59 milijonov žensk, popolno cepljenih pa je bilo 47 milijonov žensk, kar predstavlja 1,4 % svetovne populacije žensk (33). Čeprav je na svetovni ravni le 14 % vseh primerov raka materničnega vratu diagnosticiranih v razvitih državah, kar 70 % precepljenih žensk prihaja iz teh držav; nasprotno pa več kot dve tretjini svetovnega bremena raka materničnega vratu nosijo države v razvoju, ki bi najbolj potrebovale učinkovit nacionalni program cepljenja proti HPV (33).

S pomočjo donatorjev in s podporo globalnih partnerjev, kot so SZO, PAHO (angl. *Pan American Health Organization*) in GAVI (angl. *The Global Vaccine Alliance*), ki povečujejo dostopnost cepiv po subvencioniranih cenah, se je v zadnjih letih nekoliko povečalo tudi število držav v razvoju z nacionalnim programom cepljenja. Nedavni pregled izkušenj s cepljenjem proti HPV znotraj demonstracijskih projektov ali nacionalnih programov v 45 državah z nizkim in nižjim srednjim prihodkom je pokazal, da je v teh državah precepljenost večinoma dosegala 70–90 %, povsod pa presejala 50 % (34). Kljub neizmerno slabši zdravstveni infrastrukturi je tako precepljenost višja kot v nekaterih razvitih državah, npr. Franciji in ZDA. Nacionalni program cepljenja je bil do 4. oktobra 2018 na voljo v 91 državah sveta, kar predstavlja manj kot polovico držav na svetu (35).

Ključne izzive za uvedbo cepljenja proti HPV predstavljajo i) visoke cene cepiv; ii) nezadostna zdravstvena infrastruktura v državah v razvoju, kjer pogosto sicer obstaja utečen sistem cepljenja dojenčkov in otrok, ne pa tudi adolescentov; iii) doseganje ciljne populacije in vzdrževa-

nje ustreznega nivoja precepljenosti; in iv) napačne predstave javnosti o varnosti in učinkovitosti cepiva ter prepočasno ali nezadostno ukrepanje zdravstvenih avtoritet ob pojavu kontroverznih zgodb o stranskih učinkih.

Dodaten izziv predstavlja uvedba cepljenja proti HPV za dečke/moške. Čeprav večino bremena raka, povezanega s HPV, predstavlja rak materničnega vratu, pa je v ZDA že leta 2015 incidenca raka ustnega dela žrela, ki je pogostejši pri moških, presejala incidenco raka materničnega vratu (36). Poleg tega sta za prenos HPV odgovorna oba spola, pri čemer bi imelo univerzalno cepljenje bistveno večji vpliv na preprečevanje raka materničnega vratu zaradi vzpostavitve kolektivne zaščite. Hkrati bi lahko s cepljenjem obeh spolov zmanjšali prevalenco drugih rakov, povezanih s HPV, hitreje in učinkoviteje pa bi se zmanjšala tudi prevalenca genitalnih bradavic.

Po tem ko je FDA odobrila cepivo za moške, je v letu 2011 le ZDA omogočila cepljenje dečkov v okviru nacionalnega programa; do leta 2015 je priporočilo za cepljenje v okviru nacionalnega programa na dečke razširilo še pet držav (Kanada, Avstralija, Izrael, Trinidad in Tobago, Madžarska), do leta 2018 pa se je število držav že povzpelo na 27, kar kaže na spodbuden trend k širši dostopnosti cepiva za oba spola (37).

## CEPLJENJE PROTI HPV V SLOVENIJI

V Sloveniji je bilo štirivalentno cepivo proti HPV na voljo samoplačniško od decembra 2006, v shemo nacionalnega programa cepljenja pa je bilo uvedeno leta 2009, ko smo začeli cepiti deklice v 6. razredu osnovne šole v starosti 11–12 let s tremi odmerki cepiva, od šolskega leta 2014/2015 pa po priporočilu SZO z dvema odmerkoma cepiva. Od druge polovice leta 2016 je pri nas na voljo devtivalentno cepivo proti HPV, ki je v nacionalnem programu zame-

njalo štirivalentno cepivo. Cepijo se lahko tudi deklice in ženske, ki so obiskovale 6. razred v šolskem letu 2009/2010 ali kasneje in še niso bile cepljene (zamudnice), pri čemer se cepljenje opravi s številom odmerkov glede na starost ob prvem cepljenju (dva ali trije odmerki). Za vse ostale je cepljenje proti HPV samoplačniško.

Žal precepljenost v Sloveniji vsa leta obstoja nacionalnega programa niha med 44 % in 55,3 %, v povprečju pa ostaja pod 50 %. Opazne so precejšnje razlike v precepljenosti po zdravstvenih regijah, saj je v Ravnah na Koroškem cepljenih skoraj 80 % deklic, medtem ko v Ljubljani precepljenost vsa leta komaj presega 30 %. S tako precepljenostjo ostaja potencial cepiva proti HPV v veliki meri neizkoriščen, vzroke pa je iskati v nezaupanju in slabi ali napačni obveščeniosti javnosti in zdravstvenih delavcev, ki naj bi cepljenje promovirali in izvajali, pa tudi v premajhni podpori odgovornih državnih ustanov in organov.

Cepljenje dečkov je pri nas možno od 9. leta starosti dalje, vendar le-ti niso vključeni v nacionalni program cepljenja. Posamezne regije so se v zadnjih letih odločile za financiranje cepljenja dečkov iz občinskega

proračuna, precepljenost pa v zadnjih dveh letih dosega 25–69 % (38).

## ZAKLJUČEK

Čeprav sprejeto z oklevanjem, kritizirano zaradi visokih cen in pospremljeno s kontroverznimi zgodbami, ki rušijo že dobro vpeljane nacionalne programe cepljenja, cepivo proti HPV predstavlja revolucionarni korak v preprečevanju rakov, povezanih s HPV, predvsem raka materničnega vratu. V kombinaciji s presejalnim programom lahko cepljenje proti HPV drastično zmanjša obolevnost in umrljivost zaradi raka materničnega vratu. Po dvanajstih letih uporabe so nekatere države z visoko precepljenostjo ciljne populacije na dobri poti k izkoreninjenju te bolezni. Vendar v številnih državah v razvoju, kjer je incidenca raka materničnega vratu najvišja, nimajo učinkovitega nacionalnega programa cepljenja, po drugi strani pa se ponekod v razvitih državah kljub dokazani učinkovitosti in varnosti cepiva borijo z nizko precepljenostjo. V prihodnosti bo potrebno za doseganje polnega potenciala cepiva zagotoviti razpoložljivost cepiva proti HPV obema spoloma, širši starostni skupini in vsem državam sveta.

## LITERATURA

1. de Martel C, Plummer M, Vignat J, et al. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int J Cancer*. 2017; 141: 664–70.
2. Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, et al. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*. 2006; 24 Suppl 3: S3/S52–61.
3. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, October 2014-Recommendations. *Vaccine*. 2015; 33: 4383–4.
4. Sankaranarayanan R, Joshi S, Muwonge R, et al. Can a single dose of human papillomavirus (HPV) vaccine prevent cervical cancer? Early findings from an Indian study. *Vaccine*. 2018; 36: 4783–91.
5. Joura EA, Giuliano AR, Iversen OE, et al. A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. *N Engl J Med*. 2015; 372: 711–23.
6. Iversen OE, Miranda MJ, Ulied A, et al. Immunogenicity of the 9-valent HPV vaccine using 2-dose regimens in girls and boys vs a 3-dose regimen in women. *JAMA*. 2016; 316: 2411–21.
7. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis*. 2010; 202: 1789–99.
8. Wheeler CM, Skinner SR, Del Rosario-Raymundo MR, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of the human papillomavirus 16/18 AS04-adjuvanted vaccine in women older than 25 years: 7-year follow-up of the phase 3, double-blind, randomised controlled VIVIANE study. *Lancet Infect Dis*. 2016; 16: 1154–68.

9. FDA. FDA approves expanded use of Gardasil 9 to include individuals 27 through 45 years old [internet]. 2018 [citirano 2018 Okt 10]. Dosegljivo na: <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm622715.htm>.
10. Arbyn M, Xu L, Simoens C, et al. Prophylactic vaccination against human papillomaviruses to prevent cervical cancer and its precursors (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2018; 5: CD009069.
11. Drolet M, Bénard É, Boily MC, et al. Population-level impact and herd effects following human papillomavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2015; 15: 565–80.
12. Garland SM, Kjaer SK, Muñoz N, et al. Impact and effectiveness of the quadrivalent human papillomavirus vaccine: a systematic review of 10 years of real-world experience. *Clin Infect Dis*. 2016; 63: 519–27.
13. Cameron RL, Kavanagh K, Pan J, et al. Human papillomavirus prevalence and herd immunity after introduction of vaccination program, Scotland, 2009–2013. *Emerg Infect Dis*. 2016; 22: 56–64.
14. Donken R, King AJ, Bogaards JA, et al. High effectiveness of the bivalent human papillomavirus (HPV) vaccine against incident and persistent HPV infections up to 6 years after vaccination in young Dutch women. *J Infect Dis*. 2018; 217: 1579–89.
15. Kahn JA, Widdice LE, Ding L, et al. Substantial decline in vaccine-type human papillomavirus (HPV) among vaccinated young women during the first 8 years after HPV vaccine introduction in a community. *Clin Infect Dis*. 2016; 63: 1281–7.
16. Bollerup S, Baldur-Felskov B, Blomberg M, et al. Significant reduction in the incidence of genital warts in young men 5 years into the danish human papillomavirus vaccination program for girls and women. *Sex Transm Dis*. 2016; 43: 238–42.
17. Pillsbury AJ, Quinn HE, Evans TD, et al. Population-level herd protection of males from a female human papillomavirus vaccination program: evidence from Australian serosurveillance. *Clin Infect Dis*. 2017; 65: 827–32.
18. Machalek DA, Garland SM, Brotherton JML, et al. Very low prevalence of vaccine human papillomavirus types among 18- to 35-year old Australian women 9 years following implementation of vaccination. *J Infect Dis*. 2018; 217: 1590–600.
19. Novakovic D, Cheng ATL, Zurynski Y, et al. A Prospective study of the incidence of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis after implementation of a national HPV vaccination program. *J Infect Dis*. 2018; 217: 208–12.
20. Brotherton JM, Gertig DM, May C, et al. HPV vaccine impact in Australian women: ready for an HPV-based screening program. *Med J Aust*. 2016; 20: 184–184e1.
21. Herweijer E, Sundström K, Ploner A, et al. Quadrivalent HPV vaccine effectiveness against high-grade cervical lesions by age at vaccination: a population-based study. *Int J Cancer*. 2016; 138: 2867–74.
22. Flagg EW, Torrone EA, Weinstock H. Ecological association of human papillomavirus vaccination with cervical dysplasia prevalence in the United States, 2007–2014. *Am J Public Health*. 2016; 106: 2211–8.
23. Kjaer SK, Nygård M, Dillner J. A 12-year follow-up on the long-term effectiveness of the quadrivalent human papillomavirus vaccine in 4 Nordic countries. *Clin Infect Dis*. 2018; 66: 339–45.
24. Lehtinen M, Lagheden C, Luostarinen T, et al. Ten-year follow-up of human papillomavirus vaccine efficacy against the most stringent cervical neoplasia end-point-registry-based follow-up of three cohorts from randomized trials. *BMJ Open*. 2017; 7: e015867.
25. Luostarinen T, Apter D, Dillner J, et al. Vaccination protects against invasive HPV-associated cancers. *Int J Cancer*. 2018; 142: 2186–7.
26. Hall MT, Simms KT, Lew JB, et al. The projected timeframe until cervical cancer elimination in Australia: a modelling study. *Lancet Public Health*. V tisku 2018.
27. Lynge E, Skorstengaard M, Lübker CL, et al. HPV-vaccination impact in Denmark: is the vaccine working? *Expert Rev Vaccines*. 2018; 17: 765–7.
28. Ueda Y, Enomoto T, Sekine M, et al. Japan's failure to vaccinate girls against human papillomavirus. *Am J Obstet Gynecol*. 2015; 212: 405–6.
29. Gee J, Weinbaum C, Sukumaran L, et al. Quadrivalent HPV vaccine safety review and safety monitoring plans for nine-valent HPV vaccine in the United States. *Hum Vaccin Immunother*. 2016; 12: 1406–17.
30. Grönlund O, Herweijer E, Sundström K, et al. Incidence of new-onset autoimmune disease in girls and women with pre-existing autoimmune disease after quadrivalent human papillomavirus vaccination: a cohort study. *J Intern Med*. 2016; 280: 618–26.
31. Frisch M, Besson A, Clemmensen KKB, et al. Quadrivalent human papillomavirus va-

- ccination in boys and risk of autoimmune diseases, neurological diseases and venous thromboembolism. *Int J Epidemiol.* 2018; 47: 634–41.
32. Skufca J, Ollgren J, Artama M, et al. The association of adverse events with bivalent human papilloma virus vaccination: A nationwide register-based cohort study in Finland. *Vaccine.* 2018; 36: 5926–33.
  33. Bruni L, Diaz M, Barrionuevo-Rosas L, et al. Global estimates of human papillomavirus vaccination coverage by region and income level: a pooled analysis. *Lancet Glob Health.* 2016; 4: e453–63.
  34. Gallagher KE, Howard N, Kabakama S, et al. Human papillomavirus (HPV) vaccine coverage achievements in low and middle-income countries 2007-2016. *Papillomavirus Res.* 2017; 4: 72–8.
  35. WHO. Vaccine in National Immunization Programme Update – World Health Organization [internet]. 2018 [citirano 2018 Okt 18]. Dosegljivo na: [http://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/VaccineIntroStatus.pptx](http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/VaccineIntroStatus.pptx)
  36. Van Dyne EA, Henley SJ, Saraiya M, et al. Trends in human papillomavirus-associated cancers - United States, 1999-2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2018; 67: 918–24.
  37. Phillips M, Morais E, Kothari S, et al. Evolution of gender-neutral HPV vaccination in national immunization programs around the world. 32nd International Papillomavirus Conference; 2018 Oct 2–6; Sydney, Australia. Poster IPVC8-0348.
  38. Janja Schweiger Nemanič. Kaj se dogaja na področju cepljenja dečkov s HPV cepivom /GNV – gender neutral vaccine. Sekcija za šolsko, študentsko in adolescentno medicino. Strokovno srečanje – HPV cepljenje; 2018, sept. 10; Ljubljana, Slovenija.



Nataša Knap<sup>1</sup>, Miša Korva<sup>2</sup>, Vladimir Ivovič<sup>3</sup>, Katja Kalan<sup>4</sup>, Manuela Čitar<sup>5</sup>,  
Miša Pavletič<sup>6</sup>, Samo Zakotnik<sup>7</sup>, Tatjana Avšič-Županc<sup>8</sup>

## Nadzor prenašalcev porajajočih se mikroorganizmov v Sloveniji

### *Vector Surveillance of Emerging Microorganisms in Slovenia*

#### IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: prenašalci, komarji, flebotomske muhe, Slovenija, virus Zahodnega Nila, virus Usutu, bunjavirusi

Virusne in parazitske bolezni, ki se prenašajo s komarji in peščenimi muhami, so v Evropi zagotovo vselej obstajale, vendar je njihova razširjenost in pojavnost postala znana šele ob večjih izbruhih, ko so v laboratorijih razvili primerne metode za njihov dokaz in prepoznavo. Številne države so za prepoznavanje razširjenosti patogenov, kot tudi oce- no razširjenosti in določitev vrst njihovih prenašalcev, pričele razvijati sisteme nadzora le-teh. Leta 2017 smo v Sloveniji pričeli z nadzorom prenašalcev porajajočih se mikroor- ganizmov. Tako smo leta 2017 in 2018 vzorčili komarje in flebotomske muhe na različnih lokacijah v Sloveniji. V pilotnem letu 2017 smo ulovili 199 komarjev in 10 flebotomskih muh. Ugodni okoljski pogoji in razširjeno območje vzorčenja so v letu 2018 omogočili ulov 3.054 komarjev in 506 flebotomskih muh. Vzorcene prenašalce smo razvrstili v skupine po do 20 osebkov in z molekularnimi metodami in poskusi osamitve virusa dokazovali mikroorganizme, ki jih prenašajo. V letu 2018 smo prvič dokazali virus Za- hodnega Nila in virus Usutu v komarjih v Sloveniji. Virus Usutu smo iz skupine komarjev uspeli tudi osamiti. Dokazali smo tudi več bunjavirusov v skupinah komarjev, in sicer v 15 skupinah komarjev ortobunjaviruse in v 11 skupinah komarjev fleboviruse. V eni sku- pini flebotomskih muh smo potrdili flebovirus. Za natančno opredelitev tveganja, ki ga predstavljajo mikroorganizmi, ki se prenašajo s prenašalci, bomo raziskavo nadaljevali tudi v prihodnjem letu, s čimer bomo zagotovili dovolj veliko število pregledanih vzorcev in tako povečali zanesljivost tako nadzora nad prenašalci v Sloveniji kot tudi patogeni, ki jih le-ti prenašajo.

<sup>1</sup> Znan. sod. dr. Nataša Knap, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; [natasa.knap@mf.uni-lj.si](mailto:natasa.knap@mf.uni-lj.si)

<sup>2</sup> Znan. sod. dr. Miša Korva, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Dr. Vladimir Ivovič, univ. dipl. biol., Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije, Univerza na Primorskem, Glagoljaška ulica 8 6000 Koper

<sup>4</sup> Dr. Katja Kalan, univ. dipl. biol., Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije, Univerza na Primorskem, Glagoljaška ulica 8 6000 Koper

<sup>5</sup> Dr. Manuela Čitar, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

<sup>6</sup> Miša Pavletič, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

<sup>7</sup> Samo Zakotnik, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

<sup>8</sup> Akad. prof. dr. Tatjana Avšič-Županc, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana



## ABSTRACT

---

KEY WORDS: vector, mosquitoes, sandflies, Slovenia, West Nile virus, Usutu virus, bunyavirus

Viral and parasitic diseases transmitted by mosquitoes and sand flies have always existed in Europe, but their spread and incidence became known only with larger outbreaks, when appropriate laboratory diagnostic and identification methods were developed. In order to identify the prevalence of pathogens, as well as their vectors, many countries have begun to develop surveillance systems. In 2017, we began to monitor vectors of emerging microorganisms in Slovenia. In 2017 and 2018, mosquitoes and phlebotomine sand flies were sampled at different locations in Slovenia. In 2017, the pilot year, we sampled 199 mosquitoes and 10 phlebotomine sand flies. Favourable environmental conditions and an expanded sampling area enabled us to sample 3,054 mosquitoes and 506 sand flies in 2018. Vectors were grouped into pools of up to 20 animals and analysed for the presence of pathogens with molecular methods and attempts to isolate the virus. In 2018, we demonstrated the presence of the West Nile virus and the Usutu virus for the first time in mosquitoes in Slovenia. We also managed to isolate the Usutu virus from a pool of mosquitoes. We confirmed several bunyaviruses in mosquito groups, namely, 15 pools of mosquitoes carried orthobunyaviruses and 11 groups of mosquitoes were infected with phleboviruses. In one group of sand flies we confirmed a phlebovirus. To accurately define the risk posed by microorganisms transmitted by vectors, we will continue the study next year, thus ensuring a sufficient number of examined samples and increasing the reliability of both vector and pathogen surveillance in Slovenia.

## UVOD

Porajajoči se mikroorganizmi so lahko novo odkriti povzročitelji ali pa že znani patogeni, ki se pojavijo na novem področju ali v novih vrstah prenašalcev v obliki izbruhov ali epidemij. Vzrok za pojav porajajočih se mikroorganizmov je kompleksna mreža dejavnikov, ki so posledica neprestanega spreminjanja okolja, podnebja in povečane mobilnosti ljudi in živali. Med porajajočimi se grožnjami tvorijo arbovirusi (virus Denga, virus Zika, virus rumene mrzlice, virus Zahodnega Nila, virus Chikungunya...) in nekateri paraziti (lišmanija, malarija...) edinstveno skupino patogenih mikroorganizmov. Ti imajo izjemno velik vpliv na javno zdravje v endemičnih državah ter velik potencial za kolonizacijo novih ekoloških niš, kot posledica širitve njihovih prenašalcev. Glede na obolevnost in smrtnost, so komarji in

peščene muhe najnevarnejše skupine prenašalcev za ljudi, saj skoraj polovici svetovnega prebivalstva grozi možnost okužbe s patogeni, ki jih le-ti prenašajo. Čeprav največ vrst komarjev živi v tropih, v zadnjem času ugotavljamo, da so izredno pomembni prenašalci porajajočih se patogenov tudi v zmerno toplem pasu.

Eden prvih opomnikov, da predstavlja Sredozemlje vstopna vrata v Evropo, ne samo ljudem, ampak tudi prenašalcem in patogenom, je bil izbruh mrzlice Chikungunya v Italiji avgusta 2007 (1). Temu so sledili avtohtoni primeri mrzlice Denga na Hrvaškem, v Franciji in na Portugalskem (na Madeiri) (2–4). Virus Zahodnega Nila se je v letih od vnosa v Evropo lokalno razširil na Madžarskem in v Avstriji. Leta 2010 so ga prvič dokazali v Grčiji in nato spomladi 2011 v Italiji, od koder se je razširil po celi državi ter na Sardinijo. S primerjavo geno-

ma različnih izolatov virusa so potrdili, da je bil virus Zahodnega Nila, ki je bil odgovoren za izbruh v Grčiji in Italiji, skoraj identičen tistemu, ki so ga izolirali dve leti prej na Madžarskem (5). V zadnjih letih so virus v prenašalcih, kot tudi primere bolezni dokazali v številnih evropskih državah (Italija, Francija, Madžarska, Bolgarija, Srbija, Romunija, Hrvaška ...) (6, 7). V sredozemskih državah so sezonski izbruhi mrzlice Zahodnega Nila postali stalnica, v nekaterih državah pa je virus že endemičen (8, 9).

Peščene muhe (*Phlebotomus* spp.) so, poleg komarjev, pomembni prenašalci porajajočih se patogenov v Sredozemlju, Afriki, na Bližnjem vzhodu in v Aziji. S posameznimi raziskavami so ugotovili, da je v Evropi več vrst peščenih muh ter da se njihova razširjenost v zadnjem času še povečuje. Ker se z raziskavami o taksonomski in biološki raznolikosti peščenih muh v Evropi ukvarja le majhna skupina strokovnjakov, pogosto manjkajo informacije o raznovrstnosti prenašalcev v najbolj endemičnih državah na jugu Evrope (10). Popolnoma neraziskana je tudi pogostost okužbe posameznih vrst z različnimi patogeni (11). Peščene muhe so znani prenašalci parazita lišmanija. Čeprav veliko zdravnikov meni, da je lišmanioza, ki jo povzročajo lišmanije, tropska bolezen, se bolezen redno pojavlja na jugu Evrope in je že endemična v petih državah: Bolgariji, Grčiji, Franciji, Španiji in na Hrvaškem (12). V Sredozemlju lahko peščene muhe poleg lišmanije prenašajo tudi porajajoče se viruse, med katerimi so gotovo najpomembnejši prav flebovirusi. Prvič so bili flebovirusi opisani že leta 1943 v Italiji, vendar so do nedavnega predstavljali le manjše breme za javno zdravje, saj je bila pojavnost bolezni nižja od 1 %, zato so bile raziskave na tem področju večinoma prezrte (13). V zadnjem desetletju smo zabeležili porast okužb s flebovirusi v različnih državah v Sredozemlju (Španija, Italija, Francija, Hrvaška), poleg tega so se novi virusni genotipi pojavi-

li tudi na novih območjih, kar nakazuje na širjenje ali pojavnost novih vrst peščenih muh (14–17).

Z raziskavo želimo postaviti temelje za učinkovito spremljanje avtohtonih in tujerodnih vrst komarjev in peščenih muh v Sloveniji ter prepoznati porajajoče se patogene, ki jih prenašajo prenašalci in so pomembni za zdravje ljudi. Vzpostavitev obeh sistemov nadzora, tako nad prenašalci kot tudi nad patogeni ter vpeljava sodobnih, občutljivih diagnostičnih metod so osnova za ugotavljanje pogostosti avtohtonih in vnesenih nalezljivih bolezni in s tem ocenjevanje tveganja za vnos in izbruh porajajočih se patogenov v Sloveniji.

## MATERIALI IN METODE

### Vzorčenje prenašalcev in identifikacija vrst komarjev in peščenih muh

Za namen opredelitve favne komarjev in flebotomskih muh smo od maja do julija 2017 ter od maja do oktobra 2018 na izbranih lokacijah v Sloveniji opravili sistematsko vzorčenje omenjenih prenašalcev povzročiteljev bolezni. Vzorčenje je sistematsko potekalo na naslednjih kontrolnih lokacijah: Medljan, Škocjanski zatok, Velike Žablje na Krasu in okolica Cerkniškega jezera. Iz rezultatov preteklih raziskav smo na kontrolnih lokacijah pričakovali veliko gostoto preučevanih prenašalcev (18, 19). Dodatna vzorčenja so bila izvedena še na Ljubljanskem barju, v Gornji Radgoni in okolici, v Birčni vasi, Kobdilju, Izoli in Mostjah.

Komarje smo vzorčili s pastmi BG-Sentinel (slika 1), kjer smo kot atraktant uporabili ogljikov dioksid iz jeklenk. Na vsaki lokaciji smo postavili pet pasti, ki smo jih nastavili za 24 ur. S tem smo zagotovili, da se bodo v pasti lovile tako dnevne kot tudi nočno aktivne vrste. Pasti smo postavljali v naravi v bližino vodnih virov ali v mestih v bližino živali (koz, piščancev, goveda).



**Slika 1:** Levo – past CDCit, desno – past BG-Sentinel.

Flebotomske muhe smo vzorčili s pastmi CDCit (slika 1), ki smo jih nastavili pozno popoldan in naslednji dan zjutraj pobrali. Pasti smo vedno nastavili v bližino živali (zajcev, koz, kokoši). Komarje, ki so se ujele v pasti CDCit, smo ravno tako vključili v raziskavo in jih namenili za nadaljnje virološke analize.

V pasti ujele komarje in peščene muhe smo usmrtili tako, da smo jih za 10 minut shranili v skrinji na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Nato smo komarje in peščene muhe ločili od ostalih ujetih osebkov in jih do vrstne identifikacije hranili na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Zaradi zagotavljanja čim boljše ohranjenosti virusne RNA in s tem večjih možnosti za detekcijo virusov v komarjih smo le-te skušali minimalno izpostavljati sobni temperaturi. Komarje smo zato do vrste določali samo na začetku sezone, da smo določili vrstno sestavo komarjev na nekem območju. V nadaljevanju smo komarje samo ločili od ostalih ujetih žuželk in jih glede na lokacijo, datum ulova in spol združili v skupine za nadaljnje analize.

Vse flebotomske muhe, ki smo jih ujele leta 2017, smo določili do vrste in jih združili v skupine glede na vrsto, spol, lokacijo

in datum za nadaljnje analize. Poleg klasične morfološke identifikacije smo vpeljali tudi dve sodobni, inovativni metodi: molekularno-biološko metodo analize DNA ter metode masne spektrofotometrije MALDI TOF (20). Flebotomskih muh, ki smo jih ujele v letu 2018, do vrste nismo določili, temveč smo jih le ločili po lokaciji, datumu ulova in spolu.

## Dokazovanje patogenov

286 skupin komarjev in 52 skupin peščenih muh, v katere je bilo vključenih do 20 osebkov. Vsako skupino smo homogenizirali z aparatom Tissue Lyser (Retsch Qiagen) v  $600\ \mu\text{l}$  RPMI.  $200\ \mu\text{l}$  homogenata smo porabili za osamitev celokupne DNA in RNA s testnim kompletom Virus Mini Kit z aparatom EZ1-XL Advanced (oba od Qiagen).  $200\ \mu\text{l}$  smo nanесли na plošče s celično kulturo Vero E6 in celično kulturo C6/36 (le skupine komarjev), ki smo jih inkubirali na  $37^{\circ}\text{C}$  in atmosferi s  $5\ \%$   $\text{CO}_2$  oz. na  $37^{\circ}\text{C}$  brez dodanega  $\text{CO}_2$ .  $200\ \mu\text{l}$  homogenata smo shranili na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

V osamljeni RNA smo dokazovali specifično RNA flavivirusov, alfavirusov, flebovirusov in ortobunjavirusov z metodo

verižne reakcije s polimerazo z reverzno transkriptazo (RT-PCR) (tabela 1). Dodatno smo v letu 2018 RNA osamljene iz skupin komarjev analizirali s specifičnimi PCR v realnem času za virus Usutu (USUV), virus Zahodnega Nila (WNV), virus Chikungunya in virus Sindbis. Dobljene pomnožke smo nato očistili s komercialnim kompletom ABI BigDye Terminator (Applied Bi-

osystems), sekvenčno reakcijo z BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems). Nukleotidna zaporedja smo določili z genetskim analizatorjem ABI3500 (Applied Biosystems). Nukleotidna zaporedja smo uredili s programskim orodjem CLC Main Workbench (Qiagen Bioinformatics).

**Tabela 1:** Metode za dokazovanje virusov v skupinah komarjev in flebotomskih muh.

Red/rod virusov	Tarčni organizem	Tarčna regija	Vir
Flavivirus	Komarji/Peščene muhe	NS5	(21)
Alfavirusi	Komarji/Peščene muhe	NsP4	(22)
Alfavirusi	Komarji/Peščene muhe	NsP4	(23)
Flebovirusi	Komarji/Peščene muhe	Segment L	(24)
Flebovirusi	Komarji	Segment S	(25)
Flebovirusi	Peščene muhe	Segment L	(26)
Ortobunjavirusi	Komarji	N ORF	(27)
Virus Zahodnega Nila	Komarji	5'UTR	(28)
Virus Usutu	Komarji	NS5	(29)

Del homogenata, pripravljenega iz skupin komarjev in flebotomskih muh, smo inokulirali na celično kulturo. Za poskus osamitve virusa iz vzorcev komarjev smo uporabili celični liniji Vero E6 in C6/36, za poskus osamitve virusov iz vzorcev flebotomskih muh pa celično linijo Vero E6. Po enem tednu inkubacije smo pregledali celične linije in preverjali citopatološke učinke virusa, nato smo pasirali vzorec celične suspenzije še dvakrat, da zagotovimo pomnožitev virusa.

## REZULTATI

Leta 2017 smo ujeli 199 odraslih komarjev, od tega 196 samic in 3 samce. Število ujetih komarjev na kontrolno lokacijo je bilo približno enako, okoli 30 komarjev na lokacijo. Največjo število komarjev

je bilo ujetih v Gornji Radgoni in okolici (118 osebkov), kjer je potekalo intenzivno vzorčenje na več lokacijah v dveh dneh. Leta 2018 smo ujeli 3.054 komarjev, od tega 2.184 samic in 870 samcev. Po številu ujetih osebkov je med kontrolnimi lokacijami prevladoval Medljan, kjer smo ujeli 49 % vseh komarjev (1.511 osebkov: 947 samic in 564 samcev). Po številu ujetih komarjev sledijo Škocjanski zatok (466 osebkov: 446 samic in 20 samcev), Velike Žabljice (113 osebkov: 90 samic in 23 samcev) in nazadnje Cerknica z najmanjšim številom ujetih osebkov (97 osebkov: 72 samic in 25 samcev). Ujeti komarji obeh let so pripadali rodovom *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Culex*, *Anopheles*, *Culiseta* in *Coquillettidia* (tabela 2).

Leta 2017 smo ujeli vsega skupaj 150 flebotomskih muh. Ujeli smo flebotomske

Tabela 2: Pojavnost komarjev na različnih lokacijah v Sloveniji.

LOKACIJA	<i>Culex pipiens</i>	<i>Culex</i> sp.	<i>Culiseta annulata</i>	<i>Culiseta longiareolata</i>	<i>Aedes albopictus</i>	<i>Aedes vexans</i>	<i>Aedes</i> sp.	<i>Ochlerotatus caspius</i>	<i>Ochlerotatus</i> sp.	<i>Coquillettidia richiardii</i>	<i>Anopheles maculipennis</i>	<i>Anopheles</i> sp.
Cerkniško jezero	x						x				x	x
Škocjanski zatok	x				x			x	x	x		x
Medljan	x	x	x	x	x							
Velike Žablje					x							x
Plitvica	x	x										x
Sp. Ščavnica	x	x										
Trstenik	x	x									x	
Benedikt	x	x									x	
pri Muri (Lutverci)	x											
Birčna vas	x	x				x	x					
Hotinja vas	x											
Trenta												x

muhe dveh vrst, in sicer *Phlebotomus perniciosus* in *P. neglectus*. Leta 2018 smo ujeli 506 flebotomskih muh. Največjo gostoto populacije flebotomskih muh smo ugotovili na Medljanu, ki se je že v prejšnjih letih izkazala kot pomembna lokacija za vzorčenje flebotomskih muh (Ivović, osebna opažanja). Na tej lokaciji smo ujeli 253 osebkov, od tega 157 samic in 96 samcev. V Velikih Žabljah smo ujeli 128 osebkov, od tega 66 samic in 62 samcev, dodatno smo v Kobdilju ujeli še 125 osebkov, od tega 40 samic in 85 samcev.

V letu 2017 smo pregledali RNA osamljeno iz 40 skupin komarjev (179 osebkov) in 15 skupin flebotomskih muh (150 osebkov). V letu 2018 smo pregledali RNA, osamljeno iz 246 skupin komarjev (3.054 osebkov) in 39 skupin flebotomskih muh (506 flebotomskih muh) (slika 2). V komarjih in flebotomskih muhah v letu 2017 nismo dokazali RNA flavivirusov. V letu 2018 smo z metodo RT-PCR v realnem času potrdili flavivirus v treh skupinah komarjev (tabela 3). S specifičnima metodama RT-PCR v realnem

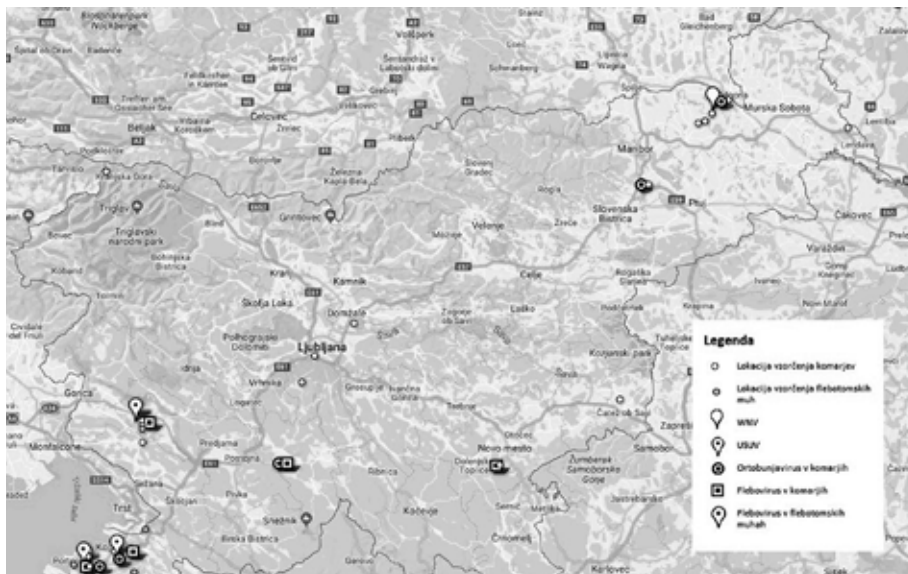
času za WNV in USUV, smo potrdili WNV v eni skupini komarjev in USUV v dveh skupinah komarjev (slika 2). Virusno RNA smo potrdili s pridobitvijo nukleotidnega zaporedja s sekveniranjem. Nukleotidno zaporedje dokazanega virusa Zahodnega Nila, dolgo 128 bp, se genetsko uvršča v linijo 2 in je najbolj podoben virusom dokazanim v Avstriji in na Slovaškem. Nukleotidni zaporedji dokazanih virusov Usutu, dolgi 126 bp, sta genetsko najbolj podobni virusom dokazanim v Italiji. V flebotomskih muhah flavivirusov nismo dokazali.

Komarje in flebotomske muhe smo analizirali za dokaz alfavirusov. Tako alfavirus univerzalni RT-PCR, kot tudi za virus Chikungunya in virus Sindbis specifična RT-PCR, v realnem času niso potrdili alfavirusov v pregledanih skupinah komarjev in flebotomskih muh v letih 2017 in 2018 (tabela 3).

Fleboviruse smo dokazali v treh skupinah komarjev iz leta 2017 in v 8 skupinah komarjev iz leta 2018. Pridobljena nukleotidna zaporedja se ne ujemajo z nobenimi za-

porodji, ki so na voljo na spletnem portalu GenBank. V eni skupini flebotomskih muh smo potrdili flebovirus. Nukleotidno zaporedje je najbolj podobno italijanskemu izolatlu flebovirusa Ponticelli iz flebotomskih muh (tabela 3).

Ortobunjaviruse smo dokazali v 2 skupinah komarjev iz leta 2017 in v 13 skupinah komarjev iz leta 2018 (slika 2). Nukleotidna zaporedja so dolga okrog 100 bp in kažejo največje ujemanje z bunjavirusi, najdenimi v komarjih vrste *Culex* (tabela 3).



**Slika 2:** Lokacije vzorčenja komarjev in flebotomskih muh in lokacije, kjer smo dokazali viruse v prenašalcih.

**Tabela 3:** Rezultati molekularnega dokazovanja virusov v skupinah komarjev in flebotomskih muh v letih 2017 in 2018. WNV – virus Zahodnega Nila, USUV – virus Usutu, CHIKV – virus Chikungunya, SINV – virus Sindbis, TOSV – virus Toscana

Vrsta prenašalca		Komarji		Flebotomske muhe	
Leto		2017	2018	2017	2018
Flavivirusi	Univerzalni flavivirus	0/40	3/246	0/15	0/37
	WNV	0/40	1/246	-	-
	USUV	0/40	2/246	-	-
Alfavirusi	Univerzalni alfavirus	0/40	0/36	-	-
	CHIKV	0/40	0/246	-	-
	SINV	0/40	0/246	-	-
Bunjavirusi	Ortobunjavirus	2/40	13/239	0/15	-
	Flebovirusi Skupina 1	3/40	8/242	0/15	0/37
	Flebovirusi Skupina 2	0/40	0/246	0/15	1/37
	TOSV	0/40	0/246	0/15	0/37

Iz vseh 286 skupin komarjev oz. 52 skupin flebotomskih muh smo poskušali osamiti viruse na celičnih linijah Vero E6 in C6/36 oz. Vero E6. V celični kulturi Vero E6 ene skupine komarjev smo opazili citopatsogeni učinek. Z molekularnimi metodami smo potrjevali uspešnost izolacije in v tej skupini komarjev potrdili uspešno izolacijo virusa Usutu, tako na celicah Vero E6, kot na celicah C6/36.

## RAZPRAVA

Pred tridesetimi leti je prve podatke o razširjenosti komarjev v Sloveniji prispevala Danica Tovornik (30). Dve desetletji se nato raziskave komarjev v Sloveniji niso izvajale. Okrog leta 2009 so se ponovno pričele izvajati prve raziskave razširjenosti in številčnosti komarjev pri nas (31). V tem času se je izkazalo, da prihaja do velikih sprememb v pojavnosti vrst, tako zaradi sprememb v okolju kot zaradi povečane mobilnosti. Pojavile so se tudi invazivne tropske vrste in trenutno je v Sloveniji opisanih 28 vrst komarjev (32). Raziskav o razširjenosti in raznolikosti flebotomskih muh do prvega desetletja tega tisočletja sploh ni bilo, zato so prvi rezultati raziskav zelo pomembni za ugotavljanje tveganja za pojav in razširjenost flebovirusov v Sloveniji.

Prisotnost in številčnost prenašalcev – povzročiteljev bolezni na nekem območju – sta odvisni od številnih dejavnikov. Poleg ustreznih mikroklimatskih razmer morajo biti zagotovljeni tudi ustrezni habitati za odlaganje jajčec, nektarske rastline za hranjenje odraslih osebkov ter ustrezni gostitelji za zaužitje krvnega obroka (33).

Med vsemi lokacijami je po številu ujetih komarjev in flebotomskih muh izstopala kmetija na Medljanu. Rezultati so pričakovani, saj je na tej lokaciji veliko število različnih vrst domačih živali, na katerih samice komarjev in flebotomskih muh zaužijejo krvni obrok. Kot pričakovano, smo veliko število komarjev ujeli v Škocjanskem

zatoku, saj je to mokrišče, ki nudi raznolike habitate, tako za ličinke kot tudi za odrasle komarje. Poleg tega je to območje pomemben habitat za različne vrste ptic, ki so hkrati tudi gostitelji komarjev. Zaradi naštetih dejavnikov menimo, da je to območje lahko pomembno pri pojavu in kroženju virusov, kot je npr. virus Zahodnega Nila, kjer igrajo glavno vlogo v razvojnem krogu komarji in vodne ptice. Zaradi podobnih lastnosti smo veliko število komarjev pričakovali tudi v okolici Cerkniškega jezera, vendar ta lokacija ni izstopala po številu ujetih osebkov. Kljub temu menimo, da je v nadaljevanju raziskave pomembna vključitev te lokacije, saj je tudi na področju Cerkniškega jezera velika gostota ptic.

Največjo gostoto populacije flebotomskih muh smo ugotovili na obalnem območju in na Krasu. Znatno povečanje v številu ujetih flebotomskih muh leta 2018 v primerjavi z letom 2017 je posledica intenzivnejšega vzorčenja. V tem letu smo namreč pasti postavili večkrat in na več lokacijah. Poleg omenjene lokacije na Medljanu smo flebotomske muhe ujeli še na dveh lokacijah, v Velikih Žabljah in v Kobdilju, in s tem potrdili naše domneve, da se v notranjosti Slovenije omenjeni prenašalci srečujejo le sporadično in v manjšem številu. Tekom raziskave smo vpeljali metodo MALDI-TOF kot pomožno metodo za identifikacijo vrst flebotomskih muh. Dosedanji rezultati so pokazali 100 % ujemanje z molekularno-biološkimi metodami identifikacije. Glavno prednost in uporabnost metode vidimo predvsem pri prepoznavi različnih vrst samic flebotomskih muh, ki so si morfološko izjemno podobne. Pravilna identifikacija ima namreč izjemen pomen pri določanju vektorskega potenciala vrste na nekem območju ter ustreznem zatiranju pravilne vrste prenašalca povzročitelja ob morebitnih izbruhih bolezni.

Med leti 2014 in 2018 so prisotnost in kroženje virusa Zahodnega Nila potrdi-

li v Avstriji, Bolgariji, na Hrvaškem, Cipru, Franciji, Grčiji, na Madžarskem, v Italiji, na Kosovem, Portugalskem, v Romuniji, Španiji, Srbiji in Turčiji. Prvi primeri se pojavijo od 28. tedna v letu naprej. V letu 2018 so prve primere boleznih potrdili že v 26. tednu, prav tako je bilo število potrjenih primerov značilno večje kot v prejšnjih letih (34). V Sloveniji smo v avgustu potrdili primer okužbe z WNV (35). V mesecu septembru so potrdili WNV tudi pri konju in vrani. V letu 2018 smo potrdili WNV tudi v skupini komarjev vrste *Culex pipens*, ulovljeni v mesecu avgustu v bližini Gornje Radgone. Komarji vrste *Culex* so glavni prenašalci virusa Zahodnega Nila v Evropi (6, 7). Avstrija in Madžarska sta virus v komarjih že potrdili v prejšnjih letih. Virus, ki smo ga potrdili v skupini komarjev, spada v genetsko linijo 2 in je genetsko soroden virusu, potrjenemu v Avstriji in na Slovaškem. V letu 2017 virusa Zahodnega Nila nismo dokazali v komarjih.

Od leta 1996 dalje se v Evropi redno pojavljajo izbruhi z virusom Usutu. Izbruhe so potrdili v Italiji, Avstriji, Nemčiji in nazadnje na Nizozemskem. Virus kroži v naravi v številnih državah, vključno z Avstrijo, Madžarsko, Švico, Španijo itd. (36, 37). Do leta 2018 virusa v Sloveniji nismo dokazali. Tudi v letu 2017 virusa v komarjih nismo dokazali. V letu 2018 smo virus dokazali v dveh skupinah komarjev, ujetih v avgustu in septembru v obalno-kraški in goriški regiji. Virus smo uspeli iz ene skupine komarjev tudi osamiti. Virus je genetsko najbolj soroden virusom Usutu, dokazanim v Italiji, kjer virus v zadnjem desetletju vsako leto najdejo predvsem v komarjih vrste *Culex*, našli so ga tudi v ostalih vrstah komarjev (6, 38–40). Poskusi osamitve virusa Usutu so velikokrat neuspešni, zato so virusni izolati USUV v Evropi maloštevilni in so pridobljeni večinoma iz vzorcev ptičev (41). Slovenski virus Usutu je tako eden izmed prvih virusov, osamljenih iz vzorcev komarjev v Evropi.

Poleg porajajočih se virusov so iz komarjev v Evropi izolirali številne druge: virus Sindbis, Tahyna, Batai in Lednice (42–46). Ti so bili izolirani iz avtohtonih vrst komarjev, vendar je njihov pomen za okužbo ljudi še neraziskan. Kljub temu nam nedavne izkušnje na primeru virusa Zika, ki je bil dolga desetletja pozabljen, kažejo, kako pomemben je razvoj metod za dokazovanje virusov ali poznavanje razširjenosti patogena in njegovega prenašalca v okolju. V Evropi so dokazali v komarjih dva alfavirusa, in sicer virus Sindbis v Nemčiji, na Slovaškem, Švedskem in Finskem in virus Chikungunya med izbruhom leta 2007. Virus Sindbis so dokazali v komarjih vrste *Culex* in *Ochlerotatus*, virus Chikungunya pa v komarjih *Aedes albopictus*. V Sloveniji nismo dokazali nobenega alfavirusa v komarjih. Vrsta *A. albopictus* je v Sloveniji prisotna in razširjena po celotnem območju, zato obstaja tveganje za izbruh virusa Chikungunya (18). Virus Sindbis povzroča bolezen z vročino, poliartitizmom in izpuščajem predvsem v skandinavskih državah, za zdaj ga v Sloveniji še nismo dokazali. Ortobunjavirusi in flebovirusi, ki se prenašajo s komarji, so v Evropi slabo raziskani. V Evropi so dokazali v preteklosti ortobunjaviruse Tahyna, Batai in Inkoo, ki pri ljudeh ne povzročajo boleznih ali blago vročinsko bolezen (42–46). Leta 2011 so v Nemčiji dokazali novi virus, ki povzroča bolezen pri živalih, to je virus Schmollenberg (47). Od takrat so ga našli po celotni Evropi. Poleg novih ortobunjavirusov so v zadnjih letih odkrili tudi številne nove patogene fleboviruse (SFTS na Kitajskem in Heartland v ZDA) (48, 49). Taksonomija bunjavirusov je bila prenovljena leta 2016, v letu 2018 so že uvedli nove spremembe v taksonomiji zaradi identifikacije novih virusov in dodatnih informacij, ki jih nudijo moderne molekularne metode, kot je sekveniranje nove generacije (50, 51). Majhno število kompletnih genomov ortobunjavirusov in flebovirusov je glavni omejujoči dejavnik pri prip-



ravi oligonukleotidnih začetnikov, tako za univerzalni kot vrstno specifični PCR. Molekularne metode, ki smo jih vpeljali za potrditev ortobunjavirusov in flebovirusov, so univerzalne in so jih razvili na podlagi majhnega števila virusov, katerih genomi so znani. Z molekularnimi metodami smo ortobunjaviruse dokazali kar v 15 skupinah komarjev, ulovljenih po celotni Sloveniji, v treh rodovih komarjev (*Culex* sp., *Aedes* sp. in *Anopheles* sp). Nukleotidna zaporedja (~ 120 bp) ne omogočajo natančne opredelitve virusov, zanjo so potrebne nadaljnje analize. Prav tako smo potrdili fleboviruse v komarjih v Sloveniji v dveh rodovih (*Aedes* sp. in *Culex* sp.). Z nukleotidnimi zaporedji (~ 400 bp) smo potrdili, da sodi virus v red bunjavirusov. Vendar natančna opredelitev ni bila mogoča. Tako ortobunjavirusi kot flebovirusi, najdeni v komarjih v Sloveniji, so med seboj sorodni, vendar ne popolnoma enaki. Za natančno genetsko opredelitev teh virusov bomo poskušali pridobiti celotna nukleotidna zaporedja virusov.

Nedavne raziskave virusov, povezanih s peščenimi muhami, so pokazale, da virusi Toscana, Sicilian in Naples povzročajo v poletnih mesecih v Sredozemlju več okužb pri ljudeh, kot je bilo pričakovano (52, 53). Prav zato je terensko delo z laboratorijsko potr-

ditvijo in virusnimi izolacijami iz peščenih muh ključno za opredelitev potencialnih gostiteljev in za epidemiološki nadzor bolezni. V flebotomskih muhah, zbranih v Sloveniji, smo dokazali flebovirus (tabela 3), ki je soroden virusu, najdenemu v flebotomskih muhah v Italiji (17). Skupina flebotomskih muh, v kateri smo dokazali flebovirus, je bila zbrana v obalno-kraški regiji, kjer je tudi številčnost teh prenašalcev največja. V dveh letih projekta smo analizirali 506 flebotomskih muh, razvrščenih v 52 skupin. Število osebkov je majhno v primerjavi s številom osebkov, ki so jih do zdaj analizirali v sredozemskih državah.

Populacije flebotomskih muh so v Sloveniji manjše v primerjavi s sredozemskimi državami. Prav tako je številčnost komarjev nižja kot v območjih velikih rek v sosednjih državah. Zato so potrebne dolgotrajne raziskave in pregled dovolj velikega števila vzorcev, da bodo rezultati verodostojni in primerljivi s študijami v sosednjih državah. V naši raziskavi smo dokazali, da tako virusi, ki jih prenašajo komarji in flebotomske muhe, krožijo tudi v Sloveniji. Z delom bomo nadaljevali tudi v prihodnjem letu in tako poskušali potrditi naše preliminarnе rezultate in natančno opredeliti viruse, ki smo jih odkrili v preučevanih prenašalcih v Sloveniji.

## LITERATURA

1. Angelini R, Finarelli AC, Angelini P, et al. Chikungunya in north-eastern Italy: a summing up of the outbreak. *Euro Surveill.* 2007; 12 (11): E071122.2.
2. Alves MJ, Fernandes PL, Amaro F, et al. Clinical presentation and laboratory findings for the first autochthonous cases of dengue fever in Madeira island, Portugal, October 2012. *Euro Surveill.* 2013; 18 (6). pii: 20398.
3. Gjenero-Margan I, Aleraj B, Krajcar D, et al. Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010. *Euro Surveill.* 2011; 16 (9). pii: 19805.
4. Marchand E, Prat C, Jeannin C, et al. Autochthonous case of dengue in France, October 2013. *Euro Surveill.* 2013; 18 (50): 20661.
5. Hernandez-Triana LM, Jeffries CL, Mansfield KL, et al. Emergence of west nile virus lineage 2 in europe: a review on the introduction and spread of a mosquito-borne disease. *Front Public Health.* 2014; 2: 271.
6. Engler O, Savini G, Papa A, et al. European surveillance for West Nile virus in mosquito populations. *Int J Environ Res Public Health.* 2013; 10 (10): 4869–95.
7. Petric D, Petrovic T, Hrnjakovic Cvjetkovic I, et al. West Nile virus 'circulation' in Vojvodina, Serbia: Mosquito, bird, horse and human surveillance. *Mol Cell Probes.* 2017; 31: 28–36.
8. Calistri P, Giovannini A, Hubalek Z, et al. Epidemiology of west nile in europe and in the

- mediterranean basin. *Open Virol J.* 2010; 4: 29–37.
9. Zeller HG, Schuffenecker I. West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004; 23 (3): 147–56.
  10. Ayhan N, Baklouti A, Prudhomme J, et al. Practical Guidelines for Studies on Sandfly-Borne Phlebotomus: Part I: Important Points to Consider Ante Fieldwork. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2017; 17 (1): 73–80.
  11. Huemer H, Prudhomme J, Amaro F, et al. Practical Guidelines for Studies on Sandfly-Borne Phlebotomus: Part II: Important Points to Consider for Fieldwork and Subsequent Virological Screening. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2017; 17 (1): 81–90.
  12. Gradoni L. Epidemiological surveillance of leishmaniasis in the European Union: operational and research challenges. *Euro Surveill.* 2013; 18 (30): 20539.
  13. Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, et al. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Euro Surveill.* 2010; 15 (10): 19507.
  14. Punda-Polic V, Mohar B, Duh D, et al. Evidence of an autochthonous Toscana virus strain in Croatia. *J Clin Virol.* 2012; 55 (1): 4–7.
  15. Ayhan N, Charrel RN. Of phlebotomines (sandflies) and viruses: a comprehensive perspective on a complex situation. *Curr Opin Insect Sci.* 2017; 22: 117–24.
  16. Ayhan N, Velo E, de Lamballerie X, et al. Detection of Leishmania infantum and a Novel Phlebotomus (Balkan Virus) from Sand Flies in Albania. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2016; 16 (12): 802–6.
  17. Calzolari M, Chiapponi C, Bellini R, et al. Isolation of three novel reassortant phlebotomus, Ponticelli I, II, III, and of Toscana virus from field-collected sand flies in Italy. *Parasit Vectors.* 2018; 11 (1): 84.
  18. Kalan K. Potencial širjenja tigrastega komarja, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), invazivne vrste v Sloveniji. Univerza v Mariboru; 2018.
  19. Popovič A, Praprotnik E, Ivović V, eds. First data on sand fly presence in Slovenia. IX International Symposium on Phlebotomine Sandflies (ISOPS IX); 2016; Reims, France: Parasites, ISSN 1776-1042.
  20. Praprotnik E, Ivović V. Potrditev vrste in filogenija flebotomske muhe *Phlebotomus* (*Transphlebotomus*) *mascittii* Grassi, 1908 v Sloveniji: magistrsko delo. E. Praprotnik; 2017.
  21. Patel P, Landt O, Kaiser M, et al. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. *Virol J.* 2013; 10: 58.
  22. Sanchez-Seco MP, Rosario D, Quiroz E, et al. A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. *J Virol Methods.* 2001; 95 (1-2): 153–61.
  23. Eshoo MW, Whitehouse CA, Zoll ST, et al. Direct broad-range detection of alphaviruses in mosquito extracts. *Virology.* 2007; 368 (2): 286–95.
  24. Matsuno K, Weisend C, Kajihara M, et al. Comprehensive molecular detection of tick-borne phlebotomus leads to the retrospective identification of taxonomically unassigned bunyaviruses and the discovery of a novel member of the genus phlebotomus. *J Virol.* 2015; 89 (1): 594–604.
  25. Savage HM, Godsey MS Jr., Lambert A, et al. First detection of heartland virus (Bunyaviridae: Phlebotomus) from field collected arthropods. *Am J Trop Med Hyg.* 2013; 89 (3): 445–52.
  26. Sanchez-Seco MP, Echevarria JM, Hernandez L, et al. Detection and identification of Toscana and other phlebotomus by RT-nested-PCR assays with degenerated primers. *J Med Virol.* 2003; 71 (1): 140–9.
  27. Lambert AJ, Lanciotti RS. Consensus amplification and novel multiplex sequencing method for S segment species identification of 47 viruses of the Orthobunyavirus, Phlebotomus, and Nairovirus genera of the family Bunyaviridae. *J Clin Microbiol.* 2009; 47 (8): 2398–404.
  28. Linke S, Ellerbrok H, Niedrig M, et al. Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *J Virol Methods.* 2007; 146 (1-2): 355–8.
  29. Cavrini F, Della Pepa ME, Gaibani P, et al. A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid. *J Clin Virol.* 2011; 50 (3): 221–3.
  30. Tovornik D. Review of some bio-ecological research data on the Culicidae fauna in Slovenia (yugoslavia). *Acta entomologica Jugoslavica.* 1983; 19: 19–26.
  31. Kalan K. Razširjenost in sezonska aktivnost tigrastega komarja (*Aedes albopictus*) v priobalnem delu Slovenije: diplomsko delo. [K. Kalan]; 2009.
  32. Merdić E, Boca I, Sudarić Bogojević M, et al. Mosquitoes of Istria, a contribution to the knowledge of Croatia mosquito fauna (Diptera, Culicidae). *Periodicum biologorum.* 2008; 110 (4): 351–60.

33. Muturi EJ, Mwangangi J, Shillu J, et al. Environmental factors associated with the distribution of *Anopheles arabiensis* and *Culex quinquefasciatus* in a rice agro-ecosystem in Mwea, Kenya. *J Vector Ecol.* 2008; 33 (1): 56–63.
34. Haussig JM, Young JJ, Gossner CM, et al. Early start of the West Nile fever transmission season 2018 in Europe. *Euro surveill.* 2018; 23 (32).
35. ECDC. West Nile fever in Europe in 2018 - human cases compared to the previous season; updated 31 August 2018. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-fever-europe-2018-human-cases-compared-previous-season-updated-31>.
36. Rijks JM, Kik ML, Slaters R, et al. Widespread Usutu virus outbreak in birds in the Netherlands, 2016. *Euro surveill.* 2016; 21 (45): pii: 30391.
37. Ziegler U, Fast C, Eiden M, et al. Evidence for an independent third Usutu virus introduction into Germany. *Vet microbiol.* 2016; 192: 60–6.
38. Calzolari M, Gaibani P, Bellini R, et al. Mosquito, bird and human surveillance of West Nile and Usutu viruses in Emilia-Romagna Region (Italy) in 2010. *PLoS one.* 2012; 7 (5): e38058.
39. Grisenti M, Vazquez A, Herrero L, et al. Wide detection of *Aedes flavivirus* in north-eastern Italy--a European hotspot of emerging mosquito-borne diseases. *J Gen Virol.* 2015; 96 (Pt 2): 420–30.
40. Tamba M, Bonilauri P, Bellini R, et al. Detection of Usutu virus within a West Nile virus surveillance program in Northern Italy. *V Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011; 11 (5): 551–7.
41. Bakonyi T, Erdelyi K, Ursu K, et al. Emergence of Usutu virus in Hungary. *J Clin Microbiol.* 2007; 45 (12): 3870–4.
42. Francy DB, Jaenson TG, Lundstrom JO, et al. Ecologic studies of mosquitoes and birds as hosts of Ockelbo virus in Sweden and isolation of Inkoo and Batai viruses from mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg.* 1989; 41 (3): 355–63.
43. Hesson JC, Verner-Carlsson J, Larsson A, et al. *Culex torrentium* Mosquito Role as Major Endemic Vector Defined by Rate of Sindbis Virus Infection, Sweden, 2009. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21 (5): 875–8.
44. Hubalek Z, Rudolf I, Bakonyi T, et al. Mosquito (Diptera: Culicidae) surveillance for arboviruses in an area endemic for West Nile (Lineage Rabensburg) and Tahyna viruses in Central Europe. *J Med Entomol.* 2010; 47 (3): 466–72.
45. Jöst H, Bialonski A, Schmetz C, et al. Isolation and phylogenetic analysis of Batai virus, Germany. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 84 (2): 241–3.
46. Malkova D, Danielova V, Minar B, et al. Isolation of Yaba 1 arbovirus in Czechoslovakia. *Acta virol.* 1972; 16 (1): 93.
47. Goller KV, Hoper D, Schirrmeyer H, et al. Schmallenberg virus as possible ancestor of Shamonda virus. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18 (10): 1644–6.
48. Shen S, Duan X, Wang B, et al. A novel tick-borne phlebovirus, closely related to severe fever with thrombocytopenia syndrome virus and Heartland virus, is a potential pathogen. *Emerg Microbes Infect.* 2018; 7 (1): 95.
49. Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N Engl J Med.* 2011; 364 (16): 1523–32.
50. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, et al. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Arch Virol.* 2017; 162 (8): 2505–38.
51. Maes P, Alkhovsky, SV., Bao Y, et al. Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018. *Arch Virol.* 2018; 163 (8): 2295–310.
52. Charrel RN, Gallian P, Navarro-Mari JM, et al. Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11 (11): 1657–63.
53. Moureau G, Ninove L, Izri A, et al. Flavivirus RNA in phlebotomine sandflies. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010; 10 (2): 195–7.

Maja Rupnik<sup>1</sup>

## ***Clostridioides difficile* – porajajoča se zoonoza**

### ***Clostridioides difficile* – an Emerging Zoonosis**

#### **IZVLEČEK**

KLJUČNE BESEDE: *Clostridium difficile*, PCR-ribotip, genom, hrana, živali

*Clostridioides* (prej *Clostridium*) *difficile* je med najpogostejšimi povzročitelji črevesnih okužb tako v bolnišnicah kot v domačem okolju. Pogosta prisotnost v prebavilih živali ter v hrani kaže tudi na možnost zoonotskih prenosov. Novejše študije na podlagi sekvenciranja celotnih genomov potrjujejo precejšnjo podobnost sevov, ki jih najdemo pri ljudeh in živalih, in ki je sprva temeljila zgolj na podobnosti ribotipov. Analize genomov tudi kažejo, da so klonalni sevi lahko prisotni na velikih geografskih razdaljah ali izolirani v daljšem časovnem intervalu. Hrana je verjetno bolj pomembna kot drugi indirektni prenosni ali stiki. *S. C. difficile* so lahko kontaminirani tako meso in mesni izdelki kot zelenjava.

#### **ABSTRACT**

KEY WORDS: *Clostridium difficile*, PCR-ribotype, genome, food, animals

*Clostridioides* (formerly *Clostridium*) *difficile* is among the most frequent causes of intestinal infections both in hospitals and in the domestic environment. Because it is also common in animal intestines and food, zoonotic transfer is possible. Recent studies based on whole genome sequencing confirm a significant similarity of strains found in animals and humans, which was first based just on ribotype similarity. Genome analyses also indicate that clonal strains could be geographically widely dispersed or isolated in wider time intervals. Food is probably more important than other indirect transmissions or contacts. Both meat and meat products and vegetables can be contaminated with *C. difficile*.

#### **UVOD**

*Clostridium difficile* je bil preimenovan v *Clostridioides difficile*, vendar sta obe imeni pravilni in veljavni in se lahko uporabljata (1, 2). *C. difficile* je ena najpomembnejših črevesnih patogenih bakterij in

predstavlja veliko breme za javno zdravje povsod po svetu (3, 4). Okužba s *C. difficile* lahko poteka kot driska, kolitis, psevdomembranozni kolitis in včasih kot ileus in toksični megakolon (3, 5). Metoda izbora za

<sup>1</sup> Prof. dr. Maja Rupnik, univ. dipl. biol., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Center za mikrobiologijo, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor in Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor; maja.rupnik@nlzoh.si

tipizacijo *C. difficile* se imenuje ribotipizacija. Nekateri ribotipi so povezani z večjo možnostjo prenosa, večjo virulenco in težjim potekom bolezni. Leta 2003 se je pojavil in od takrat močno razširil tip 027; od takrat so se stopnjevali tudi incidenca, resnost bolezni, smrtnost in verjetnost ponovitve okužb (4).

Čeprav je *C. difficile* pogosto prisoten v prebavilih živali, ga običajno nismo uvrščali med zoonoze. Primerjave sevov, izoliranih iz živali in človeka v preteklih desetletjih, so kazale dve dokaj ločeni populaciji z izjemno majhnim prekrivanjem genotipov (6). Razen različnih ribotipov so bili sevi, ki delajo vse tri toksine (A+B+CDT+), zelo pogosti pri živalih in precej redki pri ljudeh (6). Kasneje se je prekrivanje enakih tipov sevov med obema rezervoarjema, človeškim in živalskim, pričelo večati. Prvi članek, ki je opisoval presenetljivo velik delež prekrivanja tipov *C. difficile*, je opisoval seve iz teletičkov v Kanadi (7). Ista skupina je kmalu za tem objavila tudi podatek o visokem deležu mesa in mesnih izdelkov, kontaminiranih s spori *C. difficile* (8). Ti dve publikaciji sta, skupaj z različnimi podobnimi poročili na kongresih, nakazovali možnost zoonotskega potenciala, kar je spodbudilo študije o prevalenci *C. difficile* pri prašičih in govedu ter testiranje hrane tudi v drugih državah (6, 9-13).

Zoonotski potencial bakterije *C. difficile* je bil na Baničevih dnevih predstavljen že na srečanju leta 2012 (14). Prispevek je povzel študije pri živalih in hrani ter predstavil takratni pogled na možnost zoonotskih prenosov. V tokratnem prispevku bomo opisali novosti na tem področju, ki so povezane predvsem z analizo sekvenc genomov, in s tem boljše poznavanje prenosov med živalmi in ljudmi. Sevi določenega ribotipa so namreč raznoliki in jih je mogoče nadalje ločevati s sekvenciranjem in analizo celotnega genoma.

## PODOBNOŠT SEVOV, IZOLIRANIH IZ ŽIVALI IN IZ LJUDI

Bakterijo *C. difficile* so izolirali iz številnih domačih, rejnih in divjih živali. Največ študij je bilo narejenih pri prašičih in pri govedu (12, 13). Prekrivanje ribotipov med humanimi in živalskimi sevi je znatno. Šest izmed desetih najpogostejših ribotipov, ki jih najdemo pri obolelih ljudeh v Evropi, najdemo tudi pri živalih v evropskem prostoru. Pri živalih najdemo različne ribotipe, najbolj značilen je ribotip 078 (13, 15). Hkrati postaja to eden najpogostejših ribotipov pri okužbah v domačem okolju (4). Vendar pa v Sloveniji ribotip 078 najdemo redko (16, 17). Eden izmed ribotipov, ki je pri živalih pogost, pri ljudeh pa redek, pa je ribotip 033, za katerega je značilen tudi poseben vzorec izdelovanja toksinov (A-B-CDT+) (15). V nadaljevanju bomo opisali tri študije, ki opisujejo analizo živalskih in človeških izolatov tudi na nivoju celotnih genomov in ki potrjujejo pogosto prisotnost istovetnih sevov pri ljudeh in živalih.

Na Nizozemskem so primerjali seve ribotipa 078 iz prašičev z različnih farm, iz zdravih oseb na farmah ter iz bolnikov iz istega omočja in ugotovili, da so bili prašiči in zdravi delavci sorazmerno pogosto kolonizirani z istovetnimi sevi (18). Ujemanja med sevi živali in bolnikov niso ugotovili. V obsežnejši mednarodni študiji so isti avtorji primerjali 248 sevov ribotipa 078 iz različnih virov (ljudje, živali, okolje) in 22 različnih držav. Pokazali so, da človeški in živalski sevi niso ločeni v posebne linije, pač pa so prenosni med živalskim in človeškim rezervoarjem stalni in pogosti (19). V Avstraliji so proučevali seve ribotipa 014, izolirane pri ljudeh in prašičih (20). Pri *C. difficile* je kriterij za klonalno sorodne seve prisotnost do dveh točk-ovnih mutacij v celotnem genomu ( $\leq 2$  SNV; *single nucleotide variants*). Glede na ta kriterij je bilo 42 % humanih sevov zelo podobnih vsaj enemu ali več prašičjim sevom. Zanimivo je tudi, da so tovrstne klonalne skupi-

ne sevov razpršene tako po velikih časovnih intervalih kot po velikih geografskih območjih. Avtorji so zato predpostavili, da gre pri človeških sevih za skupen točkovni vir, ki bi lahko bil vezan na uporabo gnojevke s prasičjih farm v kmetijstvu.

## MOŽNI NAČINI PRENOSA MED ŽIVALMI IN LJUDMI

Možni načini prenosa vključujejo neposredni stik ter indirektno prenoso preko zraka, okolja in hrane. Prenosi lahko potekajo v obe smeri. Direktni in indirektni prenosi so bili verjetno vključeni v prenose med živalmi in farmskimi delavci, ki so bili opisani v prejšnjem podglavju (18). Meso in mesni izdelki se lahko okužijo med predelavo. Vir kontaminacije je lahko vsebina črevesa, ki pa je manj pomembna pri zakolu starejših živali, saj so te kolonizirane v manj kot 5 % (13). H kontaminaciji mesa in mesnih izdelkov zato verjetno prispeva tudi človeški vir. Vir kontaminacije zelenjave sta zemlja (gnojenje) in voda (zalivanje); *C. difficile* je namreč pogost v površinskih vodah, kamor pride najpogosteje iz čistilnih naprav (13). Korenasta zelenjava in zelenjava z vidnimi ostanki prsti je bolj pogosto kontaminirana s *C. difficile* (21).

## POMEN ZONOTSKIH PRENOSOV V EPIDEMIOLOGIJI OKUŽB S

### C. DIFFICILE

Zoonotski prenosi so pomembni pri okužbah v domačem okolju. Število teh naraščaj, čeprav je bakterija *C. difficile* tradicionalno uvrščena med povzročitelje bolnišničnih okužb (22). Vendar je do 20 % bolnikov koloniziranih že ob sprejemu v bolnišnico

(22). Dveh tretjin bolnišničnih primerov ni mogoče povezati z drugimi hospitaliziranimi bolniki, kar kaže, da je zelo verjetno prišlo do vnosa iz zunajbolnišničnih rezervoarjev (22).

Eyre in sodelavci so z analizo genomov 10 najpogostejših ribotipov v EU pokazali, da lahko razlikujemo dva načina prenosa (23). Pri enem se sevi znotraj ribotipa razdelijo v linije, specifične za države, in pri teh tipih prevladujejo prenosi, povezani z zdravstvom. Pri drugem vzorcu so sevi istega ribotipa razporejeni v linije neodvisno od države; tukaj avtorji predpostavljajo prenose iz istega vira, ki pa je geografsko razširjen. To bi lahko bila hrana.

Stik s farmskimi živalmi ni bil dejavnik tveganja za doma pridobljeno okužbo s *C. difficile* (24). Medtem pa različne študije poročajo, da je prisotnost psa v gospodinjstvu dejavnik tveganja (25). V eni od naših študij smo zato želeli ugotoviti, ali psi na tačkah prenašajo spore *C. difficile* iz okolja v gospodinjstvo (26). Vendar so rezultati pokazali, da na podplatih čevljev in copat najdemo veliko več spor kot na pasjih šapah.

## ZAKLJUČEK

Prekrivanje ribotipov, izoliranih pri ljudeh in živalih, v zadnjih dvajsetih letih narašča. Prenosi med ljudmi in živalmi so pogosti in obojesmerni. Zoonotski potencial prispeva k celokupni epidemiologiji okužb s *C. difficile* s konstantnimi vnosi spor v domače okolje s stiki z živalmi, posredno preko okolja ter s hrano. Ker ni znana infekcijska doza za *C. difficile*, je težavno ovrednotiti dejansko nevarnost takšnih občasnih stikov s spori *C. difficile*.

## LITERATURA

1. Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, et al. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*. 2016; (40): 95–9.
2. Oren A, Rupnik M. *Clostridium difficile* and *Clostridioides difficile*: two validly published and correct names. *Anaerobe*. 2018; (52): 125–6.

3. Smits WK, Lyras D, Lacy DB, et al. *Clostridium difficile* infection. Nat Rev Dis Primers. 2016; (2): 16020.
4. Martin JS, Monaghan TM, Wilcox MH. *C. difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2016; 13 (4): 206–16.
5. Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. Nat Rev Microbiol. 2009; 7 (7): 526–36.
6. Rupnik M. Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and food-borne disease? Clin Microbiol Infect. 2007; 13 (5): 457–9.
7. Rodriguez-Palacios A, Stampfli HR, Duffield T, et al. *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. Emerg Infect Dis. 2006; 12 (11): 1730–6.
8. Rodriguez-Palacios A, Staempfli HR, Duffield T, et al. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. Emerg Infect Dis. 2007; 13 (3): 485–7.
9. Rupnik M. *Clostridium difficile*: (re)emergence of zoonotic potential. Clin Infect Dis. 2010; 51 (5): 583–4.
10. Gould L.H., Limbago B. *Clostridium difficile* in food and domestic animals: a new foodborne pathogen? Clin Infect Dis. 2010; 51 (5): 577–82.
11. Hensgens MP, Keessen EC, Squire MM, et al. *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? Clin Microbiol Infect. 2012; 18 (7): 635–45.
12. Rodriguez-Palacios A, Borgmann S, Kline TR, et al. *Clostridium difficile* in foods and animals: history and measures to reduce exposure. Anim Health Res Rev. 2013; (14): 11–29.
13. Rodriguez Diaz C, Seyboldt C, Rupnik M. Non-human *C. difficile* reservoirs and sources: animals, food, environment. Adv Exp Med Biol. 2018; 1050: 227–43.
14. Rupnik M, Tkalec V, Ocepek M, et al. Zoonotski potencial bakterije *Clostridium difficile*. Med. razgl. 2012; 51 (supl. 6): 213–8.
15. Janezic S, Zidaric V, Pardon B, et al. International *Clostridium difficile* animal strain collection and large diversity of animal associated strains. BMC Microbiol. 2014; 28 (14): 173.
16. Janezic S, Ocepek M, Zidaric V, et al. *Clostridium difficile* genotypes other than ribotype 078 that are prevalent among human, animal and environmental isolates. BMC Microbiol. 2012; 12: 48.
17. Rupnik M, Beigot Glaser S, Andlovic A, et al. Prisotnost različnih genotipov bakterije *Clostridium difficile* pri hospitaliziranih bolnikih v Sloveniji med dvomesečnim zimskim obdobjem = Diversity of *C. difficile* PCR ribotypes isolated from hospitalised patients in Slovenia during two-winter-month period. Zdrav Vestn. 2013; 82 (11): 739–45.
18. Knetsch CW, Connor TR, Mutreja A, et al. Whole genome sequencing reveals potential spread of *Clostridium difficile* between humans and farm animals in the Netherlands, 2002 to 2011. Euro Surveill. 2014; 19 (45): 20954.
19. Knetsch CW, Kumar N, Forster SC, et al. Zoonotic transfer of *Clostridium difficile* harbouring antimicrobial resistance between farm animals and humans. J Clin Microbiol. 2018; 56 (3): e01384–17.
20. Knight DR, Squire MM, Collins DA, et al. Genome analysis of *Clostridium difficile* PCR Ribotype 014 Lineage in Australian pigs and humans reveals a diverse genetic repertoire and signatures of long-range interspecies transmission. Front Microbiol. 2017; 7: 2138.
21. Lim SC, Foster NF, Elliott B, et al. High prevalence of *Clostridium difficile* on retail root vegetables, Western Australia. J Appl Microbiol. 2018; 124 (2): 585–90.
22. Crobach MJT, Vernon JJ, Loo VG, et al. Understanding *C. difficile* colonization. Clin Microbiol Rev. 2018; 31 (2). pii: e00021–17.
23. Eyre DW, Davies KA, Davis G, et al. Two distinct patterns of *Clostridium difficile* diversity across Europe indicating contrasting routes of spread. Clin Infect Dis. 2018; 67 (7): 1035–44.
24. van Dorp SM, Hensgens MPM, Dekkers OM, et al. Spatial clustering and livestock exposure as risk factor for community-acquired *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect. 2018; S1198-743X (18): 30536–6.
25. Bloomfield LE, Riley TV. Epidemiology and risk factors for community-associated *Clostridium difficile* infection: a narrative review. Infect Dis Ther. 2016; 5 (3): 231–51.
26. Janezic S, Mlakar S, Rupnik M. Dissemination of *Clostridium difficile* spores between environment and households: dog paws and shoes. Zoonoses Public Health. 2018; doi: 10.1111/zph.12475. [Epub ahead of print]

Miša Korva<sup>1</sup>, Jana Avberšek<sup>2</sup>, Matjaž Ocepek<sup>3</sup>, Miroslav Petrovec<sup>4</sup>,  
Tatjana Avšič Županc<sup>5</sup>, člani intervencijske skupine IMI–MF<sup>6</sup> in IMP–VF<sup>7</sup>

## Sumljive pošiljke z belim prahom – bioterorizem ali potegavščina?

### *Suspicious Letters with White Powder – Bioterrorism or Hoax?*

#### IZVLEČEK

---

KLJUČNE BESEDE: bioterorizem, antraks, pisemske pošiljke, intervencija

Bioterorizem je namerna uporaba mikroorganizmov ali toksinov živih organizmov za povzročitev bolezni ali smrti pri ljudeh, živalih ali rastlinah. Cilj bioterorizma je izvajanje nasilja v družbi ter s tem ustvarjanje panike in paralize, s čimer nastajajo pogoji za razcvet določenih političnih, verskih ali gospodarskih skupin. Čeprav ocene pristojnih služb kažejo, da je ogroženost Slovenije zaradi bioterorističnih napadov nizka, je ni mogoče popolnoma izključiti. Prav zato je Uprava Republike Slovenije za zaščito in reševanje pripravila državni načrt za pravočasen, strokoven, nadzorovan ter koordiniran odziv na pojav bioterorizma v našem prostoru. Poleg hitre prepoznavne nenavadnega dogodka je v drugem koraku izjemno pomembna zanesljiva laboratorijska analiza in pravilna prepoznavna potencialnega bioterorističnega agensa. Ker je le-ta zahtevna, kompleksna in nevarna, je smotno, da jo opravljajo institucije, ki imajo tudi sicer izkušnje z diagnostiko nevarnih patogenov ter imajo za to primerno usposobljene kadre, potrebno opremo in so usposobljene za hitre odzive na nepričakovane dogodke. V Sloveniji diagnostiko potencialnih bioterorističnih agensov opravljata intervencijski skupini Medicinske in Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Od leta 2013, ko se je število intervencij začelo povečevati, smo na terenu ukrepali že 93-krat, vendar do sedaj še v nobeni pošiljki nismo odkrili bioterorističnih agensov.

---

<sup>1</sup> Znan. sod. dr. Miša Korva, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; misa.korva@mf.uni-lj.si

<sup>2</sup> Znan. sod. dr. Jana Avberšek, univ. dipl. mikr., Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Znan. svet. dr. Matjaž Ocepek, dr. vet. med., Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, 1000 Ljubljana

<sup>4</sup> Izr. prof. dr. Miroslav Petrovec, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

<sup>5</sup> Akad. prof. dr. Tatjana Avšič Županc, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

<sup>6</sup> Člani intervencijske skupine IMI–MF: Tjaša Cerar Kišek, Mateja Jelovšek, Marko Kolenc, Katarina Resman Rus, Martin Sagadin, Andrej Steyer, Tina Uršič

<sup>7</sup> Člani intervencijske skupine IMP–VF: Majda Golob, Igor Gruntar, Maja Kavalič, Brane Krt, Darja Kušar, Jasna Mičunović, Tina Pirš, Milojka Šetina, Urška Zajc, Irena Zdovc



## ABSTRACT

---

KEY WORDS: bioterrorism, anthrax, white-powder letters, intervention teams

Bioterrorism is the intentional use of microorganisms or toxins of living organisms to cause disease or death in humans, animals or plants. The aim of bioterrorism is to terrorise the society and by doing so cause panic and paralysis to create conditions for the establishment of certain political, religious or economic groups. Although the assessments of competent authorities indicate that the threat of bioterrorism attacks in Slovenia is low, it cannot be completely ruled out. For this reason, the Administration of the Republic of Slovenia for Civil Protection and Disaster Relief has prepared a national plan for a timely, professional, controlled and coordinated response to the emergence of bioterrorism in our area. In addition to the rapid identification of an unusual event, the second important step in mitigating circumstances is a reliable laboratory analysis and correct identification of potential bioterrorism agents. Because such diagnostics is demanding, complex and dangerous, it is of great importance to perform these activities in institutions that have experience in diagnosing dangerous pathogens, and thus have the necessary capacity, staff and equipment for a prompt reaction to unexpected events. In Slovenia, the diagnostics of potential bioterrorism agents is performed by two intervention groups at the Medical Faculty and the Veterinary Faculty of the University of Ljubljana. Since 2013, when the number of interventions has started to increase, we have been involved in 93 interventions, but so far none of the suspicious letters were found to contain bioterrorism agents.

## UVOD

Beseda »bioterrorizem« označuje zlonamerno uporabo patogenih mikroorganizmov, virusov, bakterij ali njihovih toksinov, z namenom povzročitve obolenja ali smrti pri ljudeh, živalih ali rastlinah (1). Cilj bioterorističnega napada je ustvarjanje žrtev, terorja, družbene psihoze ali ekonomskih izgub. Napadi pa so navadno navdihnjeni z ideološkimi, verskimi ali političnimi prepričanji. V primerjavi s klasičnimi terorističnimi sredstvi biološka orožja ubijajo samo človeško ali drugo živo silo, medtem ko zgradbe in infrastruktura ostajajo nepoškodovane. Prav tako je cena izdelave bioloških orožij relativno nizka, omogočeno je enostavno širjenje s preprostimi načini škropljenja, z enkratno uporabo lahko škodujejo veliki populaciji ljudi, prvi klinični znaki bolezni so lahko podobni epidemijam običajnih bolezni, zato jih je težko odkriti ob prvi

uporabi (1). Uporaba biološkega orožja pri osvajanju ozemlja ali vojskovanju sega že v čas pred našim štetjem, ko naj bi Hanibal uporabil zaboje s strupenimi kačami, ki jih je odvrigel na sovražnikove ladje, ali ko so Grki zastrupljali vodne izvire sovražnikov, tako da so vanje metali trupla ljudi in živali. Enako taktiko so kasneje uporabili tudi Rimljani in Perzijci ter celo Američani med državljansko vojno. V časih epidemije kuge so vojaški generali spoznali, da je lahko tudi truplo bolnikov biološko orožje – s katapultacijo trupel preko obzidij naj bi v 14. stoletju premagali Tatare v mestu Kaffa. Tekma v razvoju biološkega orožja med različnimi državami se je končala šele leta 1972 s Konvencijo o biološkem in toksičnem orožju (2). Konvencija preprečuje razvoj, proizvodnjo in kopičenje mikroorganizmov ali toksinov v oblikah in količinah, ki niso namenjene miroljubni uporabi. Kljub prepovedi pa večina

držav vseeno ni povsem prekinila raziskav in kopičenja biološkega orožja, zato se je v tem času razmahnil nenadziran in skrbno prikrit razvoj. Mejniki v sodobni mikrobiološki dobi je bilo leto 2001, ko so tik po napadu na Svetovni trgovinski center sledile »pošiljke z antraksom«, ki so bile poslane več politikom in novinarjem (2).

Da lahko nek mikroorganizem uporabimo kot biološko orožje, mora imeti specifične lastnosti: i) enostavnost proizvodnje v velikih količinah, ii) stabilnost in obstojnost virulence po izpustu v okolje, iii) primerno velikost delcev za prenos preko zraka in iv) pomanjkanje imunosti v tarčni populaciji. Glede na lastnosti biološke agense delimo v tri različne skupine, glede na enostavnost širjenja, tveganje, ki ga predstavljajo za posameznika in glede na resnost bolezni ali smrti, ki jo lahko povzročijo (3, 4). Skupna lastnost vseh potencialnih bioloških agensov je tudi zahteva po dodatni pripravljenosti javnega zdravstvenega sistema, da pravočasno prepozna odstopanja od običajnih epidemij, ki jih povzročajo različni mikroorganizmi. Poleg tega mora imeti laboratorije ustrezne varnostne stopnje, ki imajo pripravljene diagnostične metode in usposobljen kader za hitro in pravilno laboratorijsko analizo (5).

Kljub temu da je verjetnost bioterorističnega napada v Sloveniji relativno nizka, pa vseeno tudi mi nismo imuni pred pojavom terorizma (6). V zadnjem času v svetu narašča grožnja uporabe orožja za množično uničevanje v teroristične namene. In prav ta nevarnost, da različne teroristične skupine uporabijo orožje ali sredstva za množično uničevanje za dosego svojih političnih, verskih, gospodarskih, socialnih ali drugih interesov, je poleg uporabe klasičnih oblik delovanja teroristov (npr. ugrabitev, nastavljanje eksplozivov ali umori), realna grožnja varnosti sodobnega sveta. Prav zato ukrepi, katerih cilj je izboljšati prepoznavanje, analizo in zdravljenje ob rednem uspo-

sabljanju in izobraževanju osebja, ključno vplivajo na sposobnost družbe za boj proti „rednim“ izbruhom nalezljivih bolezni in na ublažitev posledic morebitnih bioterorističnih napadov.

## **POSTOPEK UKREPANJA OB INTERVENCIJI ZARADI SUMA UPORABE BIOTERORISTIČNEGA AGENSA**

Intervencijo na kraju dogodka sproži oseba, ki prejme sumljiv paket ali pošiljko in o tem obvesti policijo (113) ali regijski center za obveščanje (112). Center za obveščanje Republike Slovenije (CORS) najprej aktivira pristojno policijsko postajo in Gasilske enote širšega pomena (GEŠP). Nato o dogodku obvesti Enoto za protibombno zaščito in intervencijski skupini IMI-MF in IMP-VF. Intervencijski skupini obeh fakultet se dogovorita o prevzemu intervencije, saj sta v postopku obveščanja aktivirani sočasno. Po prejemu obvestila dežurni vodja intervencijske skupine IMI-MF/IMP-VF po svoji strokovni presoji aktivira ostale člane intervencijske skupine, ki se v roku največ 30 minut, odzovejo in odpravijo na mesto intervencije. Posamezno intervencijsko skupino sestavljata dva delavca, ki skupaj pokrivata klasično in molekularno diagnostiko potencialno bioterorističnih mikroorganizmov.

Ob prihodu na kraj dogodka prva intervencijska enota (policija ali GEŠP) zavaruje prostor oz. območje, umakne osebe, ki so bile v stiku s pošiljko ali v kontaminiranem prostoru, izklopi prezračevanje in omeji dostop do prostora in lokacije. Vzorčenje neznane snovi izvedeta skupaj pripadnika GEŠP in Enote za protibombno zaščito, ki ob tem izvede tudi test za odkrivanje morebitne eksplozivne snovi na kraju dogodka. Intervencijska skupina IMI-MF/IMP-VF na terenu svetuje pri vzorčenju neznane snovi, zagotovi primerno embalažo za vzorčenje in varen transport vzorca v laboratorij. V

kolikor vzorčevalca ne potrdira eksplozivne snovi v vzorcu, neznano snov skupaj z embalažo shranita v sterilno posodo ali vrečko za transport biološkega materiala. Zunanjo površino embalaže dekontaminirata z 10 % raztopino neionizirane hipoklorne kisline (Izosan G ali BX24) in jo prestavita v sekundarno embalažo, ki omogoči varen prenos vzorca iz prostora. Prav tako z dekontaminacijskim sredstvom prekrijeta potencialno kontaminirano površino, kjer se je pošiljka z neznano snovjo odpirala in zapustila prostor. Na zunanjem zavarovanem območju GEŠP pripravi dekontaminacijski bazen, kjer dekontaminirajo vzorčevalce in predajo pošiljko intervencijski skupini IMI–MF/IMP–VF. Intervencijska skupina IMI–MF/IMP–VF pošiljko zapakirano v trojno embalažo transportira v laboratorij 3. stopnje biološke varnosti, kjer izvede mikrobiološko analizo prejetega vzorca. Vodja dežurne intervencijske skupine IMI–MF/IMP–VF mora o rezultatu preiskav nemudoma poročati vodji intervencije na terenu, CORS-u in Operativno-komunikacijskemu centru Generalne policijske uprave (OKC GPU). V primeru pozitivnega rezultata mora obvestiti tudi dežurnega epidemiologa. Gasilci pustijo kraj dogodka zavarovan, dokler intervencijska skupina IMI–MF/IMP–VF iz laboratorija ne sporoči delnih rezultatov molekularnih preiskav (po približno treh urah), nato v primeru negativnega rezultata zaključijo z intervencijo na terenu. Dokončna mikrobiološka analiza je navadno končana v 24–48 urah in v kolikor v vzorcu niso odkriti potencialni bioteroristični agensi, lahko intervencijska skupina IMI–MF/IMP–VF pošiljko in vsebino preda policiji za nadaljnje forenzične in kriminalistične preiskave.

## LABORATORIJSKA ANALIZA POŠILJK

V skladu z državnim načrtom zaščite in reševanja ob uporabi orožij ali sredstev za množično uničevanje v teroristične name-

ne oziroma ob terorističnem napadu s klasičnimi sredstvi sta oba laboratorija izdelala interni algoritem diagnostike potencialnih bioterorističnih agensov. Vpeljali smo široko paleto različnih molekularnih tehnik, s katerimi zagotavljamo hitro preliminarno analizo neznanih vzorcev. Poleg tega zagotavljamo tudi širok nabor klasičnih mikrobioloških postopkov, ki nam omogočajo odkrivanje tudi potencialno gensko izboljšanih mikroorganizmov. Zaradi zagotavljanja najvišje stopnje varnosti za delavce in okolje analiza prejete pošiljke poteka v laboratoriju 3. stopnje biološke varnosti.

Vsebinsko pisemske pošiljke vedno analiziramo s klasičnimi in molekularnimi mikrobiološkimi metodami. V prvem koraku v laboratoriju 3. stopnje biološke varnosti pošiljko previdno odpremo in analiziramo vsebino. Iz vsebine pisemske pošiljke osamimo nukleinsko kislino za hitro preliminarno molekularno analizo. V kolikor smo v pisemski pošiljki ugotovili prašnato snov, ki je skladna s potencialnimi nosilci za razširjanje spor bakterije *Bacillus anthracis*, osamljeno nukleinsko kislino pomnožujemo z verižno reakcijo s polimerazo (PCR, angl. *polymerase chain reaction*) v realnem času za dokazovanje genov *rpoB*, *capC* in *pag* bakterije *B. anthracis* (7). Gen *rpoB* nosi zapis za  $\beta$ -podenoto polimeraze RNA in je prisoten pri več bakterijah rodu *Bacillus* spp., gena *capC* in *pag* pa se nahajata na plazmidu in sta značilna virulenčna dejavnika za *B. anthracis*. Gen *capC* se nahaja na plazmidu pX01 in kodira tvorbo kapsule, medtem ko se gen *pag* nahaja na plazmidu pX02 in kodira toksin *B. anthracis*. Pomnoževanje treh tarčnih odsekov sočasno nam omogoča večjo zanesljivost pri zagotavljanju hitrih preliminarnih rezultatov. Protokoli za osamitev nukleinske kisline in PCR v realnem času so prilagojeni in validirani tako, da lahko o rezultatih poročamo že v približno treh urah. Poleg specifičnih molekularnih metod osamljeno nukleinsko kislino analiziramo

mo tudi z evbakterijskim PCR, ki pomnožuje 320 bp dolg odsek gena za 16S rRNK (8). Ta gen je prisoten pri vseh bakterijah, zato po določanju njegovega nukleotidnega zaporedja in njegovi primerjavi z bazo podatkov lahko prepoznamo pomnoženo bakterijo.

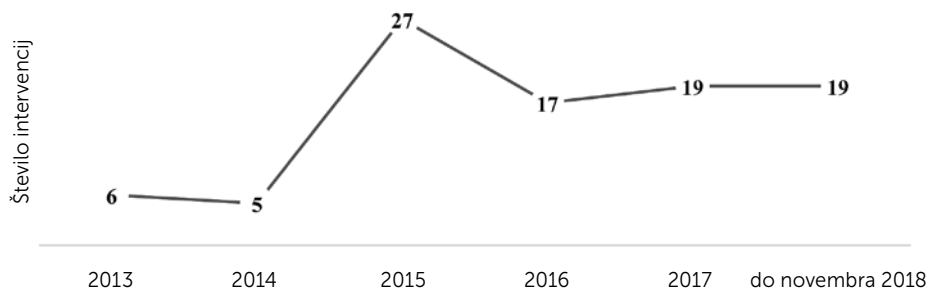
Nabor potencialnih bioterorističnih mikroorganizmov lahko molekularno dokazujemo tudi s komercialnim kompletom FilmArray® BioThreat Panel (Biofire; Bio-merieux, Francija), kjer posamezna kartuša vsebuje vse reagentne potrebne za osamitev, pomnoževanje in dokaz nukleinskih kislin 16 potencialnih bioterorističnih agensov (*Bacillus anthracis*, *Brucella melitensis*, *Burkholderia* spp., *Clostridium botulinum*, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, *Rickettsia prowazekii*, *Yersina pestis*, filovirusi, alfavirusi, virus ortopox, virus variola in *Ricinus communis*). Prednost metode je v tem, da zagotavlja rezultate že v eni uri in da ne zahteva predhodne osamitve nukleinskih kislin, zaradi česar se zmanjša nevarnost za laboratorijske delavce. Glavna pomanjkljivost metode pa je relativno visoka cena in manjša občutljivost v primerjavi s PCR v realnem času za dokaz nukleinske kisline posameznih agensov.

Poleg tega, da izvedemo osamitev nukleinskih kislin za molekularne metode, vsebino pisemske pošiljke vzporedno nasa-

dimo tudi na trdna in tekoča bakteriološka gojišča (krvni agar, čokoladni agar, Schaedlerjevo gojišče in bujon TSB). Vzorce gojimo vsaj 24 ur v aerobnih in anaerobnih pogojih ter nato vse sumljive kolonije pregledamo z masnim spektrometrom MALDI-TOF (Bruker, Nemčija). V primeru nejasnega spektra lahko sumljive kolonije analiziramo tudi z molekularnimi metodami ali podaljšamo bakteriološko preiskavo do 48 ur.

## INTERVENCIJE V LETIH 2013–2018

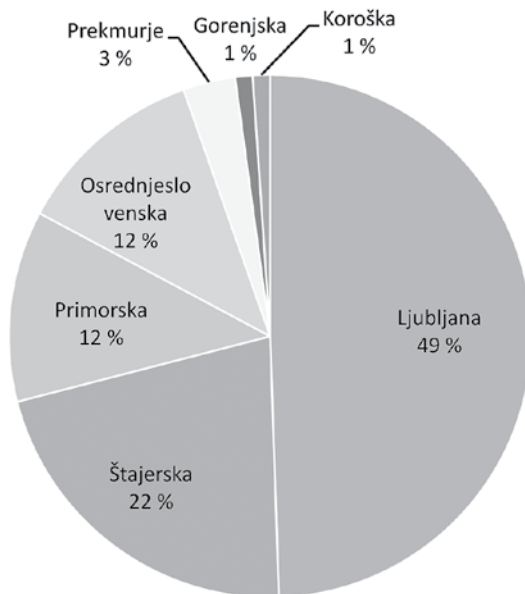
V obdobju od leta 2013 do novembra 2018 smo sodelovali pri 93 intervencijah zaradi suma uporabe bioterorističnih agensov v pisemskih pošiljkah z neznano vsebino, največkrat z belim prahom. Število intervencij se je po letu 2015 močno povečalo in od takrat je v povprečju približno 19 intervencij na leto (slika 1). Večje število intervencij v letu 2015 je posledica sedmih pošiljk na različnih inštitucijah v Ljubljani, ki so bile odkrite isti dan. To je bila tudi najobširnejša intervencija, saj je bila poleg omenjenih sedmih intervencij istočasno še ena intervencija v Kopru. Podobne intervencije z več pošiljkami istočasno oz. po dve v istem dnevu na več naslovih so bile še petkrat, vendar z največ štirimi pošiljkami istočasno.



Slika 1: Število IMI–MF/IMP–VF intervencij po letih.

Podobno kot drugod so tudi v Sloveniji najbolj izpostavljena območja, kjer je večja koncentracija političnih ali gospodarskih stičišč. Tako je bilo največ prejemnikov pi-

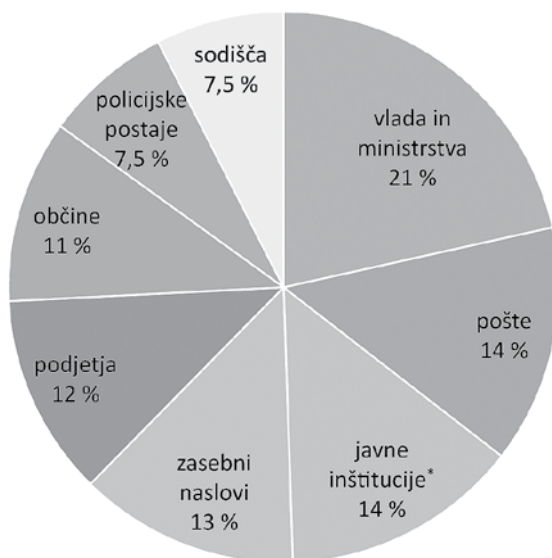
semskih pošiljk z belim prahom v Ljubljani (n=46), sledita Štajerska (n=20), Primorska (n=11) in širša Osrednjeslovenska regija (n=10) (slika 2).



**Slika 2:** Zemljepisna razporeditev intervencij zaradi pisemskih pošilk z belim prahom.

Prejemniki pošilk so največkrat vlada, državni zbor in ministrstva ter druge javne inštitucije, dvanajstkrat pa so bile poši-

ljke naslovljene na zasebne naslove prebivalcev (slika 3).



**Slika 3:** Prejemniki pisemskih pošilk z belim prahom (\*zapori, fakultete, RTV, zdravstveni domovi, Zavod za zaposlovanje, Zdravniška zbornica, Zveza potrošnikov, Inšpektorat za delo...).

## Posebnosti iz intervencij in laboratorija

Največji izziv nam predstavljajo intervencije z več pošiljkami v istem dnevu na različnih koncih Slovenije, ki zahtevajo dobro komunikacijo med obema intervencijskima skupinama. Do sedaj smo imeli dve intervenciji, ki sta bili logistično izjemno zahtevni. Prva je bila med prvomajskimi prazniki leta 2015, ko je bila intervencijska skupina IMI–MF sočasno poklicana na sedem različnih naslovov v Ljubljani, intervencijska skupina IMP–VF pa je prevzela pošiljko v Kopru. Druga pa je bila junija letos, ko je intervencijska skupina IMP–VF prevzela dve pošiljki na dveh lokacijah v Ljubljani in nato še eno v Postojni, ravno ko smo začeli z laboratorijsko preiskavo, pa smo bili obveščeni še o eni pošiljki v Kopru, ki jo je nato prevzela intervencijska skupina IMI–MF. V zadnjih dveh letih smo imeli kar pet intervencij tudi v nočnem času (med 1. in 3. uro zjutraj), vedno v logističnih centrih pošte Slovenije.

Zahtevne so tudi intervencije zaradi pisemskih pošiljk, ki jih posamezniki odkrijejo na domačem naslovu, saj ne vedo kako ravnati z vsebino, ki se jim strese iz kuverte. V enem od primerov je oseba po klicu na številko 112, kljub drugačnim navodilom operaterja, pošiljko z belim prahom želela iz kuhinje prenesti v predsobo, da bi gasilcem olajšala vzorčenje, vendar je s tem raznesla prah po celem stanovanju, zato so morali gasilci celotno pot dekontaminirati s penasto dekontaminacijsko raztopino.

Pisemske pošiljke ne vsebujejo vedno samo belega prahu, ampak smo v njih odkrili npr. tudi polento, iztrebke, zrezek, zemljo ali čajne vrečke z belim prahom. Iz takih vzorcev lahko z bakteriološko preiskavo namnožimo več različnih bakterij, predvsem iz rodu bacilov, ki nam otežijo prepoznavo potencialno nevarnih bakterij in občutno podaljšajo čas intervencije. Tako smo na primer v iztrebku dokazali bakterijo

*Clostridium perfringens*, ki je lahko patogena za ljudi, vendar je bila nevarnost za okužbo ljudi, izpostavljenih pisemski pošiljki, zaradi načina prenosa bakterije majhna. Kljub temu smo se pri tem primeru soočili z izzivi pri poročanju rezultatov, saj nismo mogli trditi, da vsebina pošiljke ni nevarna za ljudi. Poseben je bil tudi vzorec, ki je vseboval belkasto prašno vsebino, ki je bila z začetnimi molekularnimi metodami negativna. Že po desetih urah pa je bilo bakterijsko gojišče prekrito s številnimi različnimi bakterijami, kar je nakazovalo na to, da je bilo v vzorcu izredno veliko bakterij. S podrobno bakteriološko in molekularno analizo smo ugotovili, da je pošiljka vsebovala vsebino kapsul probiotika Linex®. V eni od zadnjih intervencij smo bili napoteni na pošto v manjšem slovenskem kraju, kjer so poročali o večjem paketu, iz katerega se je vsul bel prah. Ker je šlo za precej velik paket, je bila večja verjetnost, da bi poleg nevarne biološke snovi lahko bila v njem tudi eksplozivna naprava, zato so pripadniki Enote za protibombno zaščito v skladu s svojimi postopki zavarovali in razstrelili omenjeni paket, za katerega se je nato izkazalo, da je vseboval le mleko v prahu. Podobno smo tudi po dveh zaključenih intervencijah (v istem dnevu) na pošti ugotovili, da se bel prah ni vsul iz sumljive pisemske pošiljke, ampak se je strgala vrečka, namenjena vezavi vlage, ki je priložena v vrečo s pisemskimi pošiljkami.

## ZAKLJUČEK

Hitro posredovanje vseh ekip na terenu in predvsem hitra laboratorijska diagnostika sta nujna za ljudi, ki pridejo v stik z vsebino pisemskih pošiljk in morajo ostati v karanteni na mestu dogodka. Do sedaj so bili vsi primeri lažni, oz. je šlo za potegavščino in ne za bioterorizem, vendar je predvsem zaradi nepredvidljive situacije v svetu težko sprejeti odločitev, da je preiskovanje vseh sumljivih pisemskih pošiljk nesmiselno. Na to nas opozarjata tudi dva nedav-

na dogodka, povezana s toksinom ricinom. V prvem primeru so v Nemčiji odkrili terorista, ki je doma izdeloval ricin in pripravljaval napad, v oktobru pa so v pisemskih pošiljkah v ZDA odkrili sledi tega toksina. Glede na naše izkušnje, ki smo jih pridobili v zadnjih šestih letih, imamo dob-

ro vpeljan postopek za hitro posredovanje ob sumu uporabe bioterorističnih agensov, vendar se zdi, da vsak tak dogodek, še posebej, če se pojavi v medijih, poda idejo in zagon ljudem, da izrazijo svoje mnenje s potegavščino, ki od vseh vpletenih in intervencije zahteva veliko časa in denarja.

## LITERATURA

1. Jansen HJ, Breeveld FJ, Stijns C, et al. Biological warfare, bioterrorism, and biocrime. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20 (6): 488–96.
2. Barras V, Greub G. History of biological warfare and bioterrorism. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20 (6): 497–502.
3. Center for disease control (CDC). Skupine bioloških agensov [citirano 2018 Oct 27]. Dosegljivo na: <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>
4. World Health Organization. Skupine bioloških agensov [citirano 2018 Oct 27]. Dosegljivo na: <https://www.who.int/csr/delibepidemics/annex3.pdf>
5. Wagar E. Bioterrorism and the role of the clinical microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev.* 2016; 29 (1): 175–89.
6. Državni načrt zaščite in reševanja ob uporabi orožij ali sredstev za množično uničevanje v teroristične namene oziroma terorističnem napadu s klasičnimi sredstvi sta oba laboratorija izdelala algoritem diagnostike potencialnih bioterorističnih agensov. Uprava RS za zaščito in reševanje. 14.02.2005. 214-00-167/2003-30. Verzija 4.0, ažurirano 11/2014.
7. Ellerbrok H, Nattermann H, Özel M, et al. Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett.* 2002; 214: 51–9.
8. Harris KA, Hartley JC. Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *J Med Microbiol.* 2003; 52: 685–91.

Iztok Štrumbelj<sup>1</sup>, Helena Ribič<sup>2</sup>

# Strategija spremljanja odpornosti bakterij proti antibiotikom

## *A Strategy for Surveillance of Antibiotic Resistance of Bacteria*

### IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: spremljanje odpornost proti antibiotikom, strategija za obvladovanje odpornosti mikrobov

Odpornost številnih klinično pomembnih bakterijskih vrst proti antibiotikom narašča po vsem svetu in je eden izmed pomembnih javnozdravstvenih problemov. Globalno in nacionalno obstajajo strategije za omejevanje odpornosti in spremljanje odpornosti bakterij je sestavni del vseh. V prispevku opisujemo sedanje spremljanje odpornosti bakterij proti antibiotikom v Sloveniji in načrte za celovit način spremljanja v prihodnosti. Sistem spremljanja odpornosti bakterij proti antibiotikom bo del celovite nacionalne strategije za obvladovanje odpornosti mikrobov v okviru koncepta »Eno zdravje«.

### ABSTRACT

KEY WORDS: surveillance of antibiotic resistance, microbial resistance control strategy

Antimicrobial resistance among many clinically important bacteria is increasing worldwide and represents one of the most pressing public health problems. Globally and nationally there are strategies to limit resistance, and bacterial resistance surveillance is an integral part of them all. This paper describes current surveillance of bacterial resistance to antibiotics in Slovenia and plans for comprehensive future surveillance. The antibiotic resistance surveillance system will be part of a comprehensive national strategy to control the resistance of microbes within the framework of the »One Health« concept.

### UVOD

Odpornost številnih klinično pomembnih bakterijskih vrst proti antibiotikom narašča po vsem svetu in je eden izmed pomembnih javnozdravstvenih proble-

mov (1–16). Potrebno je globalno delovanje. Tudi Slovenija pripravlja nacionalno strategijo za obvladovanje odpornosti mikrobov. Namen strategije je zagotoviti skupno in celovito delovanje za obvladovanje

<sup>1</sup> Mag. Iztok Štrumbelj, dr. med., spec. med. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Murska Sobota, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Arhitekta Novaka 2b, 9000 Murska Sobota; iztok.strumbelj@nlzoh.si

<sup>2</sup> Helena Ribič, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj



odpornosti na področju zdravstva, veterine in okolja. Predvidoma bo javnosti osnutek strategije predstavljen v drugi polovici novembra 2018.

Cilji globalnega akcijskega načrta Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) so: izboljšati osveščenost in razumevanje razlogov za razvoj in širjenje odpornosti mikrobov proti protimikrobnim zdravilom, povečati razumevanje z raziskavami in razvojem, spremljati pogostost okužb, odpornost mikrobov in porabo protimikrobnih zdravil, zmanjšati pogostost okužb in optimizirati rabo protimikrobnih zdravil (4). Osnova sta dva principa – potrebno je mednarodno sodelovanje, ker je problem globalen, in potrebno je medsektorsko sodelovanje (humana medicina, veterina, kmetijstvo, okolje), saj gre za »Eno zdravje« (4, 8). Različni ekosistemi so povezani, odpornost se pojavlja pri človeku, pri živalih in v okolju, potrebno je torej sodelovanje različnih področij (4, 8, 14, 15).

Ilustrirajmo to le z enim primerom, najbolj perečo nevarnostjo – gre za enterobakterije, ki izločajo karbapenemaze (CRE–CPE). V Egiptu so jih osamili pri bolnikih v bolnišnici, na mesu v prosti prodaji; na eni od piščančjih farm so jih osamili pri zaposlenih, pri piščancih in v pitni vodi – izvor in poti širjenja niso poznane (15). Največja grožnja so proti vsem antibiotikom odporni sevi (»panrezistenca«) Leta 2015 so prvič opisali proti vsem dostopnim antibiotikom odporen izolat *Klebsiella pneumoniae*, katerega odpornost so potrdili z molekularnimi metodami, z ugotovitvijo genov za odpornost. Veliko teh genov je bilo na mobilnih genetskih elementih (16). Izolat so testirali z 31 antibiotiki, ki so potrebni za opredelitev odpornosti proti vsem antibiotikom po skupni opredelitvi ameriškega in evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje nalezljivih bolezni (CDC in ECDC) (7).

V tem prispevku se bomo omejili na osnutek strategije in akcijskega načrta s

področja spremljanja odpornosti bakterij proti antibiotikom (protibakterijskim zdravilom) v humani medicini. V strategiji bo opredeljeno tudi spremljanje odpornosti mikrobov v veterini ter povezava med spremljanjem odpornosti v veterini in humani medicini. Osnutek strategije temelji na izhodiščih, ki so jih pripravili strokovnjaki iz različnih področij iz Komisije za smiselno rabo protimikrobnih zdravil in Nacionalne komisije za preprečevanje in obvladovanje bolnišničnih okužb. Avtorja tega prispevka sodelujeta v pripravi strategije in v tem prispevku predstavljata svoje razumevanje bodočega spremljanja. Kakšno bo spremljanje odpornosti v prihodnje, je odvisno od številnih nadaljnjih korakov.

## SEDANJE SPREMLJANJE ODPORNOSTI V SLOVENIJI

Odpornost bakterij proti antibiotikom v Sloveniji spremljajo klinični mikrobiološki laboratoriji z analizo kumulativnih podatkov za klinično pomembne bakterijske izolate v Sloveniji. Potekata dve spremljanji odpornosti, ki se smiselno dopolnjujeta; obe kot osnovno metodo uporabljata spremljanje odpornosti prvih kliničnih izolatov v koledarskem letu (9–12). Za primerjavo med evropskimi državami so na voljo podatki o občutljivosti invazivnih izolatov izbranih bakterijskih vrst, ki jih spremljajo v okviru evropske mreže *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-Net). Slovenski del rezultatov, EARS-Net Slovenija, je prosto dostopno na spletnem naslovu Nacionalnega inštituta za javno zdravje (<http://www.nijz.si/sl/ears-net-slovenija>), vsi podatki EARS-Net pa so prosto dostopni na spletni strani ECDC (9, 11). Občutljivost večjega števila bakterijskih vrst, in sicer prvih kliničnih izolatov iz različnih kliničnih vzorcev, spremlja Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ); letna poročila obja-

vlja na spletni strani <http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz> (12).

Težava je v tem, da Slovenija nima opredeljenih struktur spremljanja odpornosti, sedanje spremljanje poteka na osnovi razumevanja stroke, da je spremljanje odpornosti nujno potrebno. Marsičesa ni bilo mogoče razvijati in izvajati v potrebni meri (npr. molekularnih metod za razumevanje in boljše obvladovanje odpornosti). Viri niso opredeljeni, niso opredeljene strukture in odgovornosti. Stanje dolgoročno ni vzdržno. Potreben je torej nov, čvrst, vzdržan sistem, ki je del nacionalne strategije za obvladovanje odpornosti. Poudariti velja, da je v akcijskem načrtu predvideno, da do uveljavitve nove organiziranosti spremljamo odpornost kot do sedaj.

## **DVA CILJA NASTAJAJOČE STRATEGIJE S PODROČJA SPREMLJANJA ODPORNOSTI MIKROBOV**

- Vzpostaviti stabilen sistem spremljanja odpornosti, ki bo zagotavljal zanesljive, pravočasne in primerljive podatke o odpornosti mikrobov proti protimikrobnim zdravilom.
- Vzpostaviti sistem za odziv na izredne dogodke: pojav izjemno odpornih bakterij ali sum na kopičenje večkratno odpornih bakterij.

## **OSNOVNA ORGANIZIRANOST SPREMLJANJA ODPORNOSTI V BODOČE**

Prvi sklop aktivnosti v strategiji je vzpostavitev celovitega sistema za spremljanje odpornosti z ustreznimi strukturami in pravnimi podlagami. Osnova stabilnega spremljanja odpornosti je določitev mreže medicinskih mikrobioloških laboratorijev z referenčnimi laboratoriji. Za razliko od veterine v humani medicini nimamo imenovanega referenčnega mikrobiološkega laboratorija, potreben je eden

ali več referenčnih laboratorijev, potrebno je opredeliti naloge nacionalnih referenčnih laboratorijev, skladno s priporočili ECDC (17). Imenovanje referenčnih laboratorijev znotraj obstoječih laboratorijev in ustrezni viri za delovanje so med drugim pogoj za smiseln razvoj molekularnih metod spremljanja odpornosti. Določitev mreže je v javnem interesu, kar je opredeljeno tudi v Resoluciji o nacionalnem planu zdravstvenega varstva 2016–2025 (ReNPZV16–25) (18). Na osnovi navedenega in z drugimi deležniki bo potrebno določiti Laboratorijsko mrežo za spremljanje odpornosti mikrobov v humani medicini in okolju (LMSOM-HO). V njej bo nacionalni koordinacijski center (NKC) z interdisciplinarnim strokovnim timom, ki bo celovito načrtoval, koordiniral in usmerjal spremljanje odpornosti na vseh nivojih, sodeloval s strokovnjaki drugih področij ter skrbel za medresorsko povezovanje z veterino in sektorjem za okolje. Odgovoren bo za pripravo poročil in njihovo dostopnost strokovnjakom različnih strok, ki podatke potrebujejo za svoje delo. Potrebno bo opredeliti vlogo in naloge SKUOPZ.

## **PRAVNE IN INFORMACIJSKE PODLAGE, FINANČNI IN KADROVSKI VIRI**

Potrebna bo preučitev in priprava pravnih temeljev za zbiranje in obdelavo podatkov v povezavi s spremljanjem odpornosti v humani medicini (med njimi Zakon o zdravstveni dejavnosti, Zakon o zbirkah podatkov v zdravstvu, Zakon o nalezljivih boleznih in drugi). Potrebna bo ustanovitev NKC in opredelitev strukture, organiziranosti, vodenja, nalog, kompetenc in odgovornosti NKC. Opredeliti je potrebno pravila za ravnanje z zbirkami podatkov in z rezultati analiz o odpornosti mikroorganizmov. Za zagotovitev ustrezne informacijske podpore za učinkovito delovanje

sistema spremljanja odpornosti (vključno za opozorilno spremljanje) bo potrebno preučiti in izboljšati laboratorijske informacijske sisteme za beleženje in analizo podatkov, da bodo omogočili učinkovito delovanje sistema znotraj LMSOM-HO, ter za sodelovanje z drugimi deležniki, predvsem na področju opozorilnega spremljanja odpornosti. Razširiti bo potrebno uporabo brezplačnega računalniškega programa WHONET, ki nudi številne možnosti za analizo odpornosti. Opredeliti in zagotoviti bo potrebno ustrezne finančne in človeške vire za delovanje sistema in spodaj navedene naloge.

### **VSEBINA SPREMLJANJA – KAJ BO SISTEM SPREMLJANJA ODPORNOSTI MIKROBOV VKLJUČEVAL**

Vsebina spremljanja bo razširjena v primerjavi s trenutnim spremljanjem. Sistem spremljanja odpornosti mikrobov bo vključeval tri dele: i) redno (stalno) spremljanje; ii) obdobjno (občasno) spremljanje; iii) opozorilno spremljanje. Predvsem je nov koncept »opozorilnega spremljanja« – tu ne gre za kumulativni antibiogram, pač pa za spremljanje odpornih izolatov (enota spremljanja je odporni izolat, ne rezultat antibiograma za določen antibiotik).

Redno spremljanje se bo izvajalo kontinuirano (kot npr. sedaj poteka spremljanje invazivnih bakterij v okviru EARS-Net in spremljanje invazivnih in neinvazivnih izolatov v poročilih SKUOPZ), podrobneje bo opredeljeno v letnem načrtu in v načrtih za več let. Seveda se bo tudi kontinuirano spremljanje dopolnjevalo, ogrodje pa bo ostalo nespremenjeno, da bo mogoče ugotavljati trende. Del spremljanj bo vključen v mednarodno spremljanje in bo usklajen z mednarodnimi pravili.

Obdobjno (občasno) spremljanje bo načrtovano, opredeljeno bo v letnem načrtu ali načrtu za več let, lotevalo se bo proble-

mov, pri katerih iz rednih kliničnih izolatov ne dobimo potrebnih podatkov. Primer: pri nezapletenih okužbah sečil žensk se mikrobiološka preiskava praviloma ne uporablja – da dobimo vzorce za kumulativni antibiogram je potrebna posebna raziskava, v kateri namensko zberemo vzorce seča iz nezapletenih okužb sečil pri ženskah in iz njih ugotovimo podatke o pojavljanju in odpornosti povzročiteljev. Občasno se bo izvajalo tudi ugotavljanje odpornosti v okolju, obsegalo bo načrtovanje, vzorčenje in izvedbo analize populacij mikrobov iz okolja – okoljska epidemiologija odpornosti (npr. odplake).

Opozorilno spremljanje zaznava »opozorilne dogodke« (pojav posameznih izolatov, ki bodo opredeljeni kot »izjemno odporni« ali kopičenje večkratno odpornih izolatov) in ga količinsko ni mogoče napovedati vnaprej. Opredeljene bodo tarče spremljanja in pristop. Podrobnosti so navedene spodaj.

S strategijo bo poleg spremljanja odpornosti bakterij proti antibiotikom v humani medicini uvedeno tudi spremljanje odpornosti gliv in virusov proti ustreznim protimikrobnim zdravilom.

Molekularne analize bodo smiselno vgrajene v spremljanje odpornosti tako pri stalnem in obdobjnem kot tudi pri opozorilnem spremljanju. Pri stalnem in obdobjnem spremljanju bodo molekularne analize največkrat določene vnaprej, zato govorimo o »programiranem« molekularnem spremljanju. V opozorilnem sistemu spremljanja izjemno odpornih izolatov ali kopičenja odpornih mikrobov pa se molekularne analize uporabijo ob pojavu opredeljenih izjemno odpornih izolatov ali ob kopičenju opredeljenih večkratno odpornih izolatov.

### **OPOZORILNO SPREMLJANJE ODPORNOSTI – PODROBNEJŠI OPIS**

Cilj opozorilnega spremljanja je, da laboratorij zazna nevarnost za pomembno po-

večanje odpornosti v populaciji in obvesti ustrezne deležnike, da lahko učinkovito ukrepajo. Pri obvladovanju nevarnosti bodo uporabne tudi molekularne metode. Deležniki opozorilnega spremljanja so s področja obvladovanja okužb, javnega zdravja ter drugi strokovnjaki. Nevarnost za pomembno povečanje odpornosti v populaciji je dveh vrst:

- vsak izolat z »izjemno« odpornostjo,
- sum na kopičenje izolatov večkratno odpornih bakterij (z izjemno odpornostjo ali brez nje).

Izjemno odporen je izolat, ki je odporen proti veliki večini učinkovitih netoksičnih antibiotikov. Pomembno je, da je mogoče uvesti učinkovite ukrepe za preprečevanje širjenja. Praviloma bo te izolate potrebno molekularno potrditi. Kaj je »izjemna odpornost«, bodo opredelili s strokovnjaki različnih strok, pojem nima čvrste opredelitve v mednarodnem merilu ali nacionalno. Nedvomno je zaradi izjemnega epidemiološkega pomena kot »izjemno odporen« potrebno obravnavati vsak izolat CRE-CPE, zato je nujna čimprejšnja priprava pravnih temeljev za prijavo izolatov CRE-CPE, ki so epidemiološko največje tveganje.

Ali so proti vankomicinu odporni *Enterococcus faecium*, proti karbapenemom odporne bakterije *Pseudomonas aeruginosa* in *Acinetobacter baumannii* »izjemno odporne« bakterije, je stvar bodočih razprav strokovnjakov – morda bo za vsako od njih določen poseben algoritem ukrepanja.

Bakterije z ESBL danes ne sodijo med »izjemno odporne«, ker so praviloma občutljive za učinkovite in netoksične karbapeneme, vendar lahko njihovo kopičenje povzroči povečano uporabo karbapenemov, kar vodi v večjo verjetnost pojava izjemno odpornih izolatov. Opozorilni sistem mora torej zaznati kopičenje večkratno odpornih bakterij (VOB) za ukrepanje proti njihove- mu širjenju.

Potrebne aktivnosti za uvedbo sistema opozorilnega spremljanja VOB so:

- opredelitev »izjemno odpornih« izolatov in njihovega sprotne molekularnega potrjevanja;
- opredelitev kopičenje izolatov VOB;
- opredelitev pravnih temeljev za prijavo, poročanje in druge ukrepe ob »izjemno odpornih izolatih« in ob kopičenju VOB;
- opredelitev sestave in imenovanje interdisciplinarnih regionalnih in nacionalnih ekip ter njihovo delovanje: vsebina dela, odgovornosti, pravni temelji, kadrovski in finančni viri;
- priprava algoritma medsebojnega obveščanja, sodelovanja in ukrepanja ob pojavu »izjemno odpornih« izolatov in izbruhih VOB;
- opredelitev obdobja poročanja (npr. letno poročanje);
- priprava algoritmov za shranjevanje in pošiljanje »izjemno odpornih izolatov« na molekularno testiranje;
- molekularno potrjevanje vsakega potencialno »izjemno odpornega izolata« v referenčnih laboratorijih LMSOM-HO;
- priprava algoritmov za shranjevanje/ zbiranje/pošiljanje izolatov in molekularno tipizacijo izolatov ob kopičenju VOB ter za sporočanje kdo, komu, kdaj sporoča katere podatke;
- molekularna tipizacija izolatov v referenčnih laboratorijih LMSOM-HO ob izpolnjenih kriterijih po algoritmih za kopičenje/izbruh;
- priprava finančnih načrtov za opozorilno spremljanje.

## ZAKLJUČEK

Spremljanje odpornosti samo po sebi odpornosti ne zmanjšuje. Le ogledalo je, v katerem se odlikava stanje. Slovenija je glede odpornosti v evropskem povprečju, vendar se odpornost nekaterih po Gramu negativnih bakterij pri nas povečuje, izjemno odporni izolati se lahko k nam razši-

rijo tudi iz nekaterih sosednjih in bližnjih držav, kjer so pogostejši kot pri nas (10). Tudi v Sloveniji smo imeli en izbruh bakterij CRE-CPE, ki je bil uspešno obvladan (13). Nevarnost je torej prisotna že zdaj, ne le v prihodnosti. Nujno je torej obstoječe ukrepe za spremljanje in obvladovanje odpornosti okrečiti. Z ukrepi ne smemo odlašati, saj večine zamujenega ni mogoče popraviti. Strokovnjaki SZO ugotavljajo: »Posebej

zaskrbljujoče je, da je, ko se razvije, odpornost proti protimikrobnim zdravilom ali nepovratna ali pa se zmanjšuje zelo počasi, kljub uvedbi ukrepov za njeno omejevanje in ukrepom za smiselno rabo protimikrobnih zdravil. Posledično je zgodnja uvedba ukrepov proti razvoju odpornosti in za preprečevanje širjenja odpornosti ključna javnozdravstvena strategija (2).«

## LITERATURA

1. The Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. The Review on Antimicrobial Resistance, chaired by Jim O'Neill. December 2014 [citirano 2018 Nov 29]. Dosegljivo na: <https://amr-review.org/Publications.html>
2. World Health Organization. The evolving threat of antimicrobial resistance - Options for action. World Health Organization; 2012 [citirano 2018 Nov 29]. Dosegljivo na: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503181\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503181_eng.pdf)
3. World Health Organization. Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance 2014. Ženeva: WHO; 2014 [citirano 2018 Nov 29]. Dosegljivo na: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillance-report/en>
4. World Health Organization. Global Action Plan On Antimicrobial Resistance. Ženeva: WHO; 2015. [citirano 2018 Nov 29] Dosegljivo na: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/>
5. World Health Organization. National antimicrobial resistance surveillance systems and participation in the Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS). A guide to planning, implementation, and monitoring and evaluation, World Health Organization; 2016 [citirano 2018 Nov 29]. Dosegljivo na: <http://www.who.int/glass/resources/publications/national-surveillance-guide/en/>
6. World Health Organization (WHO). Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in health care facilities. Geneva: World Health Organization; 2017 [citirano 2018 Nov 29]. Dosegljivo na: <http://www.who.int/infection-prevention/publications/guidelines-cre/en/>
7. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 268–81.
8. European Commission. Communication from the Commission to the European Parliament and the Council. Action plan against the rising threats from antimicrobial resistance. Brussels, 15.11.2011 [citirano 2018 Nov 29] Dosegljivo na: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A52011DC0748>
9. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2017.
10. Pirš M, Štrumbelj I. Problemi protimikrobne odpornosti v Sloveniji – kaj nas lahko posebej skrbi? In: Beović B, Lejko Zupanc T, Tomažič J, eds. Sodobna infektologija: problem protimikrobne odpornosti, virusni hepatitis, okužbe povezane z zdravstvom, okužbe v pediatriji in bolezni, ki jih prenašajo klopi / Infektološki simpozij 2018, Ljubljana, oktober 2018. P. 34-42. Sekcija za protimikrobno zdravljenje SZD in Klinika za infektivne bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana in Katedra za infektivne bolezni in epidemiologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, Ljubljana 2018.
11. Kolman J, Müller - Premru M, Korošec A, et al. Podatki mreže EARS-Net Slovenija. In: Sočan M, Kraigher A, Klavs I, eds. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2016. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje; 2017; p. 108–125.
12. Štrumbelj I, Pirš M, Berce I, et al. Pregled občutljivosti bakterij za antibiotike – Slovenija 2016. Ljubljana: Slovenska komisija za

- ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ); 2018. 1. izdaja. [citirano 2018 Nov 29] Dosegljivo na: <http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz>.
13. Pirš M. Prvi izbruh karbapenemaz pri enterobakterijah v Sloveniji. In: Novosti v mikrobiologiji: zbornik izročkov. Ljubljana: Sekcija za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe SZD; 2015: 159–65 [citirano 2018 Nov 29]. Dosegljivo na: [http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/strokovna-srecanja/6-likarjev-simpozij/files/zbornik\\_2016.pdf](http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/strokovna-srecanja/6-likarjev-simpozij/files/zbornik_2016.pdf)
  14. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2018. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. EFSA Journal. 2018; 16: 5182.
  15. Hamza E, Dorgham SM, Hamza DA. Carba-penemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in broiler poultry farming in Egypt. J Glob Antimicrob Resist. 2016; 7: 8–10.
  16. H. M. Zowawi, B.M. Forde, M. Alfaresi et al. Stepwise evolution of pandrug-resistance in *Klebsiella pneumoniae*. Sci Rep, 5 (2015) [citirano 2018 Nov 29] Dosegljivo na: <https://www.nature.com/articles/srep15082>
  17. ECDC. Core functions of microbiology reference laboratories for communicable diseases, 2010. [citirano 2018 Nov 29] Dosegljivo na: [https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/1006\\_TER\\_Core\\_functions\\_of\\_reference\\_labs.pdf](https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/1006_TER_Core_functions_of_reference_labs.pdf)
  18. Ministrstvo za zdravje republike Slovenije. Resolucija o nacionalnem planu zdravstvenega varstva 2016–2025 (ReNPZV16–25), Ministrstvo za zdravje republike Slovenije, 2016 [citirano 2018 Nov 29] Dosegljivo na: [http://www.mz.gov.si/si/delovna\\_podrocja\\_in\\_prioritete/resolucija\\_o\\_nacionalnem\\_planu\\_zdravstvenega\\_varstva\\_2016\\_2025\\_skupaj\\_za\\_druzbo\\_zdravja/](http://www.mz.gov.si/si/delovna_podrocja_in_prioritete/resolucija_o_nacionalnem_planu_zdravstvenega_varstva_2016_2025_skupaj_za_druzbo_zdravja/)



Mojca Matičič<sup>1</sup>, Jerneja Videčnik Zorman<sup>2</sup>

## Eliminacija javnozdravstvenega problema virusnih hepatitisov – mit ali resničnost?

*Elimination of Viral Hepatitis as a Public Health Threat – Myth or Reality?*

### IZVLEČEK

---

KLJUČNE BESEDE: virusni hepatitis, eliminacija, strategija, Slovenija

Kljub dobrim preventivnim, diagnostičnim in terapevtskim možnostim virusni hepatitis še vedno predstavlja pomemben globalen javnozdravstveni problem z naraščajočo smrtnostjo, ki je že preseгла smrtnost zaradi aidsa. Prispevek predstavlja aktualne značilnosti posameznih vrst virusnih hepatitisov in globalno strategijo Svetovne zdravstvene organizacije za eliminacijo virusnih hepatitisov kot javnozdravstvenega problema do leta 2030. V to strategijo umešča tudi Slovenija, ki predstavlja primer dobre prakse pri obvladovanju virusnih hepatitisov. Z okrepitevijo ustreznih aktivnosti, predvsem izboljšanjem deleža cepljenih in odkrivanja kronično okuženih, bi Slovenija lahko dosegla odpravo virusnega hepatitisa kot javnozdravstvenega problema še pred začrtanim obdobjem.

### ABSTRACT

---

KEY WORDS: viral hepatitis, elimination, strategy, Slovenia

Despite good preventive, diagnostic and treatment options, viral hepatitis remains an important global public health problem with increasing mortality which has already surpassed mortality due to AIDS. The paper presents the updated characteristics of viral hepatitis and the World Health Organisation's Global Health Sector Strategy for eliminating viral hepatitis as a public health threat by the year 2030. Slovenia is also included in the strategy as an example of a good practice in managing viral hepatitis. By promoting appropriate activities, especially by increasing the share of vaccinated people and the diagnosing rate in those with a chronic infection Slovenia could achieve the goal of eliminating viral hepatitis ahead of the set timeline.

### UVOD

V svetu virusni hepatitis danes predstavlja pomemben in naraščajoč javnozdravstveni problem. Po najnovejših ocenah Svetovne

zdravstvene organizacije je v svetu 325 milijonov kronično okuženih z virusoma hepatitisa B in C, kar 290 milijonov pa jih ne ve za svojo okužbo in zato ne išče zdravniš-

---

<sup>1</sup> Prof. dr. Mojca Matičič, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana in Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; mojca.maticic@kclj.si

<sup>2</sup> Dr. Jerneja Videčnik Zorman, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana



ke pomoči. Devet od desetih okuženih z virusoma, od katerih je eden ozdravljiv (hepatitis C), drugi pa dobro obvladljiv in celo preprečljiv (hepatitis B), je prepuščenih naravnih poti okužbe, ki lahko pripelje do raka na jetrih ali dokončne odpovedi delovanja jeter in smrti (1). Samo leta 2015 je za posledicami hepatitisa B in C v svetu umrlo kar 1,34 milijona ljudi, pri čemer bi lahko 95 % okužb z virusom hepatitisa B (HBV) preprečili z učinkovitim cepljenjem, več kot 95 % okuženih z virusom hepatitisa C (HCV) pa uspešno pozdravili z učinkovitimi zdravili, ki so na voljo (2, 3). Rak na jetrih zaradi hepatitisa B je prva rakava bolezen v zgodovini medicine, ki jo lahko preprečimo s cepljenjem. Hepatitis C pa je prva kronična virusna bolezen v zgodovini medicine, ki je ozdravljiva. K smrtnim primerom zaradi hepatitisa prispevata tudi okužbi z virusoma hepatitisa A in E, katerih značilnosti so se v zadnjih letih precej spremenile (4).

## AKTUALNE ZNAČILNOSTI POSAMEZNIH VIRUSNIH HEPATITISOV

### Virus hepatitis A

Za virus hepatitisa A (HAV), ki se prenaša po t. i. fekalno-oralni poti, je bilo vrsto let znano, da ga k nam večinoma prinašajo potniki z endemičnih področij JV Azije, Indije, Afrike in Srednje Amerike (5, 6). V zadnjih letih pa v razvitih evropskih državah ugotavljamo izbruhe hepatitisa A, povezane z določenimi prehranskimi izdelki, zato evropski Center za nadzor nad boleznimi (angl. *European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) izvaja poseben projekt sledenja tej okužbi. V evropskih velemestih pa je zaznati tudi epidemične izbruhe hepatitisa A med moškimi, ki imajo spolne odnose z moškimi (MSM), npr. na Portugalskem, v Nemčiji, Španiji in v Italiji. Ustrezni higieni in sanitaciji, ki smo ju vrsto let izpostavljali kot ključni pri preprečeva-

nju okužbe s HAV, je nujno potrebno dodati še preventivno cepljenje proti hepatitisu A, ne le za potnike v endemična področja, ampak tudi za osebe, ki potujejo v določene evropske države, in za določene skupine s tveganim vedenjem (MSM). Izpostavitve je potrebno tudi poekspozicijsko cepljenje vseh kontaktov okuženih oseb.

### Virus hepatitisa E

Celo hepatitis E se je »prebudil« in ni več le »trivialna« okužba endemičnih področij JV Azije, Indije, Afrike in Srednje Amerike, ki se prenaša fekalno-oralno in jo povzročata genotipa virusa hepatitisa E (HEV) 1 in 2 (4–6). Ta okužba je pogosta pri mlajših, ne povzročata kronične okužbe in je lahko življenje ogrožajoča pri nosečnicah (v 25 %) in bolnikih s kroničnim obolenjem jeter (v 70 %). V zadnjih letih so odkrili, da genotipa HEV 3 in 4 povzročata primere avtohtonega hepatitisa E v razvitem svetu Evrope in Amerike, naravni rezervoar okužbe pa so domače in divje svinje ter divjačina in še nekatere druge živali – torej gre za zoonozo. Človek se okuži z uživanjem termično slabo obdelanega tovrstnega mesa, predvsem raznih suhomesnih izdelkov. Znanj so izbruhi hepatitisa E v Franciji, na Nizozemskem in še ponekod (7). »Evropski« hepatitis E pa se kaže tudi z zunajjetrnimi bolezenskimi znaki, saj lahko privede do bolezni ledvic (npr. glomerulonefritis) in nevroloških zapletov (npr. ohromelosti okončin, sindrom Guillain-Barre). Zelo nevaren pa je lahko za osebe z motenim imunskim odzivom, pri katerih se v 70 % razvije kronični hepatitis E. Letos je Evropsko združenje za bolezni jeter (angl. *European Association for the Study of the Liver*, EASL) objavilo prva priporočila za obvladovanje hepatitisa E genotipov 3 in 4 (4).

### Virus hepatitisa B

S HBV je po ocenah okuženih 257 milijonov ljudi, vsako leto pa mu podleže zara-

di končne ciroze ali raka na jetrih 890.000 bolnikov (1). Zaradi dolgotrajno prikritega poteka bolezni le 9 % okuženih (22 milijonov) ve za svojo diagnozo, le 8 % teh pa je zdravljenih (1,7 milijona). Kljub temu da je že od leta 1982 na voljo učinkovito cepivo proti hepatitisu B in je le-to vključeno v nacionalne programe cepljenja otrok 184 držav, je v svetu popolno cepljenje leta 2015 prejelo le 84 % otrok. Necepljeni se v razvitem svetu okužijo predvsem s tveganimi spolnimi odnosi ali menjavo pribora pri injiciranju ali njuhanju drog (8). Najnovejša priporočila EASL prinašajo novo definicijo naravnega poteka okužbe s HBV, nanjo pa se navezujejo tudi nove smernice zdravljenja kroničnega hepatitisa B (2). Poleg pegiliranega interferona alfa imamo na voljo predvsem nukleoz(t)idne analoge, ki omogočajo dober nadzor nad boleznijo, žal pa le-ta še ni ozdravljiva. Problem zdravljenja je dolgotrajno, najverjetneje doživljenjsko jemanje zdravil in razvoj odpornih sevov virusa. Zato raziskovalci pospešeno iščejo nove možnosti zdravljenja hepatitisa B (9).

### Virus hepatitisa C

Po najnovejših ocenah Svetovne zdravstvene organizacije je na svetu 71 milijonov ljudi okuženih HCV, vsako leto pa mu zaradi odpovedi delovanja jeter in raka na jetrih podleže skoraj 400.000 bolnikov (1). Le 20 % okuženih (14 milijonov) se namreč zaveda svoje okužbe, le 7,6 % zdravljenih v letu 2015 (550.000 bolnikov) pa je prejelo najnovejša zdravila. V zadnjih letih so pegilirani interferon alfa in ribavirin namreč nadomestile izredno učinkovite in bolniku prijazne, na virus neposredno delujoče učinkovine, ki so kombinirane že v obliki ene tablete, zdravljenje traja v povprečju 8–12 tednov, trajen virološki odziv pa dosežemo pri skoraj vseh bolnikih (3). Še vedno pa se vsako leto v Evropi na novo okuži več kot 30.000 ljudi, večinoma

mladih. Velika večina se okužbe vrsto let sploh ne zaveda, ker poteka brez bolezenskih znakov. Pri veliki večini okuženih se razvije kronično vnetje jeter (hepatitis), ki lahko privede do raka na jetrih in odpovedi delovanja jeter. Skoraj tretjina vseh ciroz je posledica okužbe s HCV (6). Z okužbo pa je dokazano povezan tudi primarni rak na jetrih, ki danes v svetu predstavlja šesto najpogostejšo rakavo bolezen in tretjo s smrtnim izhodom. Hepatitis C je sistemska bolezen, ki lahko prizadene skoraj vsak organski sistem in povzroča tudi življenje ogrožajoča stanja (krioglobulinemični glomerulonefritis, vaskulitis, B-celični limfom, in drugo) (10). Žal cepiva ni na voljo. Neokuženi pa okužbo lahko preprečijo z izogibanjem tveganemu vedenju.

### GLOBALNA STRATEGIJA ELIMINACIJE VIRUSNIH HEPATITISOV

Ker je število smrti zaradi virusnih hepatitisov že preseгло število smrti zaradi HIV/aidsa, je na redni 69. skupščini leta 2016 Svetovna zdravstvena organizacija sprejela prvo globalno strategijo o obvladovanju virusnih hepatitisov s ciljem, da do leta 2030 izkoreninimo virusni hepatitis kot javnozdravstveno grožnjo v svetu (11). Cilj strategije je, da do tega leta za 90 % zmanjšamo število na novo okuženih in za 65 % zmanjšamo število smrti zaradi virusnih hepatitisov. Ob tem so bile sprejete tudi globalne smernice celostne obravnave okužbe z virusom hepatitisa C.

Bistvo smernic je, da danes okužbo z virusi hepatitisa lahko učinkovito preprečimo, bodisi s cepljenjem bodisi s tem, da se ne izpostavljam tveganjem. Če pa je za to že prepozno, je danes hepatitis C z najnovejšimi zdravili ozdravljiva bolezen, hepatitis B pa obvladljiva bolezen, če le vemo, da smo okuženi in pravočasno poiščemo ustrezno zdravniško pomoč (12–14).

Za uresničitev smernic pa je potrebno vpeljati kaskado ukrepov, ki vključujejo masovno testiranje in odkrivanje okuženih, njihovo vključitev v zdravstveni sistem, zdravljenje, ozdravitev, dolgotrajen zdravniški nadzor in preprečevanje novih okužb. Resolucijo o taki globalni strategiji je podpisalo in se s tem zanjo tudi zavezalo 194 držav članic, med njimi tudi Slovenija, ki pa je takšno strategijo z ukrepi vred kot ena prvih držav v svetu sprejela že pred več kot 20 leti (15).

## STRATEGIJA OBVLADOVANJA VIRUSNIH HEPATITISOV V SLOVENIJI

V Sloveniji je obvladovanje virusnih hepatitisov že nad 20 let na dokaj visoki ravni, saj nas je evropska analitična hiša *Health Consumer Power House* uvrstila na drugo mesto med državami Evropske unije (14, 15). Predvsem t. i. slovenski model zdravljenja hepatitisa C v Evropi služi kot primer dobre klinične prakse (8). Statistična projekcija je pokazala, da bi s stopnjevanjem števila novoodkritih okuženih in njihovega zdravljenja lahko do leta 2030 za 90 % zmanjšali prevalenco okuženih in praktično skoraj izničili število bolnikov z ogrožajočimi zapleti bolezni. Na voljo imamo odlične diagnostične možnosti, predvsem v Laboratoriju za diagnostiko aidsa in virusnih hepatitisov Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, kjer izvajajo rutinske in najzahtevnejše preiskave (16–18). Gledano zgodovinsko imamo na voljo tudi vsa priporočena zdravila za zdravljenje virusnih hepatitisov, ki ga večinoma vodijo infektologi. Prvi korak pa je odkriti vse okužene, saj okužba traja tudi tri desetletja ali več, lahko povsem brez bolezenskih znakov.

Glede hepatitisa B je nacionalna raziskava prvič v Sloveniji pokazala izrazito uspešnost nacionalnega programa cepljenja otrok proti hepatitisu B, ki se izvaja

pri rojenih po letu 1992 pred vstopom v desetletko (18). Poleg tega po letu 1994 vse nosečnice redno pregledujemo na okužbo z virusom hepatitisa B in v primeru pozitivnega izvida novorojenca takoj cepimo. Zadnji s HBV okužen slovenski otrok se je rodil leta 1996, po letu 2016 pa nismo imeli nobene kronično okuženega otroka, rojenega v Sloveniji, slovenskim staršem. Žal pa obstaja utemeljena bojazen, da se bo tako izjemno odlično stanje kmalu porušilo, saj se delež cepljenih otrok iz leta v leto znižuje – leta 2014/15 je bila precepljenost otrok 88,8 %, leto kasneje pa 87,8 % (19). Svetovna zdravstvena organizacija sporoča, da je cepivo učinkovito pri več kot 95 % cepljenih, ob tem pa je tudi zelo varno, saj je bilo do sedaj danih že več kot milijarda odmerkov po vsem svetu. Eliminacija hepatitisa B s pomočjo cepljenja je realno dosegljiv cilj. Za kronično okužene imamo na voljo ustrezen zdravniški nadzor in priporočeno zdravljenje, vključno z organiziranim nadzorom nad kemoprofilakso hepatitisa B pri osebah, ki prejemajo imunosupresivno zdravljenje (20).

Glede hepatitisa C pa moramo eliminacijo doseči s pomočjo zdravil, saj cepiva ni. Izsledki najnovejše raziskave kažejo, da v Sloveniji dve tretjini okuženih predstavljajo intravenski uporabniki drog (17). Za razliko od mnogih, tudi nam bližnjih držav, imamo v Sloveniji na srečo vse možnosti, da bolnikom nudimo kar najboljšo zdravstveno oskrbo z vsemi najnovejšimi zdravili in ustreznim sistemom obravnave bolnikov. Žal pa ne moremo pomagati tistim, ki so okuženi, a za okužbo še ne vedo, in zato ne poiščejo pravočasno pomoči pri ustreznem specialistu. Ker je hepatitis C vrsto let prikrita bolezen, v Sloveniji ocenjujemo, da zaenkrat poznamo malo več kot polovico okuženih, za katere pa je dobro poskrbljeno, saj imamo na voljo vsa nova zdravila in je uspeh zdravljenja pri nas skoraj 99 % (Matičič M s sod., še neobjavljeni podatki).

Sistematično smo se lotili tako imenovane mikro-eliminacije hepatitisa C. Gre za povsem novo medicinsko terminologijo, prvič predstavljeno strokovni javnosti leta 2017, ki opredeljuje aktivno iskanje okužbe v skupinah, kjer jo najpogosteje pričakujemo, in takojšnje zdravljenje okuženih v tej skupini (21). Pravzaprav smo v Sloveniji to strategijo začeli izvajati že veliko pred njenim uradnim poimenovanjem in tako odkrite in zdravljene bolnike že tudi uspešno pozdravili. Tako smo v začetku letošnjega leta prvi v svetu uspeli izkoreniniti hepatitis C v skupini hemofilikov in naredili t. i. mikro-eliminacijo (22). Po poti mikro-eliminacije smo nato nadaljevali tudi z drugimi skupinami okužbi bolj izpostavljenih bolnikov in s tem tako rekoč izkoreninili okužbo v enotah za hemodializo po Sloveniji, kar tudi predstavlja nekoč dokaj nepredstavljen dosežek. Enako postopamo tudi z drugimi kroničnimi ledvičnimi bolniki ter bolniki po transplantaciji organov. Sproti gasimo požar in izvajamo mikro-eliminacijo pri sookuženih s HIV.

Najtrši oreh pa so intravenski uporabniki drog, kjer smo že pred več kot desetimi leti na nacionalni ravni ustanovili posebno interdisciplinarno mrežo za zdravljenje hepatitisa C, ki je dokazano učinkovit in služi kot model dobre prakse drugim državam (23, 24). Vendar pa v luči novih dognanj ta model še izboljšujemo, lotevamo pa se ne le uporabnikov drog v programu zdravljenja odvisnosti, temveč tudi preostalih, vključno s tistimi »na cesti«. V ta namen je s sodelovanjem Ministrstva za zdravje RS in mreže Centrov za preprečevanje in zdravljenje odvisnosti od drog, odkrivanje in zdravljenje hepatitisa C v pripravi projekt mobilne enote za delovanje širom po Sloveniji.

K odkrivanju okuženih smo letos zelo aktivno pritegnili tudi družinske zdravni-

ke, ki naj testirajo vsakogar s kakršnimkoli dejavnikom tveganja za okužbo ali z določenimi neznaki bolezenskimi znaki (10). V ta namen smo izdelali algoritem za testiranje na okužbo z virusom hepatitisa C in posebne vprašalnike z dejavniki tveganja, ki bodo na voljo v čakalnicah in ambulantah osebnih družinskih zdravnikov.

Aktivno pa poskušamo ozaveščati ne le strokovno, temveč tudi splošno javnost, zato smo poleg najrazličnejših načinov informiranja in ozaveščanja splošne javnosti izdelali tudi interaktivno spletno aplikacijo o virusnih hepatitisih (<http://hepy.mf.uni-lj.si>), ki poleg informacij o značilnostih virusnih hepatitisov, tveganju za okužbo in nasvetnika o varnem vedenju in preprečevanju okužbe vključuje tudi poseben vprašalnik, ki uporabnika popelje skozi dejavnike tveganja za okužbo in možne zdravstvene težave ter ga sproti izobražuje in ozavešča, na koncu pa mu glede na zatečeno stanje poda konkretne napotke: kam na testiranje in po pomoč, oziroma kako preprečevati okužbo.

## ZAKLJUČEK

Strategija Svetovne zdravstvene organizacije nam predstavlja možnost zajezitve virusnega hepatitisa kot javnozdravstvenega problema do leta 2030. Z raznolikimi aktivnostmi v smeri mikro-eliminacije virusnih hepatitisov v določenih skupinah bolnikov in čimprejšnjega odkrivanja in zdravljenja okuženih v preostali populaciji Slovenija predstavlja primer dobre prakse obvladovanja virusnih hepatitisov. Z okrepitevijo navedenih aktivnosti bi se lahko približali njegovi eliminaciji, vendar le ob pogoju, da bi izboljšali delež cepljenih in postopno odkrili in zdravili vse kronično okužene ter s preventivnimi ukrepi preprečili nove okužbe.

## LITERATURA

1. World Health Organization. Global Hepatitis Report, 2017 [citirano 2018 Oct 20]. Dostopno na: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255016/9789241565455-eng.pdf?sequence=1>
2. European Association for the Study of Liver. EASL 2017 Clinical practical guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2017; 67: 370–98.
3. European Association for the Study of the Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. *J Hepatol.* 2018; 69: 461–511.
4. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Hepatitis E virus infection. *J Hepatol.* 2018; 68: 1256–71.
5. Seme K, Kovanda A, Poljak M. Virusi hepatitisa. In: Poljak M, Petrovec M, eds. *Medicinska virologija*. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011. p. 75–109.
6. Matičič M. Virusni hepatitisi. In: Tomažič J, Strle F, eds. *Infekcijske bolezni*. 2 ed. Ljubljana: Združenje za infektologijo, SZD; 2017. p. 350–69.
7. Donnelly MC, Scobie L, Crossan CL, et al. Review article: hepatitis E – a concise review of virology, epidemiology, clinical presentation and therapy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017; 46: 126–41.
8. European Monitoring Centre for Drugs and Drugs Addiction. Country Drug Report 2018 [citirano 2018 Oct 20]. Dosegljivo na: [http://www.emcdda.europa.eu/countries/drug-reports/2018/slovenia\\_en](http://www.emcdda.europa.eu/countries/drug-reports/2018/slovenia_en).
9. Arends JE, Lieveld FI, Ahmad S, et al. New viral and immunological targets for hepatitis B treatment and cure: A review. *Infect Dis Ther.* 2017; 6: 461–76.
10. Matičič M, Baklan Z. Hepatitis C: splošne značilnosti, zunajetne manifestacije in nacionalne smernice njegovega obvladovanja. In: *Zbornik predavanj 21. Schrottovi dnevi*; 2018 Mar 16-17; Ljubljana, Slovenija. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2018. p. 357–65.
11. World Health Organization. Global Health Sector Strategy on Viral Hepatitis 2016–2021 [citirano 2018 Oct 20]. Dostopno na: [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA69/A69\\_32-en.pdf?ua=1](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA69/A69_32-en.pdf?ua=1).
12. Aghemo A, Dore GJ, Hatzakis A, Wedemeyer H, Razavi H. Estimating HCV disease burden - volume 3. *J Viral Hepat.* 2015; 22: 1–3.
13. Sibley A, Han KH, Abourached A, et al. The present and future disease burden of hepatitis C virus infections with today's treatment paradigm - volume 3. *J Viral Hepat.* 2015; 22: 21–41.
14. Alfaleh FZ, Nugrahini N, Matičič M, et al. Strategies to manage hepatitis C virus infection disease burden - volume 3. *J Viral Hepat.* 2015; 22: 42–65.
15. Matičič M, Brinovec V, Lešničar G, et al. Hepatitis C v Sloveniji. *ISIS.* 1999; 8: 49–51.
16. Seme K, Vrhovac M, Mocilnik T, et al. Hepatitis C virus genotypes in 1,504 patients in Slovenia, 1993–2007. *J Med Virol.* 2009; 8: 634–9.
17. Gregorčič S. Opredelevitev demografskih, epidemioloških in viroloških značilnosti pri na virus hepatitisa C pozitivnih osebah v Sloveniji v obdobju 2008–2014 [magistrsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2016.
18. Kmet Lunaček N. Epidemiološke, virološke in klinične značilnosti bolnikov s kronično okužbo z virusom hepatitisa B v Sloveniji [doktorska disertacija]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2017.
19. Nacionalni inštitut za javno zdravje Republike Slovenije. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2016. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje; 2017. p. 67.
20. Matičič M, Poljak M. Slovenske nacionalne usmeritve za preprečevanje reaktivacije hepatitisa B pri bolnikih, ki potrebujejo imunosupresivno zdravljenje. *Zdrav Vestn* 2010; 79: 599–608.
21. Lazarus JV, Safreed-Harmon K, Thursz MR, et al. The micro-elimination approach to eliminating hepatitis C: Strategic and operational considerations. *Semin Liver Dis.* 2018; 38: 181–92.
22. Maticic M, Lekše A, Kozinc M, et al. Micro-elimination of hepatitis C among patients with congenital bleeding disorders in Slovenia. *J Hepatol.* 2018; 68: 193–4.
23. Matičič M, Kastelic A. Nacionalne usmeritve obvladovanja okužbe z virusom hepatitisa C pri uživalcih drog v Sloveniji. *Zdr Vestn.* 2009; 78: 529–39.
24. Matičič M. A national multidisciplinary healthcare network for treatment of hepatitis C in people who inject drugs in Slovenia. *BMC Infect Dis.* 2014; 14: S6.

Julija Germ<sup>1</sup>, Mateja Pirš<sup>2</sup>

# Odpornost bakterij proti kolistinu

## *Resistance to Colistin*

### IZVLEČEK

---

KLJUČNE BESEDE: kolistin, polimiksini, odpornost proti antibiotikom, *mcr* geni, mikrodilucija, Eno zdravje, presejalno testiranje.

Pojav odpornosti bakterij proti kolistinu je postala porajajoč javnozdravstveni problem. Kolistin se v humani medicini uporablja predvsem za zdravljenje bolnikov, ki so okuženi z večkratno odpornimi po Gramu negativnimi bacili (VOB GNB), in pri bolnikih s cistično fibrozo, zato so podatki o odpornosti večinoma omejeni na podatke o odpornosti pri VOB GNB. Odpornost proti kolistinu je večinoma posledica kromosomsko kodiranih mutacij, ki vodijo v spremembo strukture lipopolisaharida, konec leta 2015 pa je bila odkrita plazmidno posredovana odpornost proti kolistinu (geni *mcr*) pri izolatih *Escherichia coli* iz rejnih živali, kasneje pa tudi med humanimi GNB. Grožnja predstavlja predvsem sočasna odpornost proti kolistinu in karbapenemom in drugim betalaktamskih antibiotikom, saj bi se lahko zgodilo, da ostanemo brez učinkovite antibiotične terapije za zdravljenje okužb z VOB GNB. Posebej je zaskrbljujoča možnost vnosa plazmidno posredovane odpornosti proti kolistinu na VOB GNB izolate. Do selekcijskega pritiska zaradi uporabe kolistina prihaja tako v humani kot tudi v veterinarski medicini ter pri pridelavi hrani, zato je pristop t. i. »Eno zdravje« tako pomemben. Potrebno je zmanjševanje antibiotičnega bremena in sistematično spremljanje pojavljanja odpornosti, zlasti njene plazmidno kodirane oblike, da bi lahko ustrezno ukrepali in upočasnili širjenje odpornosti ter preprečevali izbruhe.

### ABSTRACT

---

KEY WORDS: colistin, polymyxin, resistance to antibiotics, *mcr* genes, microdilution, One Health, surveillance

The emergence of bacterial resistance to colistin has become an emerging public health problem. As colistin is most frequently used to treat patients infected with extensively drug resistant Gram-negative bacilli (XDR GNB) and patients with cystic fibrosis, the data on resistance is mainly limited to data on resistance in XDR GNB. Colistin resistance is most frequently the result of chromosomal mutations that lead to structural changes of the lipopolysaccharide, however, at the end of 2015 a novel plasmid mediated colistin resistance (*mcr* genes) was identified for the first time in a livestock associated *Escherichia*

<sup>1</sup> Asist. Julija Germ, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana, julija.germ@mf.uni-lj.si

<sup>2</sup> Doc. dr. Mateja Pirš, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana, mateja.pirs@mf.uni-lj.si

*coli* isolates, and later such isolates were also found among human GNB. Combined resistance to colistin, carbapenem and other betalactam antibiotics presents a threat as it could lead to a lack of an effective treatment for infections with XDR GNB. Especially worrying is the possibility of transfer of plasmid mediated resistance to colistin to XDR GNB isolates. GNB are subjected to selective pressure in human and veterinarian medicine as well as in food processing, underscoring the need for the »One Health« approach. The reduction of the antibiotic burden and systematic resistance surveillance, in particularly its plasmid mediated form, are necessary for the appropriate action to reduce the spread of colistin resistance and to prevent outbreaks.

## UVOD

Antibiotik kolistin (imenovan je tudi polimiksin E) uvrščamo v skupino polimiksin-skkih antibiotikov, v humani medicini uporabljamo tudi polimiksin B. Kolistin je po zgradbi kationski ciklični polipeptid, ki je učinkovit proti številnim po Gramu negativnim bacilom (GNB). V medicini so ga pričeli uporabljati v 50-ih letih prejšnjega stoletja, vendar so zaradi neželenih učinkov (predvsem nefro- in nevrotoksičnosti) ob zdravljenju z visokimi odmerki bolnike pričeli zdraviti z novejšimi in tudi bolj učinkovitimi antibiotiki. Kolistin se dolga leta v humani medicini skorajda ni uporabljal (razen izjem, npr. bolniki s cistično fibrozo), ostal pa je v uporabi predvsem v veterinarski medicini (1). V humano medicino se je začel vračati predvsem zaradi širjenja večkratno odpornih GNB (VOB-GNB).

Kolistin je v Evropski uniji za klinično uporabo na voljo v dveh oblikah, in sicer kot kolistinijev sulfat in kot neaktivno predzdravilo natrijev kolistimetat (NKM) (1, 2). Namenjena sta zdravljenju resnih, življenjsko nevarnih okužb z VOB-GNB, predvsem proti karbapenemom odpornimi enterobakterijami (angl. *carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*, CRE), proti karbapenemom odpornim *Acinetobacter baumannii*, (angl. *carbapenem-resistant A. baumannii*, CRAB) in proti betalaktamskim antibiotikom odpornemu *Pseudomonas aeruginosa* (CRPs) (3). Uporablja se brez starostnih omejitev, vendar so podatki za nekatere skupine bolnikov pomanjkljivi

(bolniki z ledvično ali jetrno okvaro, otroci) (2). Kolistinijev sulfat se lahko uporablja peroralno za dekontaminacijo črevesja (iz prebavil se skoraj ne resorbira) in topikalno pri nekaterih bakterijskih okužbah kože (okužene rane, opekline idr.), vnetju očesne veznice in sluhovoda (2). Za zdravljenje sistemskih okužb se uporablja NKM, ki je manj toksično predzdravilo kolistina in z manj neželenimi učinki. Namenjen je zdravljenju v intravenski in intramuskularni obliki, v obliki inhalacij pa ga uporabljamo za zdravljenje kroničnih pljučnih okužb, ki jih povzroča *P. aeruginosa*, pri bolnikih s cistično fibrozo (2).

## MEHANIZEM DELOVANJA KOLISTINA

Polimiksinski antibiotiki delujejo na zunanjo membrano po Gramu negativnih bakterij. Znano je, da je glavna tarča lipopolisaharid, vendar natančen mehanizem delovanja še ni razjasnjen. Zaradi elektrostatične interakcije pozitivno nabitega kolistina s fosfatnimi skupinami negativno nabitega lipida A, ki je del lipopolisaharida, se divalentni kationi ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) umaknejo. To vodi v destabilizacijo lipopolisaharida s posledično povečano permeabilnostjo celične membrane, kar vodi do celične smrti. Polimiksini se lahko vežejo tudi na lipid A in nevtralizirajo njegov endotoksični učinek. Prav tako so sposobni inhibirati nekatere življenjsko pomembne respiratorne encime v notranji bakterijski membrani (1).

## SPEKTER DELOVANJA KOLISTINA

Polimiksini imajo od koncentracije odvisen baktericidni učinek (2). Spekter delovanja je ozek; učinkoviti so proti številnim po Gramu negativnim bakterijam, predvsem proti večini bakterij iz družine enterobakterij (*Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp. in *Shigella* spp.). Proti rodu Proteae (*Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp.) ne učinkujejo, saj so leti proti polimiksinom naravno odporni. Aktivni so tudi proti nefermentativnim po Gramu negativnim bakterijam, kot so *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Stenotrophomonas maltophilia*. Ne delujejo proti po Gramu negativnim kokom (npr. *Neisseria* spp.), po Gramu pozitivnim bakterijam, anaerobnim bakterijam, parazitom in glivam. Naravna oziroma intrinzična odpornost proti polimiksinom je opisana tudi pri *Burkholderia mallei* in *B. cepacia*, *Chromobacterium* spp., *Edwardsiella* spp., *Brucella* spp., *Legionella* spp., *Campylobacter* spp., *Vibrio cholerae* in *Hafnia alvei* (1).

## MEHANIZMI ODPORNOSTI PROTI KOLISTINU

### Naravna odpornost proti kolistinu

Mehanizmi odpornosti proti kolistinu niso docela pojasnjeni. Bakterijske vrste, ki so proti kolistinu naravno odporne (npr. *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*), imajo zaradi dodanih kationskih skupin (npr. fosfoetanolamin) takšno konformacijo lipopolisaharida, da ima ta zmanjšano afiniteto do kolistina (1).

### Pridobljena odpornost proti kolistinu

Pridobljena odpornosti proti kolistinu je bila opisana pri številnih enterobakterijah (*Klebsiella* spp., *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp.), pa tudi pri nefermentativnih

po Gramu negativnih bakterijah, kot sta *A. baumannii* in *P. aeruginosa*. Najpogostejši vzrok za odpornost proti kolistinu je sprememba v sestavi lipopolisaharida zaradi substitucije ali dodajanja kationskih skupin. Gre za podoben mehanizem kot v primerih naravne odpornosti proti kolistinu, v samo dodajanje kationske skupine pa so vpleteni številni geni in operoni, med katerimi nekateri neposredno vplivajo na lipopolisaharid, nekateri pa posredno, preko regulatornih sistemov (npr. geni iz sistema PmrAB ali PhoPQ ali njihovi regulatorni geni npr. *mgrB*, *crrAB*). Za zdaj se večji del odpornosti proti kolistinu razvije kot posledica prilagoditvenih mutacij kromosomskih genov. Tovrstna odpornost je pogosto povezana s predhodno izpostavitvijo kolistinu, saj med uporabo kolistina lahko pride do selekcije odpornih sevov (1).

Leta 2015 je bila prvič odkrita plazmidno kodirana odpornost preko gena *mcr-1* z zapisom za protein MCR-1 (fosfoetanolamin transferaza), ki doda fosfoetanolamin na lipid A (podobno kot nekatere kromosomsko kodirane oblike odpornosti). Dosedaj je bilo odkritih še več *mcr* genov. Zaradi dodatka fosfoetanolamina postane lipopolisaharid bolj kationski (1, 4). Tovrstna oblika odpornosti predstavlja zelo zaskrbljujoč pojav, saj lahko pride do horizontalnega širjenja plazmida in prenosa na ekstremno odporne GNB (1). Izsledki genomske analize nakazujejo, da gena *mcr-1* in *mcr-2* najverjetneje izvirata iz bakterij rodu *Moraxella* (5). Primarno najdemo plazmidno zapisane gene *mcr* pri enterobakterijah, prisotnost gena *mcr-5* je bil do sedaj najden na zgolj enem izolatu *Pseudomonas aeruginosa*, od genov *mcr* pri enterobakterijah pa se je razlikoval v tem, da je bil vgrajen v bakterijski kromosom (1, 6).



## PORABA KOLISTINA

### Poraba v humani medicini

Kolistin je prišel v klinično uporabo v humani medicini po 2. svetovni vojni, uporabljal se je predvsem za zdravljenje okužb prebavnega trakta, sečil, pa tudi za dekontaminacijo črevesja. Kot topikalni antibiotik se je uporabljal tudi za zdravljenje okužb oči in ušes. Zaradi njegove toksičnosti so ga od 70. let dalje postopoma nadomestili novejši, bolj učinkoviti in manj toksični antibiotiki, kot so betalaktami, aminoglikozidi in fluorokinoloni. Zaradi čedalje pogostejšega pojavljanja ekstremno odpornih GNB od konca 90. let dalje (predvsem CRE, CRAB in CRPs), postaja kolistin ponovno zanimiv za zdravljenje bolnikov, in sicer najpogosteje kot zadnja terapevtska možnost, saj imamo za zdravljenje resnih okužb, ki jih povzročajo VOB-GNB, na voljo vedno manjše število antibiotikov (7).

Poraba kolistina po podatkih Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. *European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) v Evropi narašča, še posebej v državah z visoko prevalenco ekstremno odpornih GNB (7). Po podatkih ESAC-Net je trend porabe polimiksinov (ATC skupina J01XB) v bolnišničnem sektorju v Sloveniji od leta 1997 do 2017 narasel iz 0,0000 na 0,0062 DDD (dnevno definirani odmerek, angl. *daily defined dose/100 prebivalcev/na dan*) (8).

### Poraba v veterinarski medicini in pridelavi hrane

V veterinarski medicini se je poraba kolistina v desetletjih ohranila, v Evropi je na petem mestu (7,0 %) najbolj prodajanih antimikrobnih sredstev za rejne živali, takoj za tetraciklini, penicilini, sulfonamidi in makrolidi. Kolistin se živalim največkrat aplicira v obliki praškov in oralnih raztopin skupaj s hrano ali vodo. Običajno se ga

uporablja za zdravljenje okužb gastrointestinalnega trakta z *E. coli* in *Salmonella* spp. pri prašičih in perutnini. Razlike v porabi med državami znotraj Evropske unije so precejšnje, največji celokupni porabniki kolistina v Evropi sta Španija in Italija. V Sloveniji je delež porabe kolistina v primerjavi z večino EU držav nizek in znaša samo 0,2 % antimikrobnih sredstev, ki se jih porabi za rejne živali (9).

Polimiksine se lahko uporablja tudi kot rastne promotorje oz. spodbujevalce rasti. V EU je uporaba antibiotikov kot rastnih promotorjev prepovedana že od leta 2006 (v Sloveniji so bili prepovedani še pred vstopom v EU), v številnih predelih sveta pa se v ta namen še vedno uporabljajo, predvsem pri mladih prašičih, katerih bolezni bi privedle do velikih ekonomskih izgub (9, 10).

### TESTIRANJE OBČUTLJIVOSTI BAKTERIJ ZA KOLISTIN

Testiranje protimikrobne občutljivosti za kolistin je zahtevno. Kolistin zaradi svoje velikosti in kationskih značilnosti slabo difundira v agar, zato so zaviralne cone pri difuzijskih metodah lahko navidezno manjše, kar lahko vodi v podcenjevanje odpornosti oz. je rezultat lažno občutljiv. Dodatno težavo lahko predstavlja pojav heterorezistence pri določenih bakterijskih vrstah (npr. *Enterobacter cloacae* complex) (1, 11). EUCAST (angl. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) je sicer že od prve objave tabel z interpretacijskimi kriteriji leta 2010 priporočal testiranje občutljivosti za kolistin z opredelitvijo minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), vendar se je v rutinski diagnostiki za opredelitev MIK zaradi svoje enostavnosti pogosto uporabljala komercialna gradient difuzijska metoda. Ob vedno pogostejši uporabi kolistina v humani medicini so ugotovili, da so vse metode, ki vključujejo difuzijo v agarju, neprimerne (problematične so tudi avtomatizirane

metode za določanje občutljivosti za antibiotike npr. Vitek2 in Phoenix), zato sta CLSI (angl. *The Clinical & Laboratory Standards Institute*) in EUCAST sredi leta 2016 izdala skupno priporočilo, da je edini primeren način določanja MIK z metodo mikrodilucije. Za določevanje MIK kolistina z mikrodilucijo se uporablja kationsko prilagojen Mueller-Hinton bujon (angl. *cation adjusted Mueller-Hinton broth*, CAMHB) in kolistinijev sulfat (ne predzdravilo NKM). Uporaba dodatkov, kot je polisorbit-80 ali druge površinsko aktivne snovi, so odsvetovane, mikrotitrne ploščice morajo biti izdelane iz neobdelanega polistirena (12).

## ODPORNOST PROTI KOLISTINU IN TRENUTNA EPIDEMIOLOŠKA SITUACIJA

### Odpornost med humanimi izolati

Zaradi omejene uporabe v humani medicini imamo omejene podatke o pojavnosti proti kolistinu odpornih izolatov, saj občutljivosti bakterij za kolistin večinoma sistematično ne opredeljujemo, razen v primeru osamitve pri subpopulacijah, kot so VOB-GNB (CRE, CRAb, CRPs), in pri bolnikih s cistično fibrozo.

Večino sistematično zbranih podatkov o občutljivosti za kolistin prihaja iz velikih študij, kot je npr. program SENTRY, v sklopu katerega se zbirajo bakterijski izolati iz različnih kliničnih kužnin z večine svetovnih območij. Število vključenih izolatov je sicer relativno majhno, vendar je metodološki pristop usklajen, saj so vsi izolati testirani centralno, z metodo mikrodilucije, in nam zato vseeno omogoča boljši vpogled v trenutno situacijo (13). Občutljivost za kolistin v splošni populaciji bakterij – ne glede na splošni rezistenčni profil – se zelo razlikuje med posameznimi vrstami. Po podatkih SENTRY iz leta 2017 je bila odpornost pri *E. coli* v svetovnem merilu 0,3 %, v Evropi 0,2 %, med *E. coli* - CRE pa 1,9 % (zajetih je bilo

le 52 izolatov). Pri *K. pneumoniae* je bila odpornost v svetovnem merilu 3,4 %, v Evropi 5,6 %, med *K. pneumoniae* - CRE pa 20,7 %. Pri *P. aeruginosa* je bila odpornost v svetovnem merilu 0,2 %, v Evropi pa 0,4 %. Pri *A. baumannii* kompleks je bila odpornost v svetovnem merilu 5,5 %, v Evropi pa 7,5 % (13).

V EU lahko delne podatke o občutljivosti za kolistin najdemo tudi med podatki EARS-Net, v sklopu katerega se zbirajo podatki o rutinsko opredeljeni občutljivosti invazivnih izolatov najpomembnejših bakterijskih vrst, vendar je tu stopnja odpornosti verjetno precenjena, saj večino podatkov izvira iz držav, v katerih so CRE endemske (Grčija, Italija). Tam se kolistin pogosto uporablja, vendar pa podatki o občutljivosti metodološko niso usklajeni (7). Podatki o občutljivosti za kolistin v EU v letu 2016 pri invazivnih izolatih *E. coli* so le sporadično poročani in jih zato niso vključili v poročilo. Pri invazivnih izolatih *K. pneumoniae* so na voljo podatki o občutljivosti za kolistin za 27,6 % vseh izolatov, med njimi jih je bilo 8,5 % odpornih, vendar ti podatki niso reprezentativni za celotno EU, stopnja odpornosti je verjetno precenjena. Pri invazivnih izolatih *P. aeruginosa* so na voljo podatki za 51,3 % vseh izolatov, odpornost proti kolistinu je bila redka, manj kot 1 %. Podobno so bili pri invazivnih izolatih *Acinetobacter* spp. na voljo podatki o občutljivosti za kolistin za 51,3 % vseh izolatov, med njimi jih je bilo 4,0 % odpornih (7).

Podatki o občutljivosti za kolistin so bolj sistematično oz. rutinsko zbrani predvsem za VOB subpopulacije. V sklopu evropske študije EUSCAPE so ugotovili, da je odpornost proti kolistinu med izolati *K. pneumoniae*, ki izloča karbapenemaze, precejšnja – evropsko povprečje je znašalo 28,3 %, v sosednji Italiji je znašala kar 40,1 %, najvišja pa je bila v Romuniji s 70,5 %. Izolatov *E. coli*, ki izloča karbapenemaze, je bilo malo, zato je delež odpornosti proti kolistinu manj poveden, znašal pa je 5,3 % (14). Med humani-

mi VOB GNB je odpornost proti kolistinu večinoma posledica kromosomskih mutacij. Prevalenca tovrstnih izolatov je v evropskih državah različna, vendar v splošnem opažajo poraščanje (1). V nekaterih državah poročajo o širjenju in bolnišničnih izbruhih proti kolistinu odpornih VOB GNB. Tako o bolnišničnih izbruhih, povzročenih s *K. pneumoniae* - CRE (večinoma tudi s karbapenemazo) s kromosomsko kodirano odpornostjo proti kolistinu, poročajo iz sosednje Italije (15). V Grčiji so leta 2004 opažali 3,5 % odpornost proti kolistinu med *K. pneumoniae*, ki so izločale karbapenemaze, leta 2010 pa kar 20,8 % (16). S premestitvami bolnikov iz tujine lahko pride do vnosa uspešnih bolnišničnih VOB GNB tudi druge bolnišnice.

Odpornost proti kolistinu predstavlja pomemben porajajoč javnozdravstveni problem, zato je v ECDC letu 2017 začel s pripravo na študijo, v sklopu katere se bo strukturirano spremljalo odpornost proti kolistinu pri CRE v Evropski uniji (17).

## Odpornost med živalskimi izolati

Kolistin se v veterinarski medicini široko uporablja, vendar za zdaj ostaja stopnja odpornosti pri *E.coli* in *Salmonella* spp., osamljeni pri zdravih živalih v sklopu sistematičnega monitoringa, pod 1,0 %. Monitoring obsega fenotipsko testiranje in sistematičnih podatkov o prevalenci *mcr* genov v EU še ni na voljo (10, 18, 19).

## Dejavniki tveganja za razvoj odpornosti proti kolistinu

Uporaba kolistina je znan neodvisni dejavnik tveganja za pojav odpornosti proti kolistinu (1, 20). V preteklosti so študije pokazale, da se je povečal delež proti kolistinu odpornih *K. pneumoniae* - ESBL pri bolnikih, ki so dobivali kolistin zaradi selektivne dekontaminacije črevesa (21). Izkazalo se je, da je neprimerno zdravljenje s kolistinom – uporaba prenizkih odmerkov ali v dolgotrajni monoterapiji – pri-

speva k selekciji proti kolistinu odpornih izolatov (22).

Sočasno moramo upoštevati tudi selekcijski pritisk zaradi uporabe kolistina v veterinarski medicini in predvsem pri pridelavi hrane ter možnost prenosa proti kolistinu odpornih sevov iz živinoreje in pridelovalne industrije (10, 23).

## Plazmidno kodirana odpornost proti kolistinu

Leta 2015 so iz Kitajske prvič poročali o sevih s plazmidno posredovano odpornostjo proti kolistinu (gen *mcr-1*), do danes pa so o *mcr* pozitivnih humanih in živalskih sevih poročali že z vseh kontinentov, v naši okolici pa iz Italije, Avstrije in Madžarske (1–8, 24).

Kljub temu, da je bil gen *mcr* prvič odkrit leta 2015, se je izkazalo, da ne gre za nov pojav. Z retrogradnim pregledom arhivskih zbirk na Kitajskem so ugotovili prisotnost gena *mcr-1* pri izolatih *E. coli* rejnih živali že iz 80-ih let prejšnjega stoletja med živalskimi izolati (25). Številne študije so prav tako pokazale prisotnost plazmidno kodirane odpornosti proti kolistinu, tako med trenutnimi in arhivskimi izolati rejnih živali kot tudi med humanimi izolati v številnih drugih državah po vsem svetu. Dokazan je bil v vrstah *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Shigella*, *Salmonella* in *Enterobacter* spp. (1). Zaradi množične rabe kolistina v veterini ter posledično selekcijskega pritiska se je pojavila hipoteza, da predstavljajo izvor sevov z geni *mcr-1* živali predvsem prašiči in govedo. Na to nakazujejo številne *mcr-1* pozitivne enterobakterije živalskega izvora (23).

Glede na trenutno dostopne podatke v prevalenci enterobakterij s plazmidno zapisano odpornostjo proti kolistinu obstajajo precejšnje razlike, vendar poročilo ECDC kaže celokupno nizko prevalenco odpornosti (pod 1,5 %) med izolati *E. coli* in *Salmonella* sp. (večinoma pri *S. enteritidis*) (19). Čeprav je gen *mcr-1* prisoten v okolju že ne-

kaj desetletij, se odpornosti proti kolistinu intenzivneje posvečamo zadnja leta, saj kolistin ponovno postaja zanimiv antibiotik za zdravljenje okužb, ki jih povzročajo VOB GNB. Zaskrbljujoča je zlasti možnost prenosa plazmida z zapisom za MCR-1 na VOB GNB. Sočasna prisotnost gena *mcr-1* v sevu VOB zaenkrat predstavlja sporadičen pojav, o katerem so že poročali predvsem iz ZDA, vendar obstaja kot realna možnost predvsem v državah z visoko prevalenco VOB GNB, kjer je potreba po zdravljenju s kolistinom velika (1, 15, 26, 26–28).

## Odpornost proti kolistinu v Sloveniji

Zaradi omejene uporabe v humani medicini imamo omejene podatke o pojavnosti proti kolistinu odpornih izolatov v Sloveniji, saj občutljivosti bakterij za kolistin rutinsko ne opredeljujemo, razen v primeru osamitve določenih večkratno odpornih bakterij (CRE, CRAB, CRPs) in pri bolnikih s cistično fibrozo, oziroma se testirajo tekom študij. Preliminarni podatki naše raziskovalne skupine kažejo, da odpornost proti kolistinu med izolati *E. coli* leta 2017 znaša 1,4 %, višja pa je med izolati *K. pneumoniae*, kjer znaša 6,8 % (29). Pri VOB GNB je znašala v letu 2015 skupna odpornost proti kolistinu 4,7 %, pri *E. coli* CRE nismo našli proti kolistinu odpornih izolatov, višja pa je bila pri *K. pneumoniae* CRE 8,8 %; pri *P. aeruginosa* CRPs je znašala 6,1 %, pri *A. baumannii* CRAB pa je 2,4 %. Število izolatov VOB GNB je bilo relativno majhno, prevalenca odpornosti proti kolistinu med VOB GNB pa je odvisna od trenutno krožečih klonov in morebitnih bolnišničnih izbruhov (30).

## Kako upočasnimo širjenje odpornosti proti kolistinu?

Za preprečevanje širjenja je ključnega pomena spremljanje dinamike prevalence odpornosti proti kolistinu, tako pri GNB

nasploh kot tudi pri VOB GNB, ter nadzorovana in preiščljena uporaba v humani in veterinarski medicini in pri proizvodnji hrane, torej pristop t. i. »Eno zdravje«.

Med ključnimi ukrepi za upočasnitev širjenja odpornosti proti kolistinu navajajo njegovo nadzorovano uporabo v bolnišnicah, vendar se v humani medicini uporablja predvsem za zdravljenje okužb z VOB GNB ter pri bolnikih s cistično fibrozo. Čeprav je v slovenskih bolnišnicah poraba kolistina v porastu, se uporablja predvsem pri subpopulacijah bolnikov, torej pri okužbah z VOB GNB, in pri bolnikih s cistično fibrozo (8).

Bistveno bolj problematičen je lahko problem širjenja proti kolistinu odpornih VOB GNB v bolnišnicah. Zaenkrat ni jasnih priporočil, kako postopati v primeru, ko pri bolniku naključno ugotovimo, da je okužen ali koloniziran z izolatom, ki je občutljiv za druge skupine antibiotikov in hkrati odporen proti kolistinu, če je le-ta posledica prisotnosti gena *mcr* (31). V slovenskih bolnišnicah so priporočila glede ukrepov v sklopu bolnišnične higiene pri bolnikih, ki so okuženi ali kolonizirani z VOB-GNB, opredeljena (32). V kolikor odkrijemo, da je izolat CRE, CRAB ali CRPs odporen tudi proti kolistinu, je potrebno dosledno upoštevanje ukrepov s sklopu bolnišnične higijene ter posvet s kliničnim mikrobiologom ali infektologom, še posebej v primeru, če je posledica prisotnosti gena *mcr*. V nekaterih državah poročajo o širjenju in izbruhih proti kolistinu odpornih VOB GNB, s premestitvami bolnikov iz tujine pa lahko pride do vnosa takšnih uspešnih bolnišničnih izolatov tudi v naše bolnišnice (1, 28).

Med ukrepi na nivoju veterinarske medicine in zlasti pridelave hrane se najbolj izpostavlja nadzorovana raba kolistina. V EU je uporaba antibiotikov kot rastnih promotorjev prepovedana že več kot 10 let (v Sloveniji pa še veliko dlje), še vedno pa je dovoljena v večini drugih držav po vsem svetu. Predpisovanje antibiotikov živalim mora

biti omejeno na zdravljenje resnih primerov, predvsem živali s kliničnimi znaki bolezni, ne pa kot profilaktično zdravljenje (10, 18). Priporoča se tudi uporaba drugih pristopov za zmanjšano potrebo po zdravljenju z antibiotiki, predvsem preprečevanje bolezni s cepljenjem, in izboljšanjem pogojev za rejo živali. Omenja se tudi bolj sistematičen nadzor nad pojavljanjem odpornosti proti kolistinu ter možnost spremljanja pojavnosti genov *mcr* v človeških in živalskih izolatih (10, 18).

## ZAKLJUČEK

Pojav odpornosti bakterij proti kolistinu je postala porajajoč javnozdravstveni problem. Podatki o odpornosti bakterij proti kolistinu so večinoma omejeni na podatke o odpornosti pri VOB GNB. Potreba po sistematičnem spremljanju odpornosti proti kolistinu je prišla v ospredje zlasti z odkritjem plazmidno posredovane odpornosti proti kolistinu, saj odpornost pro-

ti kolistinu ni vezana z odpornostjo proti drugim antibiotikom. Grožnja predstavlja predvsem sočasna odpornost proti kolistinu in predvsem karbapenemom in drugim betalaktamskih antibiotikom širokega spektra, saj bi za zdravljenje okužb z VOB GNB ostali brez učinkovite antibiotične terapije. Posebej je zaskrbljujoča možnost vnosa plazmidno posredovane odpornosti proti kolistinu na VOB GNB izolate.

Proti kolistinu odporne izolate enterobakterij so izolirali iz rejnih živali, mesa, namenjenega za prehrano, okoljskih voda in humane medicine. Do selekcijskega pritiska zaradi uporabe kolistina prihaja tako v humani kot tudi v veterinarski medicini ter pri pridelavi hrane. Potrebno je zmanjševanje antibiotičnega bremena in sistematično spremljanje pojavljanja odpornosti, zlasti plazmidno kodirane oblike, da bi lahko ustrezno ukrepali in preprečevali izbruhe in širjenje odpornosti horizontalno in vertikalno.

## LITERATURA

1. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 2017; 30: 557–96.
2. Znanstveni zaključki in podlaga za ohranitev dovoljenj za promet zdravilom ali spremembo pogojev dovoljenj za promet z zdravilom, kot je ustrezno. Splošni povzetek znanstvenega vrednotenja zdravil, ki vsebujejo polimiksine, Priloga A in Priloga I), 29–30 [citirano 2018 Oct 20]. Dostopno na: [https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2014/20141216130250/anx\\_130250\\_sl.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2014/20141216130250/anx_130250_sl.pdf)
3. Štrumbelj I, Pirš M, Lejko-Zupanc T. Enterobakterije, *Acinetobacter baumannii* in *Pseudomonas aeruginosa* – označevanje večkratno odpornih izolatov in okrajšave preiskav nadzornih kužnin [citirano 2018 Oct 20]. Dostopno na: <http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz/dokumenti/lzd001Ozna-keokrajveinpreiskavenaodporneGNB.pdf>
4. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016; 16: 161–8.
5. Kieffer N, Nordmann P, Poirel L. Moraxella Species as Potential Sources of MCR-Like Polymyxin Resistance Determinants. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 24: 61.
6. Snesrud E, Maybank R, Kwak YI, et al. Chromosomally Encoded *mcr-5* in Colistin-Nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 27: 62.
7. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2016. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance network (EARS - Net). 2017. Stockholm, European Centre for Disease prevention and Control.
8. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC). Trend of the consumption of Polymyxins (ATC group J01XB) in the hospital sector in Slovenia from 1997 to 2015 [citirano 2018 Oct 20]. Dostopno na: <https://ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/surveillance-and-disease-data/database>

9. Sales of veterinary antimicrobial agents in 29 European countries in 2014. 2016. London, European Medicines Agency: 175 str.
10. Updated advice on the use of colistin products in animals 3 within the European Union: development of resistance 4 and possible impact on human and animal health. 2016. London, European Medicines Agency: 56 str.
11. Landman D, Salamera J, Quale J. Irreproducible and uninterpretable polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol*. 2013; 51: 4106–411.
12. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group [citirano 2018 Oct 20]. Dostopno na: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/General\\_documents/Recommendations\\_for\\_MIC\\_determination\\_of\\_colistin\\_March\\_2016.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf)
13. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program [citirano 2018 Oct 25]. Dostopno na: <https://sentry-mvp.jmilabs.com/app/sentry-public>
14. Grundmann H, Glasner C, Albiger B, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis*. 2017; 17: 153–63.
15. Giani T, Arena F, Vaggelli G, et al. Large nosocomial outbreak of colistin-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* traced to clonal expansion of a mgrB deletion mutant. *J Clin Microbiol*. 2015; 53: 3341–4.
16. Zagorianou A, Sianou E, Iosifidis E, et al. Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004–2010. *Euro Surveill*. 2012; 17: pii: 20088.
17. European Centre for Disease Control. ECDC study protocol for genomic-based surveillance of carbapenem-resistant and/or colistin-resistant *Enterobacteriaceae* at the EU level [citirano 2018 Oct 25]. Dostopno na: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/Protocol-genomic-surveillance-resistant-Enterobacteriaceae.pdf>
18. Catry B, Cavaleri M., Baptiste K., et al. Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *Int J Antimicrob Ag*. 2015; 46: 297–306.
19. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *EFSA Journal*. 2017; 15: 4694.
20. Kontopidou F, Plachouras D, Papadomichelakis E, et al. Colonization and infection by colistin-resistant Gram-negative bacteria in a cohort of critically ill patients. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17: E9–E11.
21. Halaby T, Al Naiemi N, Kluytmans J, et al. Emergence of colistin resistance in *Enterobacteriaceae* after the introduction of selective digestive tract decontamination in an intensive care unit. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57: 3224–9.
22. Durante-Mangoni E, Del Franco M, Andini R, et al. Emergence of colistin resistance without loss of fitness and virulence after prolonged colistin administration in a patient with extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015; 82: 222–6.
23. Poirel L, Nordmann P. Emerging plasmid-encoded colistin resistance: the animal world as the culprit? *J Antimicrob Chemother*. 2016; 71: 2326–7.
24. Hartl R, Kerschner H, Lepuschitz S, et al. Detection of the *mcr-1* gene in a multidrug-resistant *Escherichia coli* isolate from an Austrian patient. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61 (4). pii: e02623-16.
25. Shen Z, Wang Y, Shen Y, et al. Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. *Lancet Infect Dis*. 2016; 16: 293.
26. Beyrouthy R, Robin F, Lessene A, et al. MCR-1 and OXA-48 In Vivo Acquisition in KPC-Producing *Escherichia coli* after Colistin Treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 25: 61. pii: e02540-16.
27. Mediavilla JR, Patrawalla A, Chen L, et al. Colistin- and Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* harboring *mcr-1* and *blaNDM-5*, Causing a Complicated Urinary Tract Infection in a Patient from the United States. *MBio*. 2016; 30: 7. pii: e01191-16.
28. Skov RL, Monnet DL. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill*. 2016; 21: 30155–6.
29. Teržan T. Občutljivost slovenskih izolatov enterobakterij za kolistin. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta; 2018.

30. Ring T. Občutljivost slovenskih izolatov večkratno odpornih gramnegativnih bacilov za kolistin. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; 2018.
31. Nordmann P, Poirel L. Plasmid-mediated colistin resistance: an additional antibiotic resistance menace. *Clin Microbiol Infect.* 2016; 22: 398–400.
32. Strokovne podlage in smernice za obvladovanje in preprečevanje okužb [citirano 2018 Oct 25]. Dostopno na.: [http://www.mz.gov.si/si/delovna\\_podrocja\\_in\\_prioritete/zdravstveno\\_varstvo/kakovost\\_in\\_varnost/nacionalna\\_komisija\\_za\\_obvladovanje\\_bolnisnicnih\\_okuzb/strokovnjaki/](http://www.mz.gov.si/si/delovna_podrocja_in_prioritete/zdravstveno_varstvo/kakovost_in_varnost/nacionalna_komisija_za_obvladovanje_bolnisnicnih_okuzb/strokovnjaki/)

Urška Rahne Potokar<sup>1</sup>, Snežna Levičnik Stezinar<sup>2</sup>

## Pomen mikrobiologije v transfuzijski medicini

### *Role of Microbiology in Transfusion Medicine*

#### IZVLEČEK

---

KLJUČNE BESEDE: varnost transfuzije, s transfuzijo prenosljive okužbe, presejalno testiranje, porajajoče se nalezljive bolezni

Zagotavljanje varne preskrbe s krvjo je glavna naloga transfuzijske medicine. Kljub temu da je tveganje za prenos okužb s krvjo danes izjemno majhno, se moramo zavedati, da popolno varnost krvi kot zdravila ogroža morebitna vsebnost znanih ali neznanih patogenov. Obstoječe tveganje zmanjšujemo z nenehnim izboljševanjem in uvajanjem postopkov za učinkovit izbor dajalcev, za presejalno testiranje in patogensko inaktivacijo. Za uspešen nadzor in obvladovanje s transfuzijo prenosljivih okužb je potrebno spremljanje epidemioloških razmer, geografskega širjenja patogenov in pojavljanja novih oblik prenosov okužb. Pomembno je okrepiti zaznavanje in poročanje o okužbah, prenesenih s transfuzijo, v nacionalnem sistemu hemovigilance.

#### ABSTRACT

---

KEY WORDS: blood safety, transfusion transmitted infections, blood screening, emerging infections

Ensuring blood supply safety is the main objective of transfusion medicine. Although nowadays the risk of transfusion-transmitted infections is extremely low, we must be aware that the complete safety of blood as a medicinal product is threatened by possible presence of known or unknown pathogens. We are reducing the existing risk with continuous improvement and introduction of procedures for efficient donor selection, screening tests and pathogen inactivation. Successful monitoring and management of transfusion transmitted infections entails ongoing surveillance of epidemiological circumstances, geographical spread of pathogens and new ways of transmitting infections. It is important to enhance transfusion transmitted infection detection and reporting in the national hemovigilance system.

---

<sup>1</sup> Urška Rahne Potokar, dr. med., Zavod RS za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva ulica 6, 1000 Ljubljana; [urska.rahne@ztm.si](mailto:urska.rahne@ztm.si)

<sup>2</sup> Snežna Levičnik Stezinar, dr. med., Zavod RS za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva ulica 6, 1000 Ljubljana; [snezna.levicnik@ztm.si](mailto:snezna.levicnik@ztm.si)



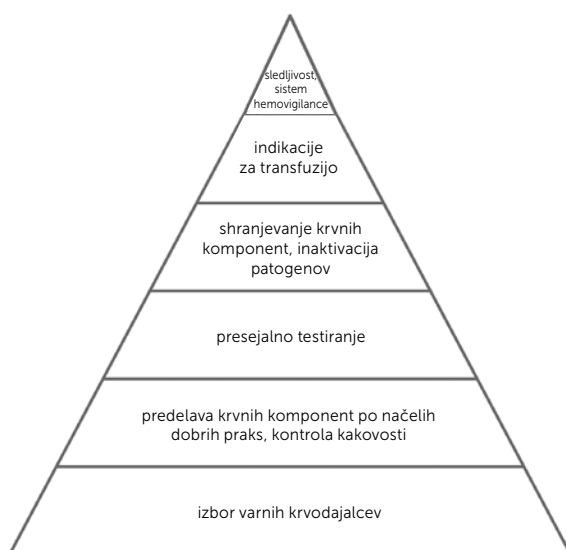
## UVOD

Zagotavljanje varne preskrbe s krvjo je glavna naloga transfuzijske medicine. Var- na transfuzija pomeni, da pri prejemniku ne povzroči neželenih reakcij oz. posledic. Na področju varnosti krvi in krvnih kom- ponent je bil v zadnjih desetletjih dosežen velik napredek. Danes je transfuzija krvi in krvnih komponent bolj varna kot kadar- koli v preteklosti. Področje varnosti, ki je bilo vedno v ospredju, je možnost prenosa povzročiteljev bolezni s transfuzijo. Uve- deni so številni ukrepi na področju izbire varnih krvodajalcev in presejalnega testi- ranja odvzete krvi. Kljub visoki stopnji var- nosti za nekatere povzročitelje bolezni, kot so virus hepatitisa B (HBV), virus hepatiti- sa C (HCV) in virus človeške imunske po- manjkljivosti (HIV), pa ničelnega tveganja ne bomo nikoli dosegli. Nove porajajoče se nalezljive bolezni so nenehna grožnja, ki terja vedno nove ukrepe na področju zago- tavljanja varne transfuzije (1, 2).

Zaradi zagotavljanja zadostne, pravo- časne in varne preskrbe s krvjo in krvni- mi komponentami morajo biti ukrepi izbi- re krvodajalcev in uvedba novih presejalnih

testov uravnoteženi, da zaradi prestrogih izključitvenih kriterijev ne izgubimo po- tencialnih dajalcev. Ob vse večji varnosti krvnih komponent za izbrane povzročite- lje bolezni pa v ospredje stopajo tudi dru- gi povzročitelji, kot so po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterije in paraziti.

Postopek inaktivacije patogenov v krv- nih komponentah je novejši pristop, ki do- polnjuje obstoječe ukrepe za preprečevanje prenosa okužbe s transfuzijo. S postop- ki inaktivacije lahko zmanjšamo preosta- lo tveganje za prenos okužbe z znanimi pa- togeni in učinkovito preprečujemo prenose povzročiteljev bolezni, še preden so na vo- ljo drugi ukrepi oz. še preden je povzročitelj bolezni prepoznan (1, 2). Področje zaznav- nja in poročanja o prenosu ali sumu prenosa okužbe s transfuzijo pokriva hemovigilan- ca. Sistem hemovigilance na mednarodnem in nacionalnem nivoju je pomemben pri odkrivanju novih tveganj za prenos okužb. Za zagotavljanje varne transfuzije pa mora transfuzijska služba imeti tudi vzpostav- ljen sistem zagotavljanja kakovosti in nad- zirati vse korake v transfuzijski verigi, od krvodajalca do pacienta (slika 1).

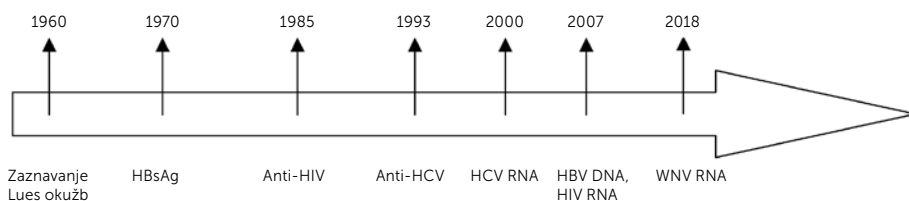


**Slika 1:** Ukrepi za zmanjševanje tveganja za prenos okužbe s transfuzijo.

## PRESEJALNO TESTIRANJE KRVODAJALCEV

V Sloveniji smo uvajali presejalno testiranje na posamezne povzročitelje, usklajeno z odkritjem povzročiteljev, dostopnostjo

presejalnih testov in v skladu s široko sprejetimi strokovnimi smernicami, t. j. po priporočilih in algoritmih, sprejetih na nacionalnih in mednarodnih ravneh strokovnih združenj in zakonodajalcev (slika 2) (3–5).



**Slika 2:** Uvedba posameznih presejalnih testov pri testiranju krvodajalcev v Sloveniji. HBsAg – površinski antigen virusa hepatitisa B; anti-HCV – protitelesa proti virusu hepatitisa C; anti-HIV – protitelesa proti virusu človeške imunske pomanjkljivosti; HCV-RNA – virusna RNA virusa hepatitisa C; HBV-DNA – virusna DNA virusa hepatitisa B; HIV-RNA – virusna RNA virusa človeške imunske pomanjkljivosti; WNV-RNA – virusna RNA virusa Zahodnega Nila.

Presejalno testiranje v transfuzijski medicini ima svoja pravila, ki so natančno predpisana in dobro opredeljena (3). Izbrani reagenti, s katerimi opravljamo presejalno testiranje, morajo biti visoko občutljivi in specifični. Proizvedeni morajo biti po zahtevah seznama A evropske direktive o diagnostičnih pripomočkih (6). Testiranje izvajamo po navodilih proizvajalca in predhodni validaciji reagentov kot postopkov na samem mestu izvedbe. Vsa leta smo sledili razvoju in uvajali najsodobnejše metode testiranja in uporabljali najbolj občutljivejše reagente. Presejalno testiranje na površinski antigen virusa hepatitisa B (HBsAg), protitelesa proti virusu hepatitisa C (anti-HCV), protitelesa proti virusu HIV in antigen p24 (anti-HIV + p24Ag) in protitelesa proti *Treponema pallidum* (anti-TP) izvajamo s kemiluminiscenčno imunsko metodo (angl. *CLIA-chemiluminiscent immunoassay*).

Leta 2000 smo za zagotavljanje še večje varnosti uvedli neposredno ugotavljanje virusne RNA virusa hepatitisa C (HCV) z metodo pomnoževanja nukleinskih kislin (angl. *nucleic acid amplification testing*, NAT).

V letu 2007 smo tovrstno presejalno testiranje razširili na zaznavanje še dveh virusov, HIV in virusa hepatitisa B.

Metoda presejalnega testiranja s tehnikami pomnoževanja nukleinskih kislin (NAT) je bila ob uvedbi leta 2000 verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) za določanje HCV-RNA. Testirali smo zlitje (angl. *pool*) vzorcev plazme 48, kasneje 24 krvodajalcev. Leta 2007 smo presejanje razširili na dva dodatna virusa, HIV in HBV. Pričeli smo z neposrednim sočasnim določanjem nukleinskih kislin virusov HIV, HBV in HCV v posameznih vzorcih krvi krvodajalcev z metodo TMA (angl. *transcription mediated amplification*; pomnoževanje, posredovano s prepisovanjem RNA).

S skrbno izvedenim presejalnim testiranjem smo v zadnjih desetletjih praktično onemogočili prenos s transfuzijo prenosljivih okužb predvsem hepatitisa B, hepatitisa C in HIV. V zadnjih dveh desetletjih zaznavamo trend zmanjševanja okužb med krvodajalci (tabela 1) (7).

Tabela 1: Pogostnost zaznavanja pozitivnih enot krvi označevalcev okužb v letih 2008–2017.

Označevalec okužbe	Celokupno število pozitivnih	Povprečno število pozitivnih enot/leto	Delež (%)	Prevalenca pojavnosti med odvzetimi enotami	Pogostost na 10 <sup>6</sup> testiranih enot krvi
HBsAg	83	8,3	0,009	1 : 11.132	90
anti-HCV	26	2,6	0,003	1 : 35.541	28
HIV Combo	12	1,2	0,0001	1 : 77.007	13
anti-TP	82	8,2	0,009	1 : 11.269	89
samo NAT POZ					
HBV DNA	38	3,8	0,004	1 : 24.318	41
HCV RNA	1	0,1	0,0001	1 : 924.087	1
HIV RNA	0	0	0	0	0

Celokupno število testiranih enot krvi: 924.087 (povprečno 92.400 odvzetih enot krvi pri 65.000 osebah)

## PRENOS CMV S KRVNIMI KOMPONENTAMI

Citomegalovirus (CMV) se lahko prenaša s transfuzijo krvnih komponent. Virus se v latentni fazi v periferni krvi nahaja predvsem v monocitih. Preprečevanje prenosa CMV s transfuzijo je pomembno pri bolnikih, katerih dojemljivost za okužbo je večja, oz. je verjetnost za težji potek večja. Najpomembnejši pristopi k preprečevanju so serološko testiranje krvodajalcev na prisotnost protiteles proti CMV (anti-CMV), odstranjevanje levkocitov v krvnih komponentah in inaktiviranje patogenov. Za bolnike s povečanim tveganjem izdajamo CMV seronegativne krvne komponente. Serološko testiranje specifičnih protiteles IgM in IgG anti-CMV se praviloma izvede ob naročilu krvne komponente (14).

## PORAJAJOČE SE OKUŽBE IN TRANSFUZIJSKA MEDICINA

Dejavniki tveganja za prenos porajajoče se okužbe s transfuzijo so prisotnost patogena v krvi krvodajalca v asimptomatskem obdobju okužbe, prenosljivost patogena po parenteralni poti in povzročanje simp-

tomatske oblike okužbe pri nekaterih ali vseh prejemnikih (8). Pri oceni tveganja za prenos okužbe s transfuzijo moramo oceniti pogostost prenosa okužbe na prejemnika, oceniti velikost in širjenje izbruha porajajoče se okužbe v populaciji, težo obolenja, ki ga povzroča, možnost zdravljenja okužbe ter javnozdravstveni pomen.

Med porajajoče se patogene, ki se lahko prenašajo s transfuzijo, spadajo arbovirusne okužbe (angl. *arthropod-borne*), ki jih prenašajo kronično okuženi komarji: virus Zahodnega Nila (angl. *West Nile Virus*, WNV), virus Denge (DENV), virus Chikungunya (CHIKV) in virus Zika (9).

Dokazane so tudi potransfuzijske okužbe, ki jih prenašajo klopi. V Združenih državah Amerike ugotavljajo porast okužb z babezijami (predvsem *Babesia microti*) in povečanje števila primerov potransfuzijske babezioze. Med slovenskimi bolniki s humano granulocitno anaplazmozo, ki je s klopi prenosljiva bolezen in jo povzroča *Anaplasma phagocitophilum*, je opisana tudi bolnica, pri kateri je bil dokazan prenos okužbe s transfuzijo eritrocitov (15, 16).

Preprečevanje prenosa malarije v neendemičnih državah temelji na odklonu krvo-

dajalcev, ki so potovali ali bivali na endemičnem področju. V neendemičnih državah, kjer bi odklon potnikov ali priseljencev povzročil preveliko izgubo krvodajalcev, izvajajo tudi serološke teste na malarijo.

## VIRUS ZAHODNEGA NILA IN ZAGOTAVLJANJE VARNOSTI KRVI V SLOVENIJI

Tveganje za prenos virusa Zahodnega Nila (WNV) iz okuženega krvodajalca na prejemnika transfuzije je v obdobju viremije, ki v večini primerov poteka brez simptomov. Viremija se pojavi en do tri dni po okužbi in lahko traja 11 dni. Okužen krvodajalec lahko daruje kri pred pojavom simptomov ali pa okužba ostane asimptomatska.

Ukrepi za preprečevanje prenosa WNV s transfuzijo so:

- spremljanje globalnega in regionalnega širjenja WNV in aktivno obveščanje vseh deležnikov v procesu zbiranja krvi;
- odklanjanje krvodajalcev po 24-urnem bivanju na prizadetem območju z WNV za 28 dni po vrnitvi, v skladu z dnevnimi in tedenskimi podatki o prizadetih območjih. Prizadeto območje (angl. *affected area*) je po definiciji Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje boleznih (ECDC) območje, kjer so potrjene avtohtone okužbe z WNV pri ljudeh;
- odklanjanje krvodajalcev, ki bi v zadnjih 14 dneh imeli simptome in znake obolenja podobnega gripi;
- vzpodbujanje krvodajalcev o naknadnem sporočanju transfuzijski službi, če bi prebolevali obolenje, podobno gripi, v obdobju 15 dni po darovanju krvi;
- presejalno testiranje odvzetih enot krvi na WNV RNA s tehniko NAT,
- postopki inaktivacije patogenov v krvnih komponentah.

Na podlagi epidemioloških podatkov širjenja WNV v državah Evropske unije (EU),

sosejnih držav EU in prijavljenih treh primerov nevroinvazivne okužbe pri ljudeh v treh statističnih regijah Republike Slovenije (osrednjeslovenska, savinjska in pomurska regija) smo v skladu z Načrtom pripravljenosti na pojav WNV v Sloveniji 20. septembra 2018 uvedli presejalno testiranje krvodajalcev na WNV (11–13). Odklanjanje krvodajalcev s prizadetih območij bi ogrozilo zadostno in pravočasno oskrbo slovenskih bolnikov s krvjo.

Testiranje se izvaja s tehniko pomnoževanja virusne nukleinske kisline (NAT) na posameznem odvzemu krvi, ker zaradi nizke viremije testiranje v zlitju ni zadostno občutljivo (9). Testiranje krvodajalcev na WNV RNA izvajajo tudi v prizadetih regijah sosejnih držav Italije, Hrvaške in Avstrije.

Presejalno testiranje na WNV se izvaja v sezoni aktivnosti komarjev, to je v obdobju od maja do novembra. Testiranje se uvede po potrebi oz. če se zazna pojav kroženja virusa v prizadeti regiji oz. na področju celotne države. Sprožilni dejavniki za uvedbo testiranja krvodajalcev v določeni regiji so prijavljena okužba z WNV pri človeku, dokaz kroženja virusa pri živalih (pticah, konjih), ugotovljena pri veterinarskem nadzoru ali dokaz okuženosti komarjev pri sistematičnem entomološkem nadzoru.

## HEPATITIS E

V razvitih evropskih državah je razširjen virus hepatitisa E (HEV) genotipa 3 in 4, ki je zoonoza. HEV okužbe z genotipi 1 in 2 so povezane s slabimi higienskimi razmerami v nerazvitih državah Azije, Afrike in centralne Amerike. Glavni rezervoar okužbe s HEV genotipoma 3 in 4 so prašiči, najdejo pa ga tudi pri nekaterih divjih živalih (divjih prašičih, srnjadi). Človek se lahko okuži z zaužitjem nezadostno toplotno obdelanega mesa in mesnih izdelkov, opisane pa so tudi okužbe z zaužitjem kontaminiranih školjk. Redek, a možen je tudi prenos s transfuzijo krvnih kompo-

ment. Dobro so dokumentirani posamezni primeri potransfuzijskega hepatitisa E v Franciji, Nemčiji, Španiji in Veliki Britaniji (17).

Seroprevalenca okužbe s HEV v Evropi se razlikuje med državami in tudi med posameznimi regijami znotraj držav. Povprečna prevalenca v Nemčiji in Franciji je okrog 20 %, v visoko endemičnih regijah južne Francije pa je serološko pozitivnih preko 86 % krvodajalcev. Številne evropske države so na podlagi podatkov seroprevalence in incidence HEV RNA uvedle presejalno testiranje krvodajalcev z metodo NAT na HEV RNA. Incidenca HEV RNA pozitivnih odvzemov krvi je v Franciji 1 : 2.218, Nemčiji 1 : 1.241, Nizozemskem 1 : 726, Veliki Britaniji 1 : 1.340–5.000 (17).

Potek okužbe s HEV genotipom 3 in 4 je večinoma asimptomatski, redkeje v obliki akutnega hepatitisa, pri bolnikih z oslajenim imunskim sistemom pa lahko vodi v kronično obliko hepatitisa. Prejemniki transfuzije so pogosto osebe z naravno ali

z zdravili povzročenim zmanjšanim imunskim odzivom, kot so npr. bolniki pa presaditvi krvotvornih matičnih celic, po presaditvi organov ali onkološki bolniki.

## ZAKLJUČEK

Zaveza strokovnjakov, ki se ukvarjamo s preskrbo s krvjo, je našim bolnikom, prejemnikom krvi ali njenih sestavin, zagotoviti varnost in učinkovitost krvi kot zdravila. Zaradi širjenja porajajočih se nalezljivih bolezni, ki so v večini primerov zoonoze, bo za zagotavljanje varne transfuzije v RS potrebno sodelovanje javnozdravstvene službe, veterinarske službe, strokovnjakov entomologije in regulatornih organov, ki si bodo sproti izmenjevali ključne informacije za obvladovanje porajajočih se nalezljivih bolezni. Poročila o prenosu okužb ali sumu prenosov ter njihove analize kažejo, da je transfuzija danes varna oblika zdravljenja, vredna zaupanja vseh uporabnikov v postopkih zdravljenja s krvjo.

## LITERATURA

1. Milojković A, Cukjati M. Inaktivacija patogenov v krvnih komponentah: tehnologije, trenutno v uporabi in trendi v prihodnosti. *Zdrav Vestn.* 2012; 81 Suppl 2: II: 281–90.
2. Bihl F, Castelli D, Marincola F, et al. Transfusion-transmitted infections. *Journal of Translational Medicine* [internet]. 2007 [citirano 2018 Nov 8]; 5: 25. Dosegljivo na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1904179/>
3. European Committee (Partial Agreement) on Blood Transfusion (CD-P-TS). Council of Europe. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. EDQM. 19th ed. Strasbourg; 2017.
4. Pravilnik o obveznem testiranju krvi in komponent krvi 2007. Uradni list RS št. 9/2007.
5. Pravilnik o dopolnitvah Pravilnika o obveznem testiranju krvi in komponent krvi 2018. Uradni list RS št. 62/2018.
6. Direktiva 98/79/ES Evropskega parlamenta in sveta z dne 27. oktobra 1998 o in vitro diagnostičnih medicinskih pripomočkih 1998. Uradni list RS št. 331/1998.
7. Levičnik Stezinar S, Rahne Potokar U. Presejanje krvodajalcev na označevalce okužb v Sloveniji v obdobju 1991–2010. *Zdrav Vestn.* 2012, 81 Suppl 2: II 257–73.
8. Dodd RY. Emerging pathogens and their implications for the blood supply and transfusion transmitted infections. *Br J Haematol.* 2012; 159: 135–142.
9. Stramer SL, Galel SA. Infectious Disease Screening. In: Fung MK, Eder AF, Spitalnik SL, Westhoff CM, eds. *Technical manual.* 19th ed. Bethesda: AABB; 2017. p. 161–205.
10. European Centre for Disease Prevention and Control. West Nile virus risk assessment tool [internet]. Stockholm: ECDC; 2013 [citirano 2018 Nov 8]. Dosegljivo na: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/west-nile-virus-risk-assessment-tool.pdf>
11. European Centre for Disease Prevention and Control. Weekly updates: 2018 West Nile fever transmission season [internet]. Stockholm: ECDC; 2018 [citirano 2018 Nov 8]. Dosegljivo na: <https://ecdc.europa.eu>

- pa.eu/en/west-nile-fever/surveillance-and-disease-data/disease-data-ecdc
12. European Centre for Disease Prevention and Control. Early large increase in West Nile virus infections in the EU/EEA and EU neighbouring countries [internet]. Stockholm: ECDC; 2018 [citirano 2018 Nov 8]. Dosegljivo na: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/west-nile-fever-rapid-risk-assessment%20-13-Aug-2018.pdf>
  13. Sočan M, Avsec D, Avšič Županc T, et al. Načrt pripravljenosti na pojav virusa Zahodnega Nila v Sloveniji [internet]. Nacionalni inštitut za javno zdravje; 2015 [citirano 2018 Nov 8]. Dosegljivo na: [http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/wnv\\_na-crt\\_pripravljenosti\\_na\\_pojav\\_virusa\\_zahodnega\\_nila\\_v\\_sloveniji\\_14.8.2017.pdf](http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/wnv_na-crt_pripravljenosti_na_pojav_virusa_zahodnega_nila_v_sloveniji_14.8.2017.pdf)
  14. Cukjati M, Rajič V, Paro Panjan D, et al. Smernice za preprečevanje prenosa CMV s transfuzijo krvnih komponent. Zdrav Vestn. 2013; 82: 367–77.
  15. Rojko T, Strašek Smrdel K, Avšič Županc T, et al. Humana granulocitna anaplazmoza – klinična slika in prikaz primerov. In: Beović B, Lejko Županc T, Tomažič J, eds. Infektološki simpozij; 2018, oktober; Ljubljana: Sekcija za protimikrobno zdravljenje SZD, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Kate-dra za infekcijske bolezni in epidemiologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani; 2018. p. 210–7.
  16. Jereb M, Pečaver B, Tomažič J, et al. Severe human granulocytic anaplasmosis transmitted by blood transfusion. Emerg Infect Dis 2012; 18 (8): 1354–7.
  17. Domanović D, Tedder R, Blümel J, et al. Hepatitis E and blood donation safety in selected European countries: a shift to screening? [internet]. Surosurveillance. 2016. [citirano 2018 Nov 8]. Dosegljivo na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28449730>



Helena Ribič<sup>1</sup>, Urška Dermota<sup>2</sup>, Iztok Štrumbelj<sup>3</sup>, Irena Grmek Košnik<sup>4</sup>, Ingrid Berce<sup>5</sup>, Tatjana Harlander<sup>6</sup>, Ljudmila Sarjanović<sup>7</sup>, Marica Lugovski<sup>8</sup>, Tjaša Žohar Čretnik<sup>9</sup>

## Občutljivost za antibiotike pri povzročiteljih nezapletenega cistitisa v Sloveniji

### *Antimicrobial Sensitivity of Bacteria, Causing Uncomplicated Cystitis in Slovenia*

#### IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: akutni nezapleteni cistitis, antibiotik, občutljivost, *Escherichia coli*, trimetoprim s sulfametoksazolom

IZHODIŠČA. Akutno nezapleteno vnetje sečnega mehurja, ki se pojavlja pri ženskah, starih od 18 do 65 let, brez dejavnikov za težji potek okužbe, je pogost razlog za predpisovanje antibiotikov v družinski medicini. Okužbo zdravimo praviloma izkustveno, za kar so potrebni nacionalni podatki o občutljivosti povzročiteljev. METODE. V prispevku obravnavamo rezultate dela raziskave, v kateri smo v času od 15. 9. 2017 do 31. 8. 2018 obravnavali 61 bolnic s sumom na akutni nezapleteni cistitis iz štirih regij Slovenije. Pri vseh bolnicah smo pregledali izpolnjene vprašalnike, ki so vključevali podatke o zdravljenju in opravili mikrobiološko preiskavo vzorca srednjega curka urina po standardnem postopku. REZULTATI. Rezultat mikrobiološke preiskave urina je bil pozitiven pri 45 bolnicah (73,8 %). Občutljivost najpogosteje ugotovljene bakterije *Escherichia coli* je bila dobra: delež za trimetoprim s sulfametoksazolom občutljivih sevov je bil 88,6 %, za nitrofurantoin in fosfomicin pa 100 %. Bolnice so bile najpogosteje zdravljene s trimetoprimom s sulfametoksazolom. ZAKLJUČKI. Obravnavani rezultati kažejo na dobro občutljivost povzročiteljev akutnega nezapletenega cistitisa v Sloveniji. Zaradi nizkega števila vključenih bolnic avtorji z raziskavo nadaljujejo. Rezultati bodo kliničnim zdravnikom v pomoč pri pripravi priporočil in pri zdravljenju okužb. Avtorji ocenjujejo, da raziskava pomembno prispeva k racionalni rabi antibiotikov v Sloveniji.

<sup>1</sup> Helena Ribič, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj, Nacionalni laboratorij za zdravje okolje in hrano, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj; helena.ribic@ntzoh.si

<sup>2</sup> Dr. Urška Dermota, univ. dipl. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj, Nacionalni laboratorij za zdravje okolje in hrano, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj

<sup>3</sup> Mag. Iztok Štrumbelj, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Murska Sobota, Nacionalni laboratorij za zdravje okolje in hrano, Ulica arhitekta Novaka 2b, 9000 Murska Sobota

<sup>4</sup> Doc. dr. Irena Grmek Košnik, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj, Nacionalni laboratorij za zdravje okolje in hrano, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj

<sup>5</sup> Ingrid Berce, dr. vet. med., spec. med. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Nova Gorica, Nacionalni laboratorij za zdravje okolje in hrano, Vipavska cesta 13, 5000 Nova Gorica

<sup>6</sup> Tatjana Harlander, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Novo mesto, Nacionalni laboratorij za zdravje okolje in hrano, Med vrti 5, 8000 Novo mesto

<sup>7</sup> Ljudmila Sarjanović, dr. med., spec. mikrobiol. s parazitologijo, Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Nova Gorica, Nacionalni laboratorij za zdravje okolje in hrano, Vipavska cesta 13, 5000 Nova Gorica

<sup>8</sup> Marica Lugovski, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Celje, Nacionalni laboratorij za zdravje okolje in hrano, Gregorčičeva ulica 5, 3000 Celje

<sup>9</sup> Mag. Tjaša Žohar Čretnik, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Celje, Nacionalni laboratorij za zdravje okolje in hrano, Gregorčičeva ulica 5, 3000 Celje



## ABSTRACT

KEY WORDS: acute uncomplicated cystitis, antibiotic, sensitivity, *Escherichia coli*, trimethoprim/sulfamethoxazole

**BACKGROUND.** An acute uncomplicated infection of the urinary bladder in women between the ages of 18 and 65 years without risk factors for a complicated infection is a frequent reason for prescribing antimicrobials in primary care practice. The infection is usually treated empirically which requires national data on pathogen susceptibility. **METHODS.** This paper presents results from a part of a research conducted between 15 September 2017 and 31 August 2018, which included 61 female patients with suspected acute uncomplicated cystitis from four regions of Slovenia. For all patients filled-in questionnaires containing treatment data were examined and a microbiological investigation of the voided urine sample was performed following standard procedure. **RESULTS.** The result of the microbiological investigation was positive in 45 patients (73.8%). Susceptibility of the most frequently isolated bacteria *Escherichia coli* to antimicrobials was high: susceptibility to trimethoprim/sulfamethoxazole was 88.6 %, and to nitrofurantoin and fosfomicin it was 100%. The most frequently prescribed treatment for patients was trimethoprim/sulfamethoxazole. **CONCLUSIONS.** The examined results indicate high rates of susceptibility of pathogens causing acute uncomplicated cystitis in Slovenia. Due to the low number of included patients the authors are continuing their research. The results will support clinicians in drawing up recommendations and in treating infections. The authors conclude this research is an important contribution to the rational use of antibiotics in Slovenia.

## IZHODIŠČA

Akutno nezapleteno vnetje sečnega mehurja (akutni nezapleteni cistitis, ANC) je pogost razlog za predpisovanje antibiotikov v družinski medicini. Gre za okužbo pri ženskah, starih od 18 do 65 let, ki nimajo dejavnikov tveganja za težji potek oz. zapleteno okužbo, kot so anatomske ali funkcionalne nepravilnosti sečil, nosečnost, kronične bolezni (npr. sladkorna bolezen) ali zdravljenje, ki vpliva na obrambno sposobnost organizma, predhoden poseg v sečila, urinski kateter, ponavljajoče okužbe idr. Glede na strokovne smernice ANC zdravimo izkušstveno, v Sloveniji sta priporočeni zdravili nitrofurantoin in fosfomicin (1). Po priporočilih iz leta 2013 in po ameriških priporočilih se lahko uporablja tudi trimetoprim s sulfametoksazolom (angl. *trimethoprim/sulfamethoxazole*, TMP/SMX) pod pogojem, da je delež odpornih sevov manjši od 20 % (2, 3).

Da lahko pripravimo smernice za zdravljenje ANC, je treba ugotoviti povzročitelje in njihovo občutljivost za antibiotike. Ker mikrobiološka diagnostika pri nezapletenih okužbah ni indicirana, podatkov o ANC v Sloveniji nimamo (4). Potrebne so usmerjene raziskave, ki so bile v številnih državah že izvedene, v Sloveniji pa po našem vedenju še ne (5–8). Rezultati raziskav v tujini kažejo na velike razlike med državami, zato je raziskavo treba izvesti v vsaki državi posebej in smernice za zdravljenje prilagoditi rezultatom.

V Centru za medicinsko mikrobiologijo Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) smo v letu 2016 pripravili protokol raziskave in v septembru 2017 začeli s pilotno raziskavo »Ugotavljanje povzročiteljev nezapletenih okužb sečil in občutljivosti za antibiotike v Sloveniji«. Vključeno je bilo manjše število zdravnikov

iz splošnih in družinskih ambulant iz novogoriške in gorenjske regije. V aprilu 2018 smo raziskavo razširili še v novomeško regijo in dva meseca kasneje tudi na celjsko regijo. V pričujočem prispevku prikazujemo rezultate preiskav, opravljenih v obdobju od 15. 9. 2017 do 31. 8. 2018. Za raziskavo smo pridobili pozitivno mnenje Komisije za medicinsko etiko Republike Slovenije (št. 0120-455/2016-2, KME 40/09/16).

## METODE

V prispevku prikazujemo rezultate mikrobioloških preiskav vzorcev seča bolnic, ki smo jih v štirih oddelkih Centra za medicinsko mikrobiologijo NLZOH v Novi Gorici, Kranju, Novem mestu in Celju opravili v obdobju od 15. 9. 2017 do 31. 8. 2018.

Bolnice, stare od 18 do izpolnjenih 65 let, z znaki ANC brez dejavnikov za zapleteno okužbo, so bile ob pregledu v ambulanti družinske medicine povabljeni v raziskavo. Sodelovalo je šest zdravstvenih domov (ZD) (ZD Nova Gorica, ZD Radovljica, ZD Tržič, ZD Kranj, ZD Trebnje, ZD Celje), Ambulanta splošne medicine Vitalija in Zasebni zdravstveni zavod RR. Za sodelovanje se je odločilo 61 bolnic, ki so podpisale soglasje in izpolnile vprašalnik, ki je vseboval demografske podatke, podatke o izključitvenih kriterijih ter znake in simptome okužbe. Zdravnik je vprašalnik dopolnil s podatki o kliničnem pregledu, predpisanem antibiotiku in z rezultati morebitnih biokemijskih laboratorijskih preiskav seča. Pred začetkom zdravljenja z antibiotikom so bolnice oddale vzorec srednjega curka seča po metodi čistelega mokrenja. Vzorce smo v mikrobioloških laboratorijih prejeli najkasneje v 24 urah po odvzemu in jih preiskovali z metodo semikvantitativne urinokulture po standardnem postopku, rezultate smo obravnavali v skladu z evropskimi smernicami (9, 10). Občutljivost za antibiotike smo ugotavljali z metodo difuzije antibiotika v agarju po smernicah

Evropskega odbora za testiranje protimikrobne občutljivosti (angl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST) (11, 12). Izvide smo takoj po zaključku preiskave poslali napotnemu zdravniku.

## REZULTATI

V času od 15. 9. 2017 do 31. 8. 2018 smo obravnavali 61 bolnic, ki so izpolnjevale pogoje za vključitev v raziskavo. Bolnice so bile stare od 18 do 65 let, povprečna starost je bila 43,4 let. V laboratoriju v Kranju smo obravnavali 40 bolnic, v Novi Gorici 9, v Celju 8 in v Novem mestu 4 bolnice. Rezultat mikrobiološke preiskave urina je bil v 45 primerih (73,8 %) pozitiven, v 2 primerih (3,3 %) kontaminacija (porasli so trije ali več različnih izolatov) in v 14 primerih (23 %) negativen. Med pozitivnimi vzorci je bil v 41 primerih (91,1 %) ugotovljen en bakterijski izolat in v štirih primerih (8,9 %) po dva.

Število in delež ugotovljenih povzročiteljev ANC prikazujemo v tabeli 1, občutljivost za antibiotike pa v tabelah 2 in 3. Občutljivost sevov *Escherichia coli* za TMP/SMX je bila 88,6 %, za nitrofurantoin in fosfomicin pa 100 %. Sevov enterobakterij z encimi beta-laktamazami razširjenega spektra (angl. *extended spectrum beta-lactamase*, ESBL) nismo ugotovili.

Vsi izolati *Staphylococcus saprophyticus* (skupaj pet izolatov) so bili občutljivi za vse testirane antibiotike: TMP/SMX, nitrofurantoin, norfloksacin, ciprofloksacin, cefoksitin, ampicilin, tetraciklin, linezolid in gentamicin. Vsi izolati *Streptococcus agalactiae* (skupaj trije izolati) so bili občutljivi za: TMP/SMX, nitrofurantoin, ampicilin, amoksicilin, tetraciklin in vankomicin, izolat *Enterococcus faecalis* je bil občutljiv za nitrofurantoin, norfloksacin, ciprofloksacin, ampicilin, amoksicilin in vankomicin. Med izolati *Klebsiella* spp. in *Proteus mirabilis* (skupaj pet) je bil delež občutljivih sevov: za TMP/SMX 80 %, za ciprofloksacin in norflo-

ksacin 60 %, za ampicilin in amoksicilin 40 %, za nitrofurantoin po smernicah EUCAST ni interpretacije, za ostale testirane antibiotike (amoksicilin s klavulansko kislino, cefadroksil, cefuroksim, cefiksim, cefotaksim, ceftazidim, ertapenem, imipenem, meropenem, gentamicin in piperacilin s tazobaktamom) pa so bili občutljivi vsi sevi.

Da bi ugotovili, kako učinkovit je posamezen antibiotik glede na vse možne izolate (občutljivost vseh izolatov skupaj za določen antibiotik), smo v tabeli 3 upoštevali prevalenco posamezne bakterijske vrste ali skupine med vsemi izolati in delež občutljivosti posamezne vrste ali skupine za določen antibiotik. Delež, ki ga k občutljivosti prispeva posamezna bakterijska vrsta, je zmnožek prevalence in deleža občutljivosti za antibiotik pri izolatih te vrste. Primer: delež *E. coli* med vsemi izolati v raziskavi je bil 0,71, občutljivost za nitrofurantoin 100 %; tako *E. coli* k občutljivosti

za nitrofurantoin prispeva zmnožek števil 0,71 in 100 %, torej 71 %. Pri antibiotikih, pri katerih je posamezna vrsta ali skupina primarno (naravno) odporna, smo navedli, da je delež občutljivih sevov enak nič. Po smernicah EUCAST je za fosfomicin, testiran z disk-difuzijsko metodo, navedena interpretacija rezultatov le za *E. coli*, zato fosfomicina v tabeli 3 ne navajamo (11, 12).

V tabeli 4 prikazujemo navzkrižno odpornost izolatov. Med 49 izolati jih je bilo 40 (81,6 %) občutljivih na vse testirane antibiotike. Devet izolatov (18,4 %) je bilo odpornih proti najmanj enemu antibiotiku. Vsi so bili odporni proti ampicilinu. Po smernicah EUCAST so ti sevi odporni tudi proti amoksicilinu (11, 12). Najbolj odporen je bil en izolat *E. coli*, in sicer proti ampicilinu, amoksicilinu, TMP/SMX, gentamicinu in vmesno občutljiv za ciprofloksacin. Ostalih osem izolatov je bilo odpornih proti najmanj enemu in največ trem testiranim antibiotikom.

**Tabela 1:** Število in prevalenca ugotovljenih bakterijskih izolatov iz vzorcev seča pri ženskah s sumom na akutni nezapleten cistitis.

Bakterija	Število	Prevalenca
<i>Escherichia coli</i>	35	0,71
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	5	0,10
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	0,06
<i>Proteus mirabilis</i>	3	0,06
<i>Klebsiella spp.</i>	2	0,04
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	0,02
Skupaj	49	1

**Tabela 2:** Občutljivost in odpornost izolatov *Escherichia coli* (35 izolatov) za antibiotike iz vzorcev seča pri ženskah s sumom na akutni nezapleteni cistitis. TMP/SMX – trimetoprim s sulfametoksazolom (angl. trimethoprim/sulfamethoxazole), EUCAST – Evropski odbor za testiranje protimikrobne občutljivosti (angl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*).

Antibiotik	Delež občutljivih izolatov (%)	Delež odpornih izolatov (%)
TMP/SMX	88,6	11,4
Nitrofurantoin	100	0
Fosfomicin	100	0

Norfloksacin	97,1	0
Ciprofloksacin	97,1	0
Ampicilin (in amoksicilin) <sup>a</sup>	82,9	17,1
Amoksicilin s klavulansko kislino <sup>b</sup>	100	0
Amoksicilin s klavulansko kislino <sup>c</sup>	100	0
Piperacilin s tazobaktamom	100	0
Cefadroksil	100	0
Cefuroksim	100	0
Cefotaksim	100	0
Ceftazidim	100	0
Cefepim	100	0
Imipenem	100	0
Gentamicin	97,1	2,9

<sup>a</sup> Po smernicah EUCAST rezultat za ampicilin velja tudi za amoksicilin.

<sup>b</sup> Interpretacija za sistemske okužbe.

<sup>c</sup> Interpretacija za nezapleteni cistitis.

**Tabela 3:** Občutljivost izolatov za antibiotike iz vzorcev seča pri ženskah s sumom na akutni nezapleteni cistitis. TMP/SMX – trimetoprim s sulfametoksazolom (angl. *trimethoprim/sulfamethoxazole*).

Bakterija/ antibiotik	Število izolatov	Prevalenca bakterijske vrste ali skupine	Delež (%) občutljivih sevov med vsemi izolati [delež občutljivih sevov med izolati iste vrste]						
			Nitrofurantoin	TMP/SMX	Ampicilin in amoksicilin	Cefadroksil	Cefiksim	Ciprofloksacin	Norfloksacin
<i>Escherichia coli</i>	35	0,71	71 [100]	63 [88,6]	59 [82,9]	71 [100]	71 [100]	69 [97,1]	69 [97,1]
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	5	0,10	10 [100]	10 [100]	10 [100]	10 [100]	10 [100]	10 [100]	10 [100]
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	0,06	6 [100]	6 [100]	6 [100]	6 [100]	6 [100]	0 [0]	0 [0]
<i>Proteus mirabilis</i> in <i>Klebsiella</i> spp.	5	0,10	0 [0]	8 [80]	4 [40]	10 [100]	10 [100]	6 [60]	6 [60]
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	0,02	2 [100]	0 [0]	2 [100]	0 [0]	0 [0]	2 [100]	2 [100]
<b>Skupaj</b>	<b>49</b>	<b>1</b>	<b>90</b>	<b>88</b>	<b>82</b>	<b>98</b>	<b>98</b>	<b>88</b>	<b>88</b>

**Tabela 4:** Rezistotipi proti najmanj enemu antibiotiku odpornih sevov *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* in *Klebsiella* spp. S – občutljiv (angl. *susceptible*), I – zmerno občutljiv (angl. *intermediate*), R – odporen (angl. *resistant*), TMP/SMX – trimetoprim s sulfametoksazolom (angl. *trimethoprim/sulfamethoxazole*).

Bakterija	Število izolatov	Ampicilin/amoksicilin	Ciprofloksacin	TMP/SMX	Gentamicin
<i>Escherichia coli</i>	1	R	I	R	R
<i>Proteus mirabilis</i>	1	R	R	R	S
<i>Escherichia coli</i>	3	R	S	R	S
<i>Escherichia coli</i>	2	R	S	S	S
<i>Klebsiella</i> spp.	2	R	S	S	S

Antibiotike, ki so jih zdravniki predpisali za zdravljenje v raziskavo vključenih bolnic, navajamo v tabeli 5. Bolnice so bile

najpogosteje zdravljene s TMP/SMX (56 %), sledili so nitrofurantoin, fosfomicin, ciprofloksacin in norfloksacin.

**Tabela 5:** Število in delež z določenim antibiotikom zdravljenih bolnic s sumom na akutni nezapleteni cistitis. TMP/SMX – trimetoprim s sulfametoksazolom (angl. *trimethoprim/sulfamethoxazole*).

Antibiotik	Število z antibiotikom zdravljenih bolnic	Delež z antibiotikom zdravljenih bolnic (%)
TMP/SMX	34	56 %
Nitrofurantoin	12	20 %
Fosfomicin	4	7 %
Ciprofloksacin	1	2 %
Norfloksacin	1	2 %
Ni podatka	9	15 %

## RAZPRAVA

Za ANC v povprečju zbolí vsaka druga ženska najmanj enkrat v življenju, nemaleokrat se okužba ponavlja (13–15). Zato je ANC pogost razlog za zdravljenje z antibiotikom v primarnem zdravstvu (14, 16). V Sloveniji sta za zdravljenje ANC priporočena nitrofurantoin in fosfomicin, TMP/SMX pa zaradi razmeroma velikega deleža odpornih sevov *E. coli* (več kot 20 %), ne (1–3). Priporočila temeljijo na podatkih o občutljivosti *E. coli* iz vseh kliničnih kužnin rednega dela mikrobioloških laboratorijev, ki se enkrat letno zbirajo in raziskujejo v okviru Slovenske komisije za smi-

selno porabo protimikrobnih zdravil (17). V Sloveniji podatkov o občutljivosti *E. coli* pri ANC do sedaj namreč ni bilo na voljo. Občasno so se zbirali podatki preiskovanja vzorcev seča, vendar so bili v raziskavah zajeti le rezultati preiskav iz rednega dela, ki vključujejo predvsem vzorce bolnikov z zapleteno okužbo zgornjih in spodnjih sečil, ali pa vzorce bolnikov s ponavljajočo okužbo (18–21). Občutljivost *E. coli* je bila v vseh teh raziskavah razmeroma majhna: po podatkih Slovenske komisije za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ) za leto 2016 je bila za TMP/SMX 70 % in za ciprofloksa-

cin 79,3 %. Izjema je bil nitrofurantoin, pri katerem je bil delež občutljivih sevov *E. coli* 99,1 % (17). Podobni so bili rezultati raziskav preiskav vzorcev seča. V raziskavi, opravljeni v letu 2016, so avtorji ugotovili, da je bil delež za TMP/SMX občutljivih sevov *E. coli* bolnikov obeh spolov v starostni skupini od 15 do 65 let 62,7 %, za ciprofloksacin 86,2 % in za nitrofurantoin 99,6 % (18). Ker je za zdravljenje ANC s TMP/SMX potrebno, da je delež odpornih sevov *E. coli* manjši od 20 %, je bila zaradi teh podatkov v Sloveniji uporabnost TMP/SMX pri ANC vprašljiva (1–3).

Glavni namen pričujoče raziskave je bil ugotoviti delež posameznih povzročiteljev ANC in njihove občutljivosti za antibiotike (22). V obdobju 11 mesecev in pol smo obravnavali 61 bolnic, ki so bile zaradi suma na ANC zdravljene z antibiotikom. Iz 45 (74 %) pozivnih vzorcev seča smo ugotovili 49 bakterijskih izolatov. Najpogosteje je bila ugotovljena bakterija *E. coli* (prevalenca 0,71), sledila je bakterija *S. saprophyticus* (0,10) in druge, kar je pričakovano glede na rezultate podobnih raziskav v drugih državah (6–9). V raziskavi ARESC, v kateri je sodelovalo devet evropskih držav in Brazilija, je bil v letu 2009 delež *E. coli* v Avstriji 68,1 %, v Italiji 72,6 %, na Madžarskem 78,8 %, v ostalih sodelujočih državah pa od 72,6 % do 83,8 %; v povprečju 76,7 %. Delež *S. saprophyticus* je bil v Avstriji 2,2 %; v Italiji in na Madžarskem 0 %, v ostalih državah pa od 0 do 5,6 %, v povprečju 3,6 % (9).

Delež za antibiotike občutljivih sevov je bil v naši raziskavi velik. Vsi sevi *E. coli* so bili občutljivi na večino testiranih antibiotikov (nitrofurantoin, fosfomicin, amoksicilin s klavulansko kislino, cefadroksil, cefuroksim, cefotaksim, cefepim, piperacilin s tazobaktamom in imipenem); občutljivost za TMP/SMX je bila 88,6 %, za ciprofloksacin in norfloksacin 97,1 %, za amoksicilin 82,9 % in za gentamicin 97,1 %. V nekaterih tujih raziskavah je bil delež občutljivih sevov

manjši, v raziskavi ARESC je bil med 2.315 sevi *E. coli* delež za TMP/SMX občutljivih 70,5 %, za nitrofurantoin 95,2 %, za fosfomicin 98,1 %, za ciprofloksacin 91,8 %, za ampicilin 45,1 % in za amoksicilin s klavulansko kislino 82,1 % (23). Rezultati raziskave, ki so jo v letih 2007 in 2008 opravili v Avstriji, pa so zelo podobni našim: odpornost sevov *E. coli* proti nitrofurantoinu je bila 0,7 %, proti fosfomicinu 0,7 %, proti TMP/SMX 14,4 % in proti ciprofloksacinu 4,1 % (7).

Da bi ugotovili, kako primeren je za izkustveno zdravljenje ANC posamezen antibiotik, smo ugotavljali skupno občutljivost vseh izolatov, ki smo jo opredelili kot zmnožek prevalence posamezne bakterijske vrste ali rodu in deleža občutljivosti za določen antibiotik. Določene bakterijske vrste so proti nekaterim antibiotikom naravno odporne, npr. *P. mirabilis* proti nitrofurantoinu ali *E. faecalis* proti cefalosporinom (cefadroksil, cefotaksim idr.), zato je občutljivost za te antibiotike manjša od 100 %. Skupna občutljivost vseh izolatov je bila za TMP/SMX 88 %, za nitrofurantoin 90 %, za ampicilin in amoksicilin 82 %, za cefadroksil 98 % in za norfloksacin 88 %.

Pri ugotavljanju navzkrižne odpornosti smo ugotovili, da je bilo med devetimi sevi, ki so bili odporni proti najmanj enemu antibiotiku in so vsi pripadali družini enterobakterij, pet sevov odpornih tudi proti TMP/SMX, od tega sta bila dva seva neobčutljiva hkrati proti ciprofloksacinu in norfloksacinu. Tudi v raziskavi ARESC so ugotovili, da je bila odpornost *E. coli* proti kateremukoli antibiotiku pogosto povezana z odpornostjo proti drugim testiranim antibiotikom (8). V raziskavi ECO-SENS so ugotovili kombinirano odpornost proti ampicilinu in sulfametoksazolu pri 8,7 % izolatov ter proti kombinaciji ampicilin/sulfametoksazol/trimetoprim v 6,4 % (6). Kombinirana odpornost proti ampicilinu, sulfametoksazolu in trimetoprimu se pojavi, ker se geni za odpornost proti tem antibiotikom nahaja-

jo na istem plazmidu (24). Podatki o kombinirani odpornosti in njeni pogostosti so pomembni za usmerjanje diagnostike in zdravljenja.

Kljub temu da se za izkustveno zdravljenje ANC v Sloveniji priporoča nitrofurantoin in kot alternativa fosfomicin, je bil v raziskavi najpogosteje predpisan antibiotik TMP/SMX (v 56 %). Nitrofurantoin je bil na drugem mestu, prejela ga je ena petina bolnic. Sledil je fosfomicin, ki je bil predpisan v 7 %. Po informacijah nekaterih zdravnikov, ki so sodelovali v raziskavi, je pogosta uporaba TMP/SMX posledica kliničnih izkušenj in dobre učinkovitosti pri ANC.

V dveh primerih je bil za zdravljenje predpisan kinolon, kar je manj primerno. Kinoloni so zelo učinkoviti antibiotiki, ki so primerni predvsem za zapletene okužbe sečil in za okužbe zgornjih sečil (3). Znano je tudi, da zdravljenje s kinoloni vpliva na človekovo mikrobioto in povzroči selekcijo odpornih bakterij. V nedavni raziskavi so dokazali, da zdravljenje s ciprofloksacinom zmanjša absolutno število enterobakterij v črevesni mikrobioti in pomembno poveča delež proti ciprofloksacinu odpornih enterobakterij. Kolonizacijo s proti ciprofloksacinu odpornimi enterobakterijami so raziskovalci ugotovili tudi pri osebah, ki so bile v istem gospodinjstvu kot s ciprofloksacinom zdravljene bolnice. Pri bolnicah, ki so bile zdravljene z nitrofurantoinom, povečanja pogostosti proti ciprofloksacinu ali proti nitrofurantoinu odpornih sevov niso ugotovili (25, 26).

Pomanjkljivost pričujoče raziskave je majhno število obravnavanih bolnic in po-

sledično majhno število izolatov posamezne vrste, zato z raziskavo nadaljujemo. Skušali bomo vključiti družinske zdravnike tudi v drugih regijah države.

## ZAKLJUČEK

Rezultati raziskave nakazujejo dobro občutljivost bakterij pri ANC za antibiotike, ki so namenjeni zdravljenju teh okužb. Dobljeni podatki se pomembno razlikujejo od podatkov rednih mikrobioloških preiskav vzorcev seča in bodo kliničnim zdravnikom v pomoč pri pripravi priporočil in zdravljenju okužb. Ocenjujemo, da bo raziskava pomembno prispevala k racionalni rabi antibiotikov v Sloveniji.

## ZAHVALA

Za sodelovanje, trud in podporo se zahvaljujemo vsem sodelujočim zdravnicam in zdravnikom družinske medicine ZD Radovljica, ZD Kranj, ZD Tržič, ZD Nova Gorica, ZD Trebnje in ZD Celje, Ambulante splošne medicine Vitalija ter Zasebnega zdravstvenega zavoda RR: Tanji Leskovar, Metki Čepar, Maji Petrovič Šteblaj, Poloni Žuber, Tini Tomšič, Alice Kikel, Damijani Pogačnik Peternel, Romani Pintar, Dragani Pajčin Sarjanovič, Metki Munih, Mateji Fišer, prim. Tatjani Primožič, Andreji Golnar, Simoni Graselli, Špeli Jenkole, Simoni Kajba Veninšek, Mariji Petek Šter in Jani Zajc. Zahvaljujemo se tudi drugim sodelujočim iz omenjenih zdravstvenih ustanov, ki so kakorkoli prispevali k izvedbi raziskave, in vsem sodelavcem v mikrobioloških laboratorijih NLZOH v Kranju, Novi gorici, Celju in Novem mestu.

## LITERATURA

- Logar M, Narah K, Lindič J, et al. Antibiotično zdravljenje okužb sečil v Sloveniji. In: Beović B, Lejko Zupanc T, Tomažič J, eds. Infektološki simpozij 2017. Stopenjska diagnostika in zdravljenje pogostih okužb. 2017 Oct 20–21; Ljubljana: Sekcija za protimikrobno zdravljenje SZD, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni Klinični center Ljubljana in Katedra za infekcijske bolezni in epidemiologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. p. 169–79.
- Gupta K, Thomas M, Hooton TM, et al. Infectious Diseases Society of America; European Society for Microbiology and Infectious Diseases. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Infect Dis*. 2011; 52 (5): e103–20.
- Čižman M, Beović B. Kako predpisujemo protimikrobna zdravila v bolnišnicah. Ljubljana: Sekcija za protimikrobno zdravljenje Slovenskega zdravniškega društva; 2013.
- Car J, Marinko T. Zdravljenje nezapletene okužbe sečnega mehurja pri ženskah v družinski medicini. *Zdrav Vestn*. 2003; 72: 79–83.
- Kahlmether G. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO-SENS project. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 51 (1): 69–76.
- Kahlmether G, Munday P. Cross-resistance and associated resistance in 2478 *Escherichia coli* isolates from the Pan-European ECO-SENS Project survey in the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 52 (1): 128–31.
- Kamenski G, Wagner G, Zehetmayer S, et al. Antibacterial resistances in uncomplicated urinary tract infections in women: ECO-SENS II data from primary healthcare in Austria. *BMC Infect Dis*. 2012; 12: 222.
- Schito GC, Naber KG, Botto H, et al. The ARES study: an international survey on the antimicrobial resistance of pathogens involved in uncomplicated urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 34 (5): 407–13.
- European Confederation of Laboratory Medicine (ECLM). European urinalysis guidelines. *Scand J Clin Lab Invest*. 2000; 60: 1–96.
- Hooton TM, Roberts PL, Marsha EC, et al. Voided midstream urine culture and acute cystitis in premenopausal women. *N Engl J Med*. 2013; 369: 1883–91.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters [internet]. Version 7.1. EUCAST; 2017 [citirano 2018 Jun 3]. Dosegljivo na: <http://www.eucast.org>
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters [internet]. Version 8.0. EUCAST; 2018 [citirano 2018 Jun 3]. Dosegljivo na: <http://www.eucast.org>
- Donnenberg M. Uncomplicated cystitis - not so simple. *N Engl J Med*. 2013; 369 (20): 1959–60.
- Foxman B, Barlow R, D'Arcy H, et al. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Ann Epidemiol*. 2000; 10: 509–15.
- Foxman B. Recurring urinary tract infection: incidence and risk factors. *Am J Public Health*. 1990; 80: 331–3.
- Huttner A, Pulcini C. CMI and 'primary-care' infections. *Clin Microbiol Infect*. 2018; 24: 797–8.
- Štrumbelj I, Berce I, Harlander T, et al. Pregled občutljivosti bakterij za antibiotike – Slovenija 2016 [internet]. Ljubljana: Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ); 2017 [citirano 2018 julij 7]. Dosegljivo na: <http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuoopz>
- Ribič H, Lugovski M, Dermota U, et al. Novosti v mikrobiološki diagnostiki okužbe sečil. In: Govc Eržen J, ed. Aktualno v družinski medicini: zbornik predavanj. Družinska medicina. 2017; 15 (Suppl 5): 32–8.
- Križan – Hergouth V, Logar M. Diagnostika in etiologija okužb sečil v Sloveniji. In: Beović B, Lejko Zupanc T, Tomažič J, eds. Infektološki simpozij 2017. Stopenjska diagnostika in zdravljenje pogostih okužb. 2017 Oct 20–21; Ljubljana: Sekcija za protimikrobno zdravljenje SZD, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana in Katedra za infekcijske bolezni in epidemiologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani; 2017. p. 159–68.
- Ribič H, Smole A, Oražem T. Odpornost bakterij, ki smo jih osamili pri varovancih domov za ostarele. *Zdrav Varst*. 2003; 4: 145–56.
- Ribič H, Dermota U, Novak D, et al. Odpornost povzročiteljev okužb sečil v Sloveniji. In: Beović B, Strle F, Čižman M, eds. Infektološki simpozij 2006. Ljubljana: Sekcija



- za kemoterapijo SZD; Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, KC; Katedra za infekcijske bolezni in epidemiologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani; 2006. p. 213–25.
22. Ribič H, Dermota U, Štrumbelj I, et al. Preliminarni rezultati spremljanja občutljivosti za antibiotike pri akutnem nezapletenem cistitisu. *e-NBOZ*. 2018; (8): 19–26.
  23. Naber KG, Schito GC, Botto H, et al. Surveillance study in Europe and Brasil on clinical aspects and antimicrobial resistance epidemiology in females with cystitis (ARESC): Implications for empiric therapy. *Eur Urol*. 2008; 54 (5): 1164–78.
  24. Ames SG. The success of plasmid-encoded resistance genes in clinical bacteria. An examination of plasmid-mediated ampicillin and trimethoprim resistance genes and their resistance mechanisms. *J Med Microbiol*. 1989; 28: 73–83.
  25. Zuccotti G, Pflomm JM. Drugs for urinary tract infections. *JAMA*. 2014; 311 (8): 855–6.
  26. Stewardson AJ, Vervoort N, Adriaenssens N, et al. Effect of outpatient antibiotics for urinary tract infections on antimicrobial resistance among commensal Enterobacteriaceae: a multinational prospective cohort study. *Clin Microbiol Infect*. 2018; 24: 972–79.

Rok Tomazin<sup>1</sup>, Saša Simčič<sup>2</sup>, Tadeja Matos<sup>3</sup>, Andreja Nataša Kopitar<sup>4</sup>, Sanja Stopinšek<sup>5</sup>, Alenka Mauko<sup>6</sup>, Vesna Zalar Serjun<sup>7</sup>, Janez Mulec<sup>8</sup>

## Vpliv turizma na kakovost zraka v Postojnski jami in Škocjanskih jamah

### *Impact of Tourism on Air Quality in Postojna Cave and Škocjan Caves*

#### IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: Kras, turistične jame, aerobiologija

Aerosoli v jamah so naravni indikatorji in nam skupaj z mikroklimatskimi podatki dajo zelo dober vpogled v stanje jamske atmosfere, odzivov na klimatske spremembe in vpliv človeka. Aerosoli nastajajo na račun zračnih tokov, pljuskajoče vode ter ob prisotnosti/gibanju ljudi in živali. Z analizo mikrobne populacije v jami imamo tudi možnost kvantitativne opredelitve antropogenih vplivov na jamski ekosistem. Leta 2017 smo na različnih točkah turističnega obiska v Postojnski jami in Škocjanskih jamah volumetrično vzorčili zrak pred in po turističnem obisku. Prisotnost turistov je znatno povešala koncentracijo ogljikovega dioksida (CO<sub>2</sub>) ter organskih in anorganskih delcev, analiziranih z vrstično elektronsko mikroskopijo. S kultivacijo vzorcev zraka smo pokazali povečanje mikrobnega bremena po prehodu turistov na vseh merilnih lokacijah. Navišjo obremenitev smo zabeležili avgusta, na vrhuncu turistične sezone, ko je koncentracija biomase v Postojnski jami, v Vivariju, presegla 1.000 CFU/m<sup>3</sup>. Najpogostejši izolati so pripadali naslednjim rodovom: *Acinetobacter*, *Aerococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Cryptococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rahnella* in *Staphylococcus*. Testiranje prisotnosti β-(1,3)-D-glukana v zraku ni dalo podobnih zaključkov, saj se koncentracija ni povečala ob prisotnosti turistov, ampak glede na letni čas. Rezultati kažejo na znaten vpliv turizma in sezonskosti na sestavo in dinamiko delcev v zraku, tako anorganskega prahu kot bioloških delcev.

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

<sup>2</sup> Strok. svet. znan. sod. asist. dr. Saša Simčič, univ. dipl. kem., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Doc. dr. Tadeja Matos, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

<sup>4</sup> Doc. dr. Andreja Nataša Kopitar, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

<sup>5</sup> Asist. dr. Sanja Stopinšek, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

<sup>6</sup> Dr. Alenka Mauko, univ. dipl. inž. geol., Zavod za gradbeništvo Slovenije, Dimičeva ulica 2, 1000 Ljubljana

<sup>7</sup> Dr. Vesna Zalar Serjun, univ. dipl. inž. geol., Zavod za gradbeništvo Slovenije, Dimičeva ulica 2, 1000 Ljubljana

<sup>8</sup> Znan. sod. dr. Janez Mulec, univ. dipl. mikr., Inštitut za raziskovanje krasa, Znanstvenoraziskovalni center Slovenske akademije znanosti in umetnosti, Titov trg 2, 6230 Postojna

## ABSTRACT

---

KEY WORDS: Karst, tourist caves, aerobiology

Aerosols in caves are natural indicators and together with microclimate data provide a very good insight into the state of the cave atmosphere, responses to climate change and human impact. Aerosols are formed due to air currents, splashing water, and presence/movement of humans and animals. The analysis of the cave microbial population enables the quantification of anthropogenic impacts on the cave ecosystem. In 2017, air was sampled volumetrically before and after tourist visits at selected sites along tourist pathways in Postojna Cave and Škocjan Caves. The presence of tourists significantly increased the concentration of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) and organic and inorganic particles analysed by scanning electron microscopy. The cultivation of air samples showed an increase of the microbial load after tourists passed by all sampling stations. The highest microbial load was detected in August at the peak of the tourist season when the biomass concentration in Postojna Cave in the section Vivarij exceeded 1,000 CFU/m<sup>3</sup>. The most common isolates belonged to the following genera: *Acinetobacter*, *Aerococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Cryptococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Rahnella* and *Staphylococcus*. Testing for the presence of β-(1,3)-D-glucan in air did not yield similar conclusions as the concentration did not increase while tourists were present but depended on the season. The results show a significant impact of tourism and seasonality on the composition and dynamics of airborne particles, including inorganic dust and biological particles.

## UVOD

Kraške jame so že od nekdaj turistično zanimive. Prvi dokazi o obiskovanju Postojnske jame segajo v začetek 13. stoletja, medtem ko se je organizirana oblika turizma začela v 19. stoletju po odkritju globljih delov jame. V zadnjih 200 letih je Postojnsko jamo obiskalo že več kot 38 milijonov obiskovalcev, kar jo uvršča med najpomembnejše in najzanimivejše turistične znamenitosti v Evropi. Poleg Postojnske jame so turistično čedalje bolj zanimive še Škocjanske jame, ki jih letno obiše že več kot 150.000 obiskovalcev. Turistične jame, ki jih upravlja javni ali zasebni sektor, so namenjene obisku širše javnosti, ne le raziskovalcem. Za razliko od jam, ki niso urejene za turistični obisk, si obiskovalci turističnih jam le-te vodeno ogledajo po umetno narejenih oz. utrjenih poteh, ob določenih urah in ob umetni razsvetljavi (1). Jamski turizem je tako če-

dalje bolj povezan z nezanemarljivim vplivom na gospodarstvo in jamske ekosisteme, vendar pa je ravnotežje za trajnostno rabo težko vzpostaviti.

Jame so specifični, unikatni in občutljivi ekosistemi zaradi relativne nedostopnosti, konstantnih mikroklimatskih razmer, ponekod nizke razpoložljivosti organskih hranil, omejene samočistilne sposobnosti v primeru vnosa velikih količin organskega materiala, ohranjene biotske raznolikosti ter odsotnosti nekaterih, za (mikro)organizme stresnih dejavnikov, kot sta npr. ultravijolično sevanje in izsuševanje (2–5). Človeška dejavnost v jami močno poseže v ekosistem, povzroči spremembe v strukturi in dinamiki populacij jamskih (mikro)organizmov, še posebej z vnosom jami tujerodnih vrst in organskega materiala (5–7).

## JAMSKA MIKROBIOLOGIJA

Jamska mikrobiologija (speleomikrobiologija) je dokaj mlada veja mikrobiologije, ki v sodelovanju z geologijo in kemijo preučuje mikroorganizme v jamah in njihove vplive na naravne procese (8). Mikroorganizmi niso samo nemi opazovalci speleogeneze, ampak aktivno sodelujejo tako v litogenih kot litolitičnih procesih (9, 10).

Večina jamskih sistemov nastaja z raztapljanjem karbonatnih kamnin z ogljikovo kislino ( $H_2CO_3$ ), ki nastaja z raztapljanjem atmosferskega in površinskega ogljikovega dioksida ( $CO_2$ ) v meteorni vodi. Na tak način nastajajo epigene jame, ki predstavljajo med 80 in 90 % vseh jam. Manjši delež jam je hipogenega izvora, kjer ima pomembno vlogo speleogeneza z žvepleno kislino ( $H_2SO_4$ ), saj je povezana z intenzivnimi kondenzacijsko-korozivskimi procesi, ki vodijo v hiter nastanek jam (11). Pri obeh tipih jam ima biospeleogeneza pomembno vlogo, predvsem v primeru hipogenih jam, kjer so mikrobi pogosto odgovorni za oksidacijo vodikovega sulfida ( $H_2S$ ) v  $H_2SO_4$  (11, 12). Mikrobna aktivnost na jamskih strukturah je vidna še kot organska obrast in neobičajna obarvanost kapnikov, karbonatni precipitati in biofilmi (8). Na površinah kamnin z očitnimi znaki korozije so s sekvenciranjem odseka 16S rDNA že identificirali rodove *Brevibacterium*, *Citricoccus*, *Kocuria*, *Micrococcus* in *Rothia*, vendar vzročne povezave še niso uspeli dokazati (10).

Najpogosteje zastopani mikroorganizmi v jamah izhajajo iz skupin tako grampozitivnih kot gramnegativnih bakterij, cianobakterij, mikroalg, pravih gliv in protozojev (8). Iz vzorcev slovenskih kraških jam so uspeli osamiti bakterije rodov *Bacillus*, *Paenibacillus*, koagulaza-negativne vrste *Staphylococcus*, *Empedobacter*, *Proactinomyces*, *Pseudomonas* ter številne vrste iz družin *Enterobacteriaceae* in *Vibrionaceae* (2, 8). Med fototrofi so že dokazali prisotnost *Aphanocapsa*, *Chlorella*, *Lyngbya*, *Synechocysti*,

*Calothrix*, *Homoeothrix* in *Schizothrix* (8). Med glivami v jamah prevladujejo vlaknate glive rodov *Penicillium*, *Cladosporium* in *Aspergillus* (podobno kot v mikrobioti zraka notranjih prostorov) ter *Candida*, *Aureobasidium* in nepatogene vrste rodu *Cryptococcus* (2, 8). Med enoceličnimi evkarionti najdemo tudi protozoje, predvsem amebe iz rodov *Acanthamoeba* in *Hartmannella* (8).

Kraške jame pogosto veljajo za oligotrofna okolja z malo organskih hranil. Ponekod imajo bakterije in mikroalge v jamah glavno vlogo primarnih producentov. Cianobakterije in mikroalge se kot fotoavtotrofi nahajajo predvsem na osvetljenih vhodnih delih jam in kot del t. i. lampenflore v notranjosti jam ob virih umetne svetlobe. V notranjosti jam, kjer ni niti sončne niti umetne svetlobe, vlogo primarnih producentov prevzamejo kemilitoavtotrofne bakterijske združbe (8, 13).

Mikroorganizme najdemo v jamah na najrazličnejših površinah in v zraku. Slednji je tudi najpomembnejši način pasivnega transporta mikroorganizmov v jame in znotraj jam samih (8). Pomemben vir mikroorganizmov je voda, ki se lahko dispergira v kapljice in aerosole, ki služijo kot način prenosa. Mikroorganizmi prihajajo v jame tudi preko koloniziranih/okuženih ljudi in živali – tako lahko alohtoni mikroorganizmi pripotujejo globoko v notranjost jame (2, 6, 8). Alohtoni mikroorganizmi in vnešeni organski material močno vplivajo na jamski ekosistem, ki se lahko ireverzibilno spremeni (5, 8). Aerosoli, ki nastanejo kot posledica zračnih tokov, prisotnosti živali in ljudi ter pljuškajoče in pršče vode, so skupaj s klimatskimi parametri dobri naravni kazalci stanja jamske atmosfere, odzivov na mikroklimatske spremembe in antropogene vplive.

Namen prispevka je predstaviti del rezultatov, zbranih v letu 2017 s projektom J7-7100: »Naravni viri kraških turističnih jam: ravnovesje med varovanjem, izkoriščanjem in promocijo«, ter oceniti antropogene

vplive na strukturo in dinamiko mikrobnе populacije v dveh turistično najbolj obremenjenih kraških jamah v Sloveniji, v Postojnski jami in Škocjanskih jamah.

## MATERIALI IN METODE

Vzorčenje je potekalo na najnižjih točkah turističnega obiska v Postojnski jami in Škocjanskih jamah ter v Vivariju v Postojnski jami. V letu 2017 smo izvedli pet oz. šest vzorčenj razporejenih skozi celo leto v različnih turističnih sezonah (januar, marec, maj, avgust, oktober, december). Ob vsakem vzorčenju smo odvzeli vzorce zraka za mikrobiološke in mineralološke preiskave ter kontinuirano beležili mikroklimatske parametre (temperaturo in koncentracijo CO<sub>2</sub>). Vse meritve in vzorčevanja smo izvedli najprej pred prvim turističnim obiskom jame in nato še med samim obiskom.

## Merjenje mikroklimatskih parametrov

Pred in med turističnimi obiski smo merili temperaturo s prenosnim merilnikom Kestrel 4500 Pocket Weather Tracker (Dalotech, ZDA) ter koncentracijo atmosferskega CO<sub>2</sub> z MI70 CO<sub>2</sub>-metrom (Vaisala, Finska).

## Vzorčenje zraka in mikrobiološke analize

Zrak smo vzorčili z impingerskim vzorčevalnikom Coriolis (Bertin Technologies, Francija) pred in med turističnim obiskom. Pred vsakim zajemom zraka smo površino vzorčevalnika razkužili s 96 % etilnim alkoholom. Vzorčili smo s pretokom 0,15 m<sup>3</sup> zraka/min in tako vsakič zajeli 4,5 m<sup>3</sup> zraka v 10 ml sterilne 0,9 % vodne raztopine NaCl. Tako dobljene vzorce smo neposredno po vzorčenju nacepili na izbrana trdna gojišča in jih alikvotirali v sterilne, apirogene epruvete ter jih shranili pri 4° C do ugotavljanja koncentracije β-(1,3)-D-glukana (BDG).

## Kultivacija, kvantifikacija in identifikacija poraslih mikroorganizmov

Vzorce smo cepili na krvni agar (KA) z 0,5 % defibrinirano ovčjo krvjo (BioGnost, Hrvatska) in na hranilni agar (angl. *nutrient agar*, NA) (Sigma Aldrich, ZDA) – po 0,2 ml vzorca smo s spatulo Drigalski enakomerno razmazali po celotni površini agarske plošče. Vse vzorce smo nacepili v dvojniku in inkubirali sedem dni v aerobni atmosferi pri 20° C (NA) in prekončno pri 37° C (NA in KA). Plošče smo za rast pregledovali vsakodnevno. Porasle mikroorganizme smo številčno opredelili v CFU/m<sup>3</sup> zraka. Sledila je identifikacija izolatov z metodo masne spektrometrije (angl. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*, MALDI-TOF MS) po že prej opisanem protokolu (2).

## Dokazovanje β-(1,3)-D-glukana

Vzorce zraka v sterilni fiziološki raztopini smo naslednji dan po vzorčenju testirali na BDG v dvojnikih ali trojnikih s kolorimetričnim kinetičnim testom Fungitell (Associates of Cape Cod, Inc., ZDA) po navodilih proizvajalca. Za spektrofotometrične analize smo uporabili optični čitalec Bio Tek Cytation 5 (Bio Tek Instruments Inc., ZDA). Končni rezultati z analitsko občutljivostjo metode 8 pg/ml so povprečja koncentracije BDG dvojnikov ali trojnikov v pg/ml/m<sup>3</sup> zraka. Vzorce s koncentracijo BDG večjo od 500 pg/ml smo redčili in testiranje ponovili.

## Analiza organskih in anorganskih delcev

Podobno kot za mikrobiološke analize smo za analizo aerosolov vzorčevali jamski zrak pred turističnim obiskom in po njem. Na polikarbonatne filtre smo vsakokrat prečrpali 3 m<sup>3</sup> zraka z impaktorjem Air-sampler System MAS-100 NT (Merck).

Analiza delcev na filtrih vzorčevalnika zraka je bila opravljena z uporabo vrstič-

ne elektronske mikroskopije (angl. *scanning electron microscopy*, SEM), z energijsko disperzijsko spektroskopijo rentgenskih žarkov (EDS) (Oxford instruments, UK) na mikroskopu JEOL 5500 LV (Tokio, Japonska). Analize so bile izvedene v nizkem vakuumu, z uporabo povratno odbitih elektronov (angl. *backscattered electrons*, BSE) pri napetosti 20 kV in delovnem tlaku 12–15 Pa. Analiza EDS je potekala pri delovni razdalji 20 mm. Na posameznem filtru je bila analiza opravljena na več točkah, predhodno sistematično določenih na podlagi rastra. Analiza je potekala pri dveh različnih povečavah.

## REZULTATI

### Mikrobiologija in dokazovanje $\beta$ -(1,3)-D-glukana

#### Mikrobiologija: Postojnska jama – Lepe jame

V Lepih jamah, na najnižji točki turističnega obiska Postojnske jame, smo pred turističnim obiskom zabeležili 8–258 CFU/m<sup>3</sup> z najvišjima mikrobnima bremenoma v avgustu in decembru (tabela 1, slika 1). Iz vseh vzorcev smo osamili bakterije iz rodu *Micrococcus*. Največjo pestrost zanesljivo identificiranih rodov smo zabele-

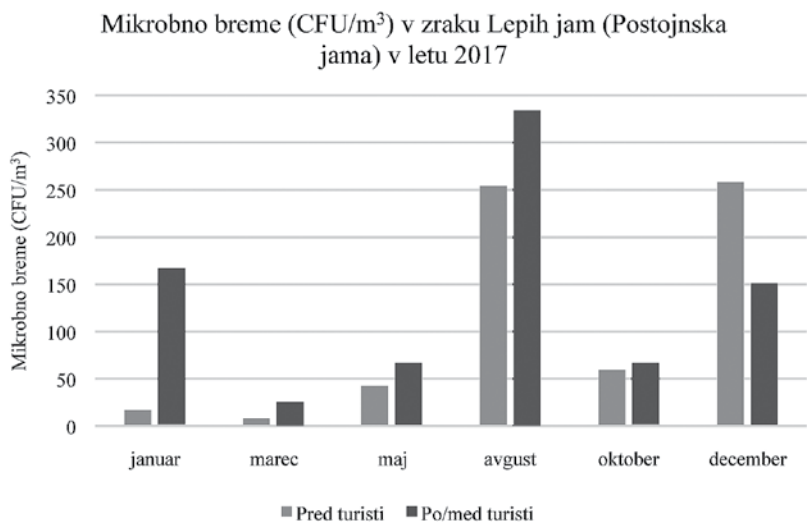
žili meseca avgusta s štirimi bakterijskimi (*Micrococcus*, *Bacillus*, *Kocuria* in *Chryseobacterium*) in enim glivnim rodod (*Aureobasidium*).

Med oz. po turističnem obisku smo zabeležili 25–334 CFU/m<sup>3</sup> z najvišjima mikrobnima bremenoma v avgustu in decembru, tako kot v meritvah pred turističnim obiskom (tabela 1, slika 1). Prevladujoči rod je bil v drugi polovici leta *Micrococcus* medtem, ko je v februarjem vzorcu prednjačil *Staphylococcus epidermidis*. Poleg mikrokokov smo v vseh vzorcih, z izjemo majskega, osamili koagulaza-negativne stafilokoke: *S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus* in *S. warneri*. Največjo pestrost smo zabeležili v avgustovskem vzorcu, ko smo zanesljivo identificirali sedem bakterijskih rodov (*Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Brevibacterium*, *Jeotgalicoccus*, *Moraxella*, *Microbacterium* in *Bacillus*). Prisotnost kultivabilnih gliv smo zaznali v oktobrskem vzorcu z osamitvijo kvasovke *Cryptococcus diffluens*.

Mikrobna obremenitev zraka se je vsakič, z izjemo decembra, povečala s prihodom turistov (slika 1). Največja razlika v mikrobni obremenitvi pred in po turističnem obisku je bila januarja, ko se je iz 17 CFU/m<sup>3</sup> po prehodu 91 turistov zvišala na 167 CFU/m<sup>3</sup>.

**Tabela 1:** Postojnska jama – Lepe jame: temperatura, koncentracija CO<sub>2</sub>, mikrobna obremenitev in koncentracija BDG pred in po turističnem obisku. T – temperatura, CO<sub>2</sub> – ogljikov dioksid, ppm – število delcev na milijon (ang. *parts per million*), BDG –  $\beta$ -(1,3)-D-glukan.

Datum	Pred turističnim obiskom				Po/med turističnim obiskom				
	T (°C)	CO <sub>2</sub> (ppm)	Mikrobi (CFU/m <sup>3</sup> )	BDG (pg/ml/m <sup>3</sup> )	T (°C)	CO <sub>2</sub> (ppm)	Mikrobi (CFU/m <sup>3</sup> )	Število turistov	BDG (pg/ml/m <sup>3</sup> )
31. 1. 2017	10,7	560	17	< 7,8	10,6	540	167	91	< 7,8
21. 3. 2017	10,7	660	8	< 7,8	10,6	690	25	136	< 7,8
25. 5. 2017	10,8	1.190	42	10,0	10,7	1.230	67	135	19,1
22. 8. 2017	10,8	1.410	254	26,5	10,9	1.550	334	154	30,6
3. 10. 2017	10,9	2.040	59	90,9	11,0	2.000	67	358	151,2
5. 12. 2017	10,7	790	258	409,3	12,3	800	151	144	> 500

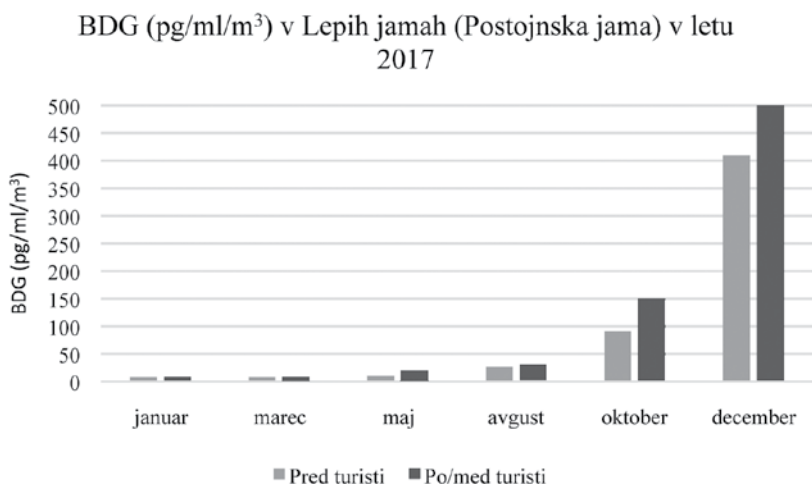


**Slika 1:** Postojnska jama – Lepe jame: mikrobna obremenitev zraka v letu 2017 pred in po turističnih obiskih.

**β-(1,3)-D-glukan: Postojnska jama – Lepe jame**

Pred turističnim obiskom smo v Lepih jamah zabeležili koncentracije BDG od manj kot 7,8 pg/ml/m<sup>3</sup> do 409,3 pg/ml/m<sup>3</sup> (tabela 1). Koncentracija BDG je začela naraščati

in v drugi polovici leta in dosegla vrh v decembru (slika 2). Isti trend velja za situacijo po turističnem obisku oz. med njim, ko smo izmerili koncentracije BDG od manj kot 7,8 pg/ml/m<sup>3</sup> do več kot 500 pg/ml/m<sup>3</sup> (tabela 1, slika 2).



**Slika 2:** Postojnska jama – Lepe jame: koncentracija BDG (pg/ml/m<sup>3</sup>) v letu 2017 pred in po turističnih obiskih. BDG – β-(1,3)-D-glukan.

## Mikrobiologija: Postojnska jama – Vivarij

V Vivariju smo pred turističnim obiskom zabeležili 58–321 CFU/m<sup>3</sup> z najvišjima mikrobnima bremenoma v avgustu in oktobru (tabela 2, slika 3). Iz vseh vzorcev, z izjemo oktobrskega, smo osamili bakterije iz rodu *Micrococcus*. V avgustovskem vzorcu smo z MALDI-TOF MS zanesljivo identificirali dva rodova, *Micrococcus* in *Bacillus*, v oktobrskem vzorcu pa le rod *Arthrobacter*.

Med turističnim obiskom oz. po njem smo zabeležili 42–1.146 CFU/m<sup>3</sup>, z najvišjima mikrobnima bremenoma v avgustu in

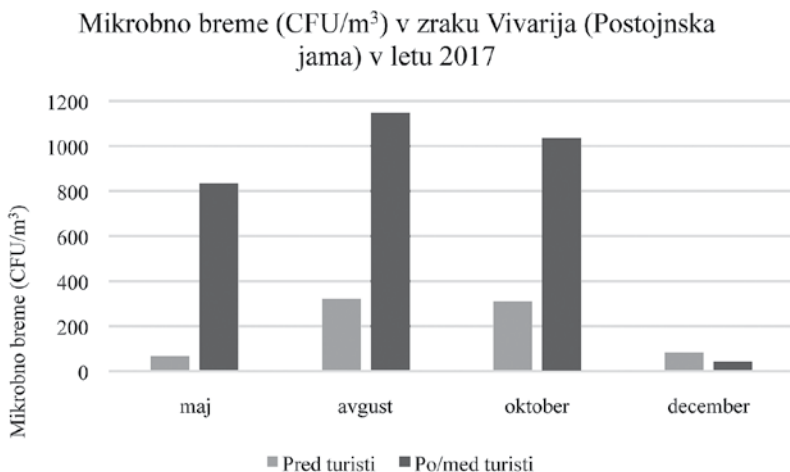
oktobru, tako kot v meritvah pred turističnim obiskom (tabela 2, slika 3). Prevladujoča bakterija je bila v drugi polovici leta *M. luteus*, medtem ko je v marčevskem vzorcu prednjačil *Bacillus cereus*. Največjo pestrost smo zabeležili v avgustovskem vzorcu na vrhuncu turistične sezone (tabela 2), ko smo zanesljivo identificirali sedem bakterijskih rodov (*Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Pantoea*, *Kytococcus*, *Aerococcus*, *Arthrobacter* in *Acinetobacter*). Prisotnost kultivabilnih gliv smo zaznali v dveh vzorcih: kvasovke *Rhodotorula mucilaginosa* v avgustu in *Cryptococcus diffluens* v oktobru.

**Tabela 2:** Postojnska jama – Vivarij: temperatura, koncentracija CO<sub>2</sub>, mikrobn obremenitev in koncentracija BDG pred turističnim obiskom in po njem: T – temperatura, CO<sub>2</sub> – ogljikov dioksid, ppm – število delcev na milijon (angl. *parts per million*), BDG – β-(1,3)-D-glukan.

Datum	Pred turističnim obiskom				Po/med turističnim obiskom				
	T (° C)	CO <sub>2</sub> (ppm)	Mikrobi (CFU/m <sup>3</sup> )	BDG (pg/ml/m <sup>3</sup> )	T (° C)	CO <sub>2</sub> (ppm)	Mikrobi (CFU/m <sup>3</sup> )	Število turistov	BDG (pg/ml/m <sup>3</sup> )
21. 3. 2017	12,5	660	58	< 7,8	/	/	/	/	/
25. 5. 2017	12,7	1.150	67	16,2	12,5	1.240	834	25	18,5
22. 8. 2017	13,9	1.410	321	32,7	13,0	1.650	1146	246	26,8
3. 10. 2017	13,1	760	308	< 7,8	12,7	850	1034	63	30,1
5. 12. 2017	13,6	600	84	191,9	12,3	640	42	0	348,3

Mikrobna obremenitev zraka se je vsakič, podobno kot v Lepih jamah, z izjemo decembra, povečala s prihodom turistov (slika 3). Največja razlika v mikrobn obremenitvi pred turističnim obiskom in po njem je bila avgusta, ko se je iz 321 CFU/m<sup>3</sup> po prehodu 246 turistov zvišala na 1.146 CFU/m<sup>3</sup>.



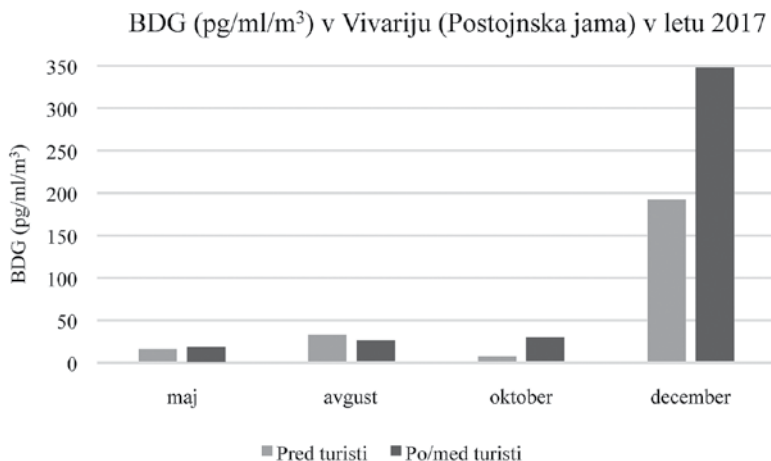


**Slika 3:** Postojnska jama – Vivarij: mikrobna obremenitev zraka v letu 2017 pred turističnimi obiski in po njih.

**β-(1,3)-D-glukan: Postojnska jama – Vivarij**

Pred turističnim obiskom smo v Lepih jamah zabeležili koncentracije BDG od manj kot 7,8 pg/mL/m<sup>3</sup> do 191,9 pg/mL/m<sup>3</sup> (tabela 2). Koncentracija BDG je začela narašča-

ti v drugi polovici leta in dosegla vrh v decembru (slika 4). Isti trend velja za situacijo po oz. med turističnim obiskom, ko smo izmerili koncentracije BDG od 18,5 pg/ml/m<sup>3</sup> do 348,3 pg/ml/m<sup>3</sup> (tabela 2, slika 4).



**Slika 4:** Postojnska jama – Vivarij: koncentracija BDG (pg/ml/m<sup>3</sup>) v letu 2017 pred turističnimi obiski in po njih. BDG - β-(1,3)-D-glukan.

### Mikrobiologija: Škocjanske jame – Šotor

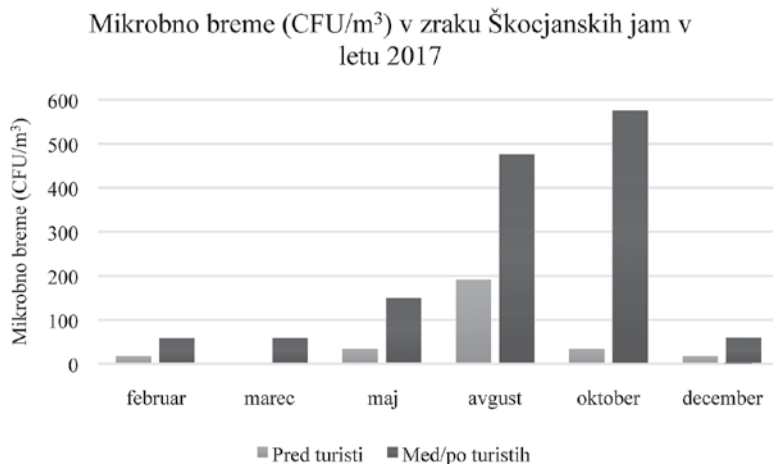
V Škocjanskih jamah, v Šotoru, smo pred turističnim obiskom zabeležili 0–192 CFU/m<sup>3</sup> z najvišjim mikrobnim bremenom v avgustu (tabela 3, slika 5). Iz vseh vzorcev smo osamili koagulaza-negativne stafilokoke, v decembrskem vzorcu je vrsta *Staphylococcus warneri* celo prevladovala. V avgustu, ko smo zabeležili maksimalnih 192 CFU/m<sup>3</sup>, je prevladovala vrsta *M. luteus*. Največjo pestrost zanesljivo identificiranih rodov smo zabeležili meseca oktobra s petimi bakterijskimi rodovi (*Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Streptomyces*, *Microbacterium* in *Arthrobacter*). Gliv iz vzorcev zraka pred turističnim obiskom nismo osamili.

Med turističnim obiskom in po njem smo zabeležili 58–576 CFU/m<sup>3</sup> z najvišjima mikrobnima bremenoma v avgustu in oktobru (tabela 3, slika 5). V februarškem vzorcu so prevladovale gramnegativne bakterije iz rodov *Pseudomonas* in *Stenotrophomonas*, kasneje so prednjačile grampozitivne bakterije, predvsem iz rodov *Micrococcus*, *Bacillus* in *Staphylococcus*. Največjo pestrost smo zabeležili v avgustovskem vzorcu na vrhuncu turistične sezone (tabela 3), ko smo zanesljivo identificirali pet bakterijskih rodov (*Bacillus*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Aerococcus* in *Massilia*). Prisotnost kultivabilnih gliv smo zaznali v avgustovskem in oktobrskem vzorcu z osamitvijo kvasovk *Cryptococcus curvatus* in *R. mucilaginosa* v avgustu ter *C. curvatus* in *C. liquefaciens* v oktobru.

**Tabela 3:** Škocjanske jame – Šotor: temperatura, koncentracija CO<sub>2</sub>, mikroba obremenitev in koncentracija BDG pred turističnim obiskom in po njem: T – temperatura, CO<sub>2</sub> – ogljikov dioksid, ppm – število delcev na milijon (ang. parts per million), BDG – β-(1,3)-D-glukan.

Datum	Pred turističnim obiskom				Po/med turističnim obiskom				
	T (° C)	CO2 (ppm)	Mikrobi (CFU/m <sup>3</sup> )	BDG (pg/ml/m <sup>3</sup> )	T (° C)	CO2 (ppm)	Mikrobi (CFU/m <sup>3</sup> )	Število turistov	BDG (pg/ml/m <sup>3</sup> )
1. 2. 2017	12,5	540	17	40,8	12,3	540	58	7	< 7,8
22. 3. 2017	12,6	810	0	8,4	12,4	820	59	97	< 7,8
24. 5. 2017	12,7	1.300	34	8,9	12,5	1.330	150	119	< 7,8
23. 8. 2017	12,6	1.910	192	59,0	12,7	1.950	475	182	17,0
4. 10. 2017	12,7	1.880	34	> 500	12,5	1.920	576	79	> 500
6. 12. 2017	12,4	520	17	> 500	12,4	510	59	12	296,5

Mikrobna obremenitev zraka se je vsakič povečala s prihodom turistov (slika 5). Največja razlika v mikrobnih obremenitvah pred turističnim obiskom in po njem je bila oktobra, ko se je iz 34 CFU/m<sup>3</sup> po prehodu 79 turistov zvišala na 576 CFU/m<sup>3</sup>.

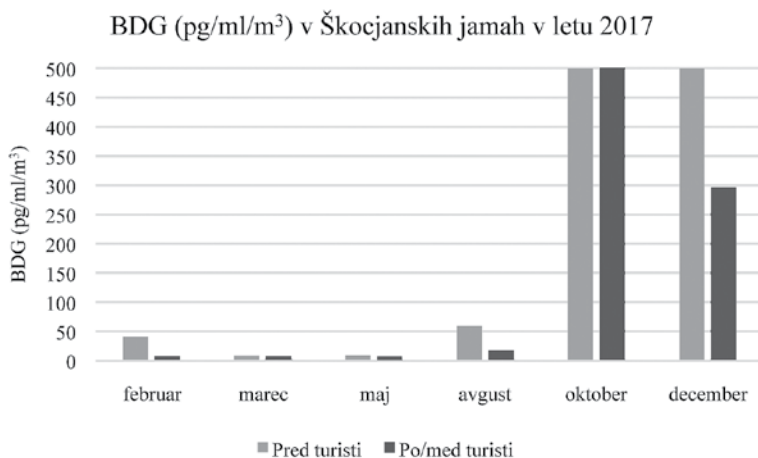


**Slika 5:** Škocjanske jame – Šotor: mikrobna obremenitev zraka v letu 2017 pred turističnimi obiski in po njih.

### β-(1,3)-D-glukan: Škocjanske jame – Šotor

Pred turističnim obiskom smo v Lepih jamah zabeležili koncentracije BDG od 8,4 pg/mL/m<sup>3</sup> do več kot 500 pg/mL/m<sup>3</sup> (tabela 3). Najvišje koncentracije BDG smo izmerili v oktobru in decembru (slika 6). Isti trend velja za situacijo po oz. med tu-

rističnim obiskom, ko smo izmerili koncentracije BDG od manj kot 7,8 pg/mL/m<sup>3</sup> do več kot 500 pg/mL/m<sup>3</sup> (tabela 3, slika 6). V februarju, oktobru in decembru so vrednosti BDG pred turističnim obiskom presegale vrednosti, zmerjene po obisku oz. med njim (slika 6).



**Slika 6:** Škocjanske jame – Šotor: koncentracija BDG (pg/ml/m<sup>3</sup>) v letu 2017 pred in po turističnih obiskih. BDG – β-(1,3)-D-glukan.

## Analiza organskih in anorganskih delcev

Rezultati analize ob primerjavi komponente turističnega obiska v jamah (filtri v času, ko so bili v jami prisotni turisti glede na filtre v času, ko turistov ni bilo) kažejo enak trend tako v številu delcev, v njihovi velikosti, kot v razmerju med anorganskimi in organskimi delci na vseh preiskovanih lokacijah. Rezultati nakazujejo na večje število delcev, večjo količino večjih delcev ter večje število organskih delcev ob času, ko so bili v jami prisotni turisti.

## RAZPRAVA

Kraške jame so specifični in občutljivi ekosistemi, ki so prav zaradi svoje unikatnosti čedalje bolj turistično zanimivi. Človeška prisotnost lahko v jami povzroči ireverzibilne spremembe v sestavi biocenoze, zato se v turistično najbolj obremenjenih jamah, kot sta Postojnska in Škocjanske jame, poskuša vpliv antropogenih sprememb kar se le da zmanjšati in jame upravljati trajnostno (7, 8).

Ljudje v jamah, kljub velikim podzemeljskim prostorom, vplivamo na mikroklimatske parametre, saj rezultati terenskih meritve kažejo, da se je, kjer smo izvajali meritve, običajno med turističnim obiskom povečala koncentracija CO<sub>2</sub>. V tem pogledu se je merjenje temperature izkazalo za manj indikativen parameter za zaznavanje človeške prisotnosti.

Najvišjo koncentracijo mikrobov v zraku smo zabeležili na višku turistične sezone v mesecu avgustu 2017 na vseh treh mestih vzorčevanja, in sicer med 334 in 1.146 CFU/m<sup>3</sup>. V kulturi na NA, gojenem pri 37° C, smo iz vzorca zraka Vivarija ugotovili najvišjo koncentracijo, ki je znašala 425 CFU/m<sup>3</sup>. Gojenje istega vzorca pri 20° C pa je dalo koncentracijo biomase v vrednosti 829 CFU/m<sup>3</sup>. Med vzorčenjem smo zabeležili 154 turistov v Postojnski jami, 246 turistov v Vivariju, ki je del turističnega obiska Postojnske

jame, in 182 oseb v Škocjanskih jamah. Mikrobno breme se je ob turističnem obisku vedno povečalo, kar se najlepše vidi v primeru Škocjanskih jam in Vivarija. Podoben trend smo opazili že pred leti, ravno tako v Škocjanskih jamah (2). Tudi analiza delcev v zraku s SEM je pokazala, da ob prisotnosti turistov naraste količina manjših delcev in delcev z značilno mikrobiološko morfologijo, kot so koki, bacili in spore. Koncentracija BDG, značilne sestavine celične sten gliv, ni sledila temu trendu, saj je bila najvišja v nizki turistični sezoni, in sicer meseca oktobra oz. decembra 2017, in verjetno ni pogojena s človeško prisotnostjo.

V jamskem zraku smo identificirali združbo bakterij, ki so običajno povezane s človekovim kožnim mikrobiomom in drugimi naravnimi habitati. Velik del izolatov nam z metodo MALDI-TOF MS ni uspelo identificirati – podobne rezultate smo dobili že v prejšnji raziskavi, ko smo uspeli identificirati le okrog 50 % izolatov (2). Približno polovična uspešnost identifikacije jamskih izolatov kaže na slabo pokritost bakterijskih vrst v komercialno dostopnih podatkovnih bazah, ki niso klinično pomembne oz. so le redko povezane z okužbami. Podobno kot v drugih raziskavah smo iz vzorcev pogosto osamili bakterije iz debel *Actinobacteria*, *Firmicutes* in *Proteobacteria* (2, 14). Pogostejši rodovi iz *Firmicutes* so bili *Aerococcus*, *Bacillus* in *Staphylococcus*, izmed *Actinobacteria* so prevladovali *Micrococcus*, *Arthrobacter* in *Brevibacterium*, izmed *Proteobacteria* pa *Pseudomonas*, *Moraxella* in *Acinetobacter*. Med identificiranimi bakterijami so prevladovale vrste značilne za mikrobioto človeka – *M. luteus*, koagulaza-negativne vrste *Staphylococcus*, *B. cereus*, *Acinetobacter* spp., ki praviloma veljajo za oportunistično patogene bakterije, manj virulentne kot nekateri drugi predstavniki istih rodov (2, 14). Med glivami sta prevladovala rodova *Cryptococcus* in *Rhodotorula*, in sicer vrste, ki so povezane s človeškim mikrobiomom, pred-

vsem kot kolonizatorji kože in črevesne sluznice – *C. diffluens*, *C. curvatus* in *C. liquefaciens* ter *R. mucilaginosus* (15, 16).

Rezultati kažejo, da se v jamah z masovnim turističnim obiskom značilno povečajo klimatski (npr. CO<sub>2</sub>), partikulatni (npr. delci), in mikrobiološki, (npr. celotno število mikroorganizmov) parametri. Z meritva-

mi v okviru projekta še nadaljujemo in pričakujemo, da bomo ob koncu projekta dobili jasnejšo sliko o vplivu turistične rabe jam na kakovost jamskega zraka in zdravje celotnega jamskega ekosistema, kar bo v pomoč tudi upraviteljem jam, da bodo lažje zagotavljali trajnostno rabo naravnih podzemeljskih znamenitosti v Sloveniji in tudi širše.

## LITERATURA

- Mammola S, Di Piazza S, Ziotti M, et al. Human-induced alterations of the mycobiota in an alpine show cave (Italy, SW-Alps). *Acta Carsol.* 2017; 46 (1).
- Mulec J, Oarga-Mulec A, Šturm S, et al. Spatio-temporal distribution and tourist impact on airborne bacteria in a cave (Škocjan Caves, Slovenia). *Diversity.* 2017; 9 (3): 28.
- Barton HA, Giarrizzo JG, Suarez P, et al. Microbial diversity in a Venezuelan orthoquartzite cave is dominated by the *Chloroflexi* (Class *Ktedonobacterales*) and *Thaumarchaeota* Group I.1c. *Front Microbiol.* 2014; 5: 615.
- Culver DC, Pipan T. The biology of caves and other subterranean habitats. Oxford: Oxford University Press; 2009.
- Calò F, Parise M. Evaluating the human disturbance to karst environments in southern Italy. *Acta Carsol.* 2006; 35 (2–3).
- Dobat K. Considérations sur la végétation cryptogamique des grottes du Jura Souabe (sud-ouest de l'Allemagne): Laboratoire Souterrain. *Annales de spéléologie.* 1970; 25 (4): 872–907.
- Cajaiba R, Cabral J, Santos M. A minimal invasive method to forecast the effects of anthropogenic disturbance on tropical cave beetle communities. *Neotrop Entomol.* 2016; 45 (2): 139–47.
- Mulec J. Microorganisms in hypogean: examples from Slovenian karst caves. *Acta Carsol.* 2008; 37 (1).
- Parker CW, Auler AS, Barton MD, et al. Fe (III) reducing microorganisms from iron ore caves demonstrate fermentative Fe (III) reduction and promote cave formation. *Geomicrobiol J.* 2018; 35 (4): 311–22.
- Sonntag G. An analysis of microbial involvement in biospeleogenesis within Lechuguilla cave system [diplomsko delo]. Akron (ZDA): University of Akron; 2015.
- Audra P, Palmer AN. Research frontiers in speleogenesis. Dominant processes, hydrogeological conditions and resulting cave patterns. *Acta Carsol.* 2015; 44 (3).
- Audra P, Gázquez F, Rull F, et al. Hypogean sulfuric acid speleogenesis and rare sulfate minerals in Baume Galinière cave (Alpes-de-Haute-Provence, France). Record of uplift, correlative cover retreat and valley dissection. *Geomorphology.* 2015; 247: 25–34.
- Hutchins BT, Engel AS, Nowlin WH, et al. Chemolithoautotrophy supports macroinvertebrate food webs and affects diversity and stability in groundwater communities. *Ecology.* 2016; 97 (6): 1530–42.
- Jurado V, Laiz Trobajo L, Rodríguez Nava V, et al. Pathogenic and opportunistic microorganisms in caves. *Int J Speleol.* 2010; 39 (1): 15–24.
- Sugita T, Saito M, Ito T, et al. The basidiomycetous yeasts *Cryptococcus diffluens* and *C. liquefaciens* colonize the skin of patients with atopic dermatitis. *Microbiol Immunol.* 2003; 47 (12): 945–50.
- Scanlan PD, Marchesi JR. Micro-eukaryotic diversity of the human distal gut microbiota: qualitative assessment using culture-dependent and-independent analysis of faeces. *ISME J.* 2008; 2 (12): 1183.

Katarina Prosenc Trilar<sup>1</sup>, Nataša Berginc<sup>2</sup>

## Izzivi mikrobiološke obravnave ošpic in drugih vročinskih boleznih z izpuščajem v okoljih z redkimi primeri

### *Challenges of Microbiological Diagnostic of Measles and Other Rash Fevers in Communities with Low Measles Incidence*

#### IZVLEČEK

---

KLJUČNE BESEDE: ošpice, rdečke, eliminacija, diagnostika, serologija, verižna reakcija s polimerazo

Svetovna zdravstvena organizacija vodi program eliminacije ošpic in rdečk. Slovenija je med uspešnejšimi državami pri izvajanju programa. Rdečke niso prisotne že več kot deset let, ošpice se pojavijo občasno kot uvoženi primeri in primeri, ki so z njimi povezani. V okolju s tako nizko incidenco se pojavijo težave pri laboratorijski diagnostiki. Najbolj problematična je diagnostična vrednost pozitivnih rezultatov IgM, saj pozitivna napovedna vrednost testov, ki imajo sicer dobro občutljivost in specifičnost, v okoljih z nizko incidenco zelo pade in lažni pozitivni rezultati testiranja IgM niso izjema. Zato je potrebna posebna pozornost pri interpretaciji teh in tudi rezultatov drugih testiranj, tako pozitivnih kot tudi negativnih. Vedno jih moramo obravnavati skupaj s kliničnimi in epidemiološkimi podatki, cepilnim statusom in podatki o gibanju bolnika v regijah, kjer so endemični tudi drugi povzročitelji podobnih kliničnih slik. V veliko podporo so lahko hkrati rezultati molekularnih testov. Ker so vzroki klinične slike podobne ošpicam in rdečkam številni, je pomembno pomisliti še na druge možne povzročitelje vročinske bolezni z izpuščajem. To pomeni dodatno testiranje in obremenitev laboratorija, a etiološka razjasnitev vsakega suma na ošpice ali rdečke je v času eliminacije izjemno pomembna.

#### ABSTRACT

---

KEY WORDS: measles, rubella, elimination, diagnostics, serology, polymerase chain reaction

The World Health Organisation set a goal to eliminate measles and rubella more than ten years ago. Slovenia is among the most successful countries in implementing the program. There were no rubella cases for over ten years and measles occur only occasionally as imported cases and cases related to these. In an environment with such low incidence, laboratory diagnostic becomes more challenging. The most problematic is

---

<sup>1</sup> Mag. Katarina Prosenc Trilar, univ. dipl. biol., Laboratorij za javnozdravstveno virologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Bohoričeva ulica 15, 1000 Ljubljana; katarina.prosenc@nlzoh.si

<sup>2</sup> Nataša Berginc, univ. dipl. mikrobiol., Laboratorij za javnozdravstveno virologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Bohoričeva ulica 15, 1000 Ljubljana

the diagnostic value of positive IgM results as the positive predictive value of tests, that have otherwise good sensitivity and specificity, decreases substantially in environments with low incidence and false positive results of IgM testing are not an exception. Special attention is therefore needed in the interpretation of these tests and also of results of other tests, both positive and negative. They should always be taken in account together with clinical and epidemiological data, the vaccination status as well as patient's whereabouts in regions where other pathogens causing a similar clinical picture are endemic. Parallel results of molecular testing can offer strong support. As there are numerous reasons for a clinical picture similar to measles and rubella, other rash-fever aetiological agents should also be kept on mind. This entails additional testing and a higher work load for a laboratory, but the etiological clarification of all suspected cases of measles or rubella is extremely important in the elimination phase.

## UVOD

Klinični znaki ošpic (povišana temperatura, makulo-papulozni izpuščaj, kašelj, bolečine v žrelu, izcedek iz nosu, konjunktivitis) so razmeroma nespecifični in pogosto kateri izmed znakov izostane. Potek bolezni je lahko blag, a pri 30 % obolelih pride do zapletov. Pogosti zapleti so driska, bruhanje in dehidracija, vnetje srednjega ušesa, bronhitis, pljučnica in vročinski krči. Občasno se razvije hepatitis, poškodbe vidnih živcev in mišic, meningitis in encefalitis. Redko pride do izgube vida, prizadetosti srca in subakutnega skleroznega panencefalitisa. Okužba v nosečnosti lahko povzroči nizko porodno težo, prezgodnje rojstvo, splav in mrtvorojenost. Smrtnost je 0,01–0,1 %. Največje tveganje za težek potek in smrt je pri otrocih pod 1 letom in pri odraslih nad 30 let starosti. Nekatere skupine so še posebej ogrožene, npr. otroci, okuženi z virusom HIV. Pri njih je smrtnost 50 %. Ošpice povzroča virus ošpic iz rodu *Morbillivirus*, ki je del družine *Paramixoviridae*. Virus rdečk spada v rod *Rubivirus*, ki je del družine *Togaviridae*. V Sloveniji primera rdečk nismo imeli že več kot deset let. Ošpice in rdečke sodijo med viruse, katerih edini gostitelj je človek, okužba ni perzistirajoča in proti njim je na voljo zelo učinkovito in varno cepivo. To so pogoji, ki omogočajo izkoreni-

njenje neke bolezni. Svetovna zdravstvena organizacija (angl. *World Health Organization*, WHO) si je za cilj zadala izkoreninjenje ošpic in kongenitalnih rdečk v štirih od šestih svetovnih regij do leta 2015 in v petih regijah do leta 2020 (1). Do konca leta 2017 je v evropski regiji 37 držav (tudi Slovenija) od 53, kjer so ošpice eliminirane. To pomeni, da so primeri ošpic le še uvoženi ali z njimi povezani (2). Poleg visoke precepljenosti in dobre obveščeniosti javnosti o dobrobitih cepljenja ter tveganjih pri okužbi mora biti eliminacija podprta z občutljivim sistemom spremljanja pojavljanja primerov in s kvalitetnim laboratorijskim spremljanjem (3). Laboratorijsko spremljanje zagotavlja mreža laboratorijev WHO (angl. *The European Measles and Rubella Laboratory Network*), ki jo trenutno sestavlja 72 laboratorijev, katere del je tudi naš laboratorij. Vsi laboratoriji v mreži moramo opraviti letno akreditacijo, ki zajema preverjanje kvalitete izvajanja seroloških in molekularnih metod, pravočasnost izvedbe ter pravočasnost in ustreznost celoletnega poročanja (4).

## LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA OKUŽBE Z OŠPICAMI

Ker klinična slika ošpic pogosto ni dovolj tipična, je laboratorijska potrditev ali ovržba okužbe ključnega pomena, še pose-

bej v okoljih, kjer kroženja ošpic ni več in je večina primerov, ki klinično ustrezajo ošpicam, povzročena z drugimi etiološkimi dejavniki. Tako lahko srečamo ošpicam podoben makulo-papulozni izpuščaj tudi pri rdečkah, parvovirusu B19, humanem herpesvirusu 6 in 7 (HHV6 in HHV7), citomegalovirusu (CMV), virusih coxackiae in pri virusih, na katere moramo biti pozorni pri potnikih (virusi denga, čikungunja, Zika, Zahodnega Nila, Ross River, Sindbis). Podoben izpuščaj se lahko pojavi tudi pri okužbi s *Streptococcus pyogenes* in celo pri alergijah (5, 6).

Akutno okužbo z virusom ošpic lahko dokazujemo neposredno z detekcijo antigena. Virus lahko izoliramo v celični kulturi, kar pa danes zaradi zamudnosti ni metoda izbora v diagnostiki. Drugi neposredni dokaz je določitev virusne RNA v različnih vzorcih. Danes najpogosteje uporabljena za dokaz RNA je verižna reakcija s polimerazo z reverznim prepisom v realnem času (angl. *real-time reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-RT-PCR). Primerni vzorci za to metodo so brisi nosu, žrela, nazofarinksa, Koplikovih peg, slina, urin, serum. Vzorce je treba odvzeti čim prej oz. najkasneje pet dni po nastopu izpuščaja. V urinu lahko RNA ošpic dokažemo še do približno dva tedna po nastopu znakov (7, 8).

Posredno dokazujemo akutno okužbo z virusom ošpic z dokazovanjem zgodnjih (IgM) in/ali poznih (IgG) specifičnih protiteles v serumu. Za dokazovanje protiteles IgM mora biti vzorec odvzet med 4. in 28. dnevom po nastopu bolezni. Za dokazovanje akutne okužbe s protitelesi potrebujemo dva zaporedno odvzeta seruma; med odvzemoma mora preteči 2–3 tedne. Za dokaz IgG ali IgM v serumu najpogosteje uporabljamo encimsko imunoadsorpcijsko preiskavo (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA ali capture-ELISA) (7, 8).

## TEŽAVE PRI LABORATORIJSKI DIAGNOSTIKI OKUŽBE Z OŠPICAMI IN DRUGIMI VIRUSI, KI POVZROČAJO PODOBNO KLINIČNO SLIKO

Kadar smo upoštevali načela dobre laboratorijske prakse in smo v vzorcu dokazali RNA virusa ošpic, lahko z veliko gotovostjo trdimo, da gre za akutno okužbo. Pozorni pa moramo biti na cepilni status bolnika, saj pri majhnem deležu cepljenih (predvsem otrok ob prvem cepljenju) pride do klinične slike, ki ustreza ošpicam. Pri nekaterih od njih lahko virus dokažemo v vzorcih dihal ali urinu tudi več kot mesec dni po cepljenju (9). Za dokončno potrditev, da gre za cepilni virus, je treba s sekveniranjem določiti genotip virusa ošpic (10). Pozorni moramo biti tudi pri negativnem rezultatu PCR. Preveriti moramo čas odvzema, kakovost vzorca in pogoje transporta. Lažno negativen rezultat je lahko tudi posledica nizkega izločanja virusa pri npr. okužbah cepljenih oseb (11).

Dokazana protitelesa IgM v serumu naj bi bila dokaz akutne okužbe z ošpicami, vendar je v okoljih z redkim pojavljanjem ošpic pozitivna napovedna vrednost (PNV) tega testa precej nizka. V primeru pozitivnega rezultata IgM, ki ni podprt z epidemiološko povezavo ali z drugo laboratorijsko metodo (npr. pozitiven PCR), najprej preverimo, ali je bil bolnik v zadnjem mesecu cepljen proti ošpicam in bi to pojasnilo pozitiven rezultat IgM. Lažno pozitiven rezultat je lahko posledica nespecifične reakcije z revmatoidnim faktorjem ali s protitelesi proti drugim mikroorganizmom. V raziskavi v okolju z redkimi primeri so pri 166 simptomatskih bolnikih dokazali protitelesa IgM proti ošpicam in kar 109 (66 %) je bilo lažno pozitivnih. Pri 98 so dokazali okužbo s parvovirusom B19, rdečkami ali HHV6 (5). Podobno so ugotovili v kanadski študiji, kjer so zbrali vzorce s pozitivnim rezultatom IgM za ošpice ali rdečke iz raz-



ličnih laboratorijev in jih ponovno testirali. Potrjeno pozitiven rezultat IgM na ošpice je imelo 319 in na rdečke 282 bolnikov, a po preverjanju podatkov je v resnici šlo za akutno okužbo z ošpicami le v 53 primerih in za rdečke v 5 primerih (12).

Zavedati se moramo, da PNV z nižanjem prevalence obolenja v populaciji pada in ošpice ter rdečke so značilen primer za to. Primer nižanja PNV z nižanjem prevalence je prikazan v tabeli 1.

**Tabela 1.** Primer spremembe PNV pri spremembi prevalence bolezni v populaciji za diagnostični test z 90 % občutljivostjo in 98 % specifičnostjo (5). PNV – pozitivna napovedna vrednost.

Prevalenca <sup>a</sup>	Resnično pozitivni	Lažno negativni	Resnično negativni	Lažno pozitivni	PNV <sup>b</sup>
0,1 %	9	1	990	200	4,3 %
1,0 %	90	10	9.702	198	31 %
10 %	900	100	8.820	180	83 %

<sup>a</sup> Izračun na podlagi prevalence v teoretični populaciji 10.000 ljudi.

<sup>b</sup> Pozitivna napovedna vrednost = Resnično pozitivni / (Resnično pozitivni + Lažno pozitivni).

Kadar pozitiven rezultat IgM na ošpice ali rdečke ni v skladu z epidemiološkimi podatki in cepilnim statusom in kadar nismo dokazali virusne RNA, je smiselno preveriti prisotnost IgM proti drugim virusom, ki lahko povzročajo podobno klinično sliko. V našem okolju je vedno dobro pomisliti še na parvovirus B19 in HHV6. V posamičnih primerih lahko gre tudi za okužbo s HHV7, CMV ali z virusi coxackiae. Pri bolnikih, ki imajo v anamnezi potovanje v kraje, kjer so endemični še drugi virusi, lahko posumimo tudi na okužbe z njimi (npr. virusi denga, čikungunja, Zika, Zahodnega Nila, Ross River, Sindbis). Pomislimo lahko še na okužbo z bakterijo *Streptococcus pyogenes* ali na alergijske izpuščaje (5, 6).

Veliko je primerov navzkrižno pozitivnih rezultatov tudi med drugimi virusi. Okužba s parvovirusom B19 je bila dokazana tudi pri bolnikih z lažno pozitivnimi rezultati testov IgM za viruse Epstein-Barr (EBV), herpes simpleks in HHV6. Lažno pozitivne rezultate testov IgM za EBV (kapsidni antigen) in za CMV opažajo pri 3 % bolnikov z akutno okužbo s HIV in pri

30 % bolnikov z akutno okužbo s hepatitisom A. Navzkrižne serološke reakcije so poznane še pri drugih virusnih in tudi bakterijskih okužbah (5).

Ponovno testiranje istega seruma z drugim testom ELISA običajno ne razjasni rezultata (11, 12). Če imamo možnost pridobiti poleg akutnega še rekonvalescentni serum (odvzet 10–30 dni po akutnem) in v njem dokažemo značilen dvig protiteles IgG, je to lahko podpora potrditvi akutne okužbe (11). Testiranje avidnosti je lahko uporabno za ločevanje nedavne primarne okužbe (nizka avidnost IgG protiteles) od predhodnega stika z virusom ošpic (cepilnim ali ob naravni okužbi), ki rezultira v visoki avidnosti protiteles IgG. Dodatna serološka metoda je še nevtralizacijski test z redukcijo plakov, ki pa je zahteven in se redko izvaja (13).

Dodaten izziv so lažno negativni rezultati IgM, ki so lahko posledica prehitrega ali prepoznega odvzema seruma, določena obolenja in zdravila, ki spremenijo reakcije imunskega sistema, in pa izjemno kratka prisotnost ali celo odsotnost protiteles IgM pri okužbi cepljenih oseb (11, 12).

## IZKUŠNJE V NAŠEM LABORATORIJU

V zadnjih petih letih smo v Laboratoriju za javnozdravstveno virologijo Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) ugotovili tri primere lažno pozitivnih protiteles IgM pri bolnikih s sumom na ošpice. V dveh primerih smo dokazali v istem serumu tudi protitelesa IgM proti rdečkam in proti parvovirusu B19. V kasneje odvzetih parnih serumih istih bolnikov pa smo s povišanjem nivoja IgM in pojavom protiteles IgG proti parvovirusu B19 (IgG v prvem serumu ni bilo) z veliko verjetnostjo potrdili okužbo s parvovirusom B19. V tretjem primeru smo dokazali okužbo s HHV6. Pri enem ovrženem (serološko in PCR) sumu na rdečke smo dokazali okužbo s parvovirusom B19.

V 52 serumih, ki so prišli od bolnikov z vročinsko boleznijo z izpuščajem (ne kot sum na ošpice ali rdečke, ne nosečnice, ne preverjanje ravni protiteles), smo v štirih primerih dokazali okužbo s parvovirusom B19 in v štirih z EBV. V enem primeru smo v akutnem serumu dokazali protitelesa IgM proti rdečkam in proti EBV. S pridobitvijo in testiranjem rekonvalescentnega seruma smo potrdili okužbo z EBV.

V tem obdobju smo dokazali tudi tri primere pojava ošpic po cepljenju. Dva sta imela protitelesa IgM negativna in en primer pozitivna. Pri vseh treh smo s PCR dokazali RNA ošpic v brisu žrela in v dveh z genotipizacijo potrdili, da gre za cepilni sev. V enem primeru genotipizacija zaradi slabšega biološkega materiala ni bila možna, vendar so nastop znakov tri dni po prvem cepljenju in pozitivna protitelesa IgM ter odsotnost stika z divjimi ošpicami govorili v prid cepilnim ošpicam.

Kot zanimivost navajamo, da smo pri enem bolniku s tipično klinično sliko ošpic, katerega vzorce smo prejeli zaradi suma na okužbo z ošpicami (to smo s serološkimi in molekularnimi metodami ovrgli), dokazali virus influence tipa A v brisu žrela.

## ZAKLJUČEK

V okoljih z redkimi primeri je diagnostika ošpic zahtevnejša kot v okoljih, kjer je boleznijo veliko. Kljub serološkim testom z visoko občutljivostjo in specifičnostjo ELISA, ki so na tržišču, je treba predvsem rezultate dokazovanja protiteles IgM interpretirati ob uporabi dodatnih testiranj, glede na cepilni status in vedno glede na epidemiološke in klinične podatke. V populaciji, kjer so ošpice in rdečke odpravljene, se PNV sicer dobro občutljivih in specifičnih seroloških testov drastično zmanjša. Nizka PNV ima vpliv tako na diagnostiko za posameznika kot tudi na definicijo potrjenega primera za spremljanje. Tako so npr. v zvezni državi Ontario v Kanadi leta 2014 definicijo spremenili tako, da samo pozitiven rezultat dokazovanja IgM protiteles ne potrdi primera ošpic ali rdečk, če ni podprt z epidemiološko povezavo z drugim primerom, potovanjem v endemično območje ali z detekcijo virusne RNA s PCR (12).

Dodatna testiranja, ki so pogosto potrebna za potrditev ali ovržbo okužbe z ošpicami ali rdečkami, predstavljajo materialno breme za laboratorij in včasih tudi podaljšujejo čas do dokončnega rezultata, za katerega si sicer v laboratorijih prizadevamo, da bi bil čim krajši in bi omogočil pravočasne javnozdravstvene ukrepe.

V Laboratoriju za javnozdravstveno virologijo NLZOH obveščamo in spodbujamo zdravnike, ki posumijo na okužbo z ošpicami ali rdečkami, da vzamejo vzorce tako za serologijo (kri) kot za molekularno dokazovanje virusne RNA (respiratorni bris, urin) v ustreznem obdobju boleznijo. S tem povečamo možnost uspešne in zanesljive potrditve ali ovržbe okužbe, ki je pomembna za posameznika in nujna za izvajanje ustreznih epidemioloških ukrepov za preprečitev širjenja (iskanje kontaktov, postekspozicijsko cepljenje, aplikacija imunoglobulinov specifičnim posameznikom,

preverjanje cepilnih statusov). Vse pozitivne primere, kjer dokažemo prisotnost RNA v vzorcih dihal ali urinu, tudi genotipiziramo in genotip primerjamo z genotipi ošpic, ki krožijo v bližnjih državah, Evropi in svetu. Pri vseh nedorečenih primerih skušamo skupaj s kliniki in epidemiologi dognati, kaj je povzročilo ošpicam ali rdečkam podobno klinično sliko. Posebej v obdobjih, ko je primerov izredno malo ali jih ni, je pomembno nadomestno spremljanje. V našem laboratoriju spremljamo primere vročinske bolezni z izpuščajem, ki »spominjajo na ošpice ali rdečke«. V teh primerih ne pri-

čakujemo pozitivnega rezultata na ošpice ali rdečke. Z diferencialno diagnostiko preverjamo in potrjujemo, da ošpice in rdečke v populaciji niso prisotne ter ponovno ugotavljamo možne etiološke vzroke določene klinične slike.

V času, ko so ošpice in rdečke pri nas le še zelo redek pojav, je izredno pomembno, da zagotovimo odvzem vzorcev in laboratorijsko testiranje brez finančne bremenitve pošiljatelja, saj je ovržba ali potrditev okužbe nujna za spremljanje in obvladovanje teh dveh bolezni na poti k njuni evropski in svetovni eliminaciji.

## LITERATURA

1. World Health Organisation. Measles vaccines: WHO position paper – April 2017. Weekly epidemiological record. 2017; 17 (92): 205–28.
2. WHO Regional Office for Europe. 7th meeting of the European Regional Verification Commission for Measles and Rubella Elimination (RVC) – Report; 2018 Jun 13–15; Paris, France, c2018.
3. WHO Regional Office for Europe. Eliminating measles and rubella. Framework for the verification process in the WHO European Region [internet]. WHO; 2014 [citirano 2018 Oct 23]. Dosegljivo na: [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0009/247356/Eliminating-measles-and-rubella-Framework-for-the-verification-process-in-the-WHO-European-Region.pdf?ua=1](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0009/247356/Eliminating-measles-and-rubella-Framework-for-the-verification-process-in-the-WHO-European-Region.pdf?ua=1)
4. WHO Regional Office for Europe. Measles and rubella laboratory network [internet]. WHO; 2016 [citirano 2018 Oct 23]. Dosegljivo na: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/measles-and-rubella/activities/measles-and-rubella-laboratory-network>
5. Woods CR. False-positive results for immunoglobulin M serologic results: explanations and examples. J Ped Infect Dis Society. 2013; 2 (1): 87–90.
6. Kang JH. Febrile illness with skin rashes. Infect Chemoter. 2015; 47: 155–66.
7. Tipples G, Hiebert J. Detection of measles, mumps, and rubella viruses. Methods Mol Biol. 2011; 665: 183–93.
8. World Health Organisation. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection [internet]. WHO; 2007 [citirano 2018 Oct 23]. Dosegljivo na: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70211/WHO\\_IVB\\_07.01\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70211/WHO_IVB_07.01_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
9. Murti M, Krajden M, Petric M, et al. Case of vaccine-associated measles five weeks post-immunisation, British Columbia, Canada, October 2013. Euro Surveill. 2013; 18 (49): 1–3.
10. Santibanez S, Hübschen JM, Ben Mamou MC, et al. Molecular surveillance of measles and rubella in the WHO European Region: new challenges in the elimination phase. Clin Microb Infect. 2017; 23 (8): 516–23.
11. Hübschen JM, Bork SM, Brown KE, et al. Challenges of measles and rubella laboratory diagnostic in the era of elimination. Clin Microb Infect. 2017; 23: 511–5.
12. Bolotin S, Lim G, Dang V, et al. The utility of measles and rubella IgM serology in an elimination setting, Ontario, Canada, 2009–2014. PLoS ONE. 2011; 12(8): e0181172.
13. Sowers SB, Rota JS, Hickman CJ, et al. High concentrations of measles neutralizing antibodies and high-avidity measles IgG accurately identify measles reinfection cases. Clin Vaccine Immunol. 2016; 23: 707–16.

Nataša Berginc<sup>1</sup>, Vesna Šubelj<sup>2</sup>, Katarina Prosenc Trilar<sup>3</sup>

## Spremljanje enterovirusnih okužb v času izkoreninjenja in po izkoreninjenju poliovirusov

### *The Importance of Enterovirus Surveillance in the Period of Polio Eradication and After it*

#### IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: poliovirus, enterovirus, breme okužbe, spremljanje, laboratorijske metode

Poliovirusi so kot povzročitelji poliomyelitisa v preteklosti v svetu predstavljali veliko javnozdravstveno breme. Z uporabo cepiva in z laboratorijskim spremljanjem smo jih pod nadzorom Svetovne zdravstvene organizacije skoraj izkoreninili. V populaciji in v okolju pa so zaradi uporabe živega atenuiranega cepiva še prisotni iz cepiva izvirajoči poliovirusi. To zahteva ohranitev predpisanega laboratorijskega spremljanja poliovirusov tudi v določenem obdobju po njihovem izkoreninjenju. Enterovirusi so kot ubikvitarni virusi eni najpogostejših patogenov pri ljudeh, ki povzročajo številna obolenja različnih težavnosti pri posameznikih ali v izbruhih. Tiste vrste oz. genotipi enterovirusov, ki povzročajo težja obolenja ali izbruhe, predstavljajo večje javnozdravstveno breme. Proti tem enterovirusom razvijajo specifična protivirusna zdravila in cepiva. Zato je vedenje o kroženju, patogenosti in drugih lastnostih enterovirusov, ki ga lahko pridobimo iz učinkovitega, proaktivnega in relativno harmoniziranega sistema spremljanja, ki temelji na robustnih in sodobnih laboratorijskih metodah, potrebno za oblikovanje ustreznih javnozdravstvenih ukrepov.

#### ABSTRACT

KEY WORDS: poliovirus, enterovirus, infection burden, surveillance, laboratory methods

Polioviruses, as causative agents of poliomyelitis, presented a great global public health burden in the past. By using vaccines and laboratory surveillance they have been almost eradicated under the supervision of the World Health Organisation. But due to the use of live attenuated polio vaccines, vaccine derived polioviruses are still present in the population and in the environment. Therefore, a global laboratory system for the surveillance of polioviruses must be maintained for a certain period after their eradication.

<sup>1</sup> Nataša Berginc, univ. dipl. mikr., Laboratorij za javnozdravstveno virologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Bohoričeva ulica 15, 1000 Ljubljana; [natasa.berginc@nlzoh.si](mailto:natasa.berginc@nlzoh.si)

<sup>2</sup> Vesna Šubelj, univ. dipl. mikr., Laboratorij za javnozdravstveno virologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Bohoričeva ulica 15, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Mag. Katarina Prosenc Trilar, univ. dipl. biol., Laboratorij za javnozdravstveno virologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Bohoričeva ulica 15, 1000 Ljubljana

Enteroviruses are, as ubiquitous viruses, one of the most frequent human pathogens, causing a range of diseases of diverse severity in individuals or in outbreaks. The types or genotypes of enteroviruses which are causing severe diseases or outbreaks pose a greater public health burden. Specific antiviral drugs and vaccines are being developed against these enteroviruses. For this reason, the knowledge on circulation, pathogenicity and other characteristics of enteroviruses we can gather with an effective, pro-active and harmonised surveillance system, based on robust and modern laboratory methodology, is needed to form appropriate public health measures.

## UVOD

Poliovirusi (PV) so kot povzročitelji poliomielitisa ali otroške paralize v preteklosti globalno predstavljali veliko javnozdravstveno breme (1). Pod nadzorom Svetovne zdravstvene organizacije (angl. *World Health Organization*, WHO), s programirano uporabo cepiva proti PV in z ustreznim laboratorijskim spremljanjem PV je danes večina držav v svetu razglašena za PV proste države in PV so globalno skoraj izkoreninjeni iz populacije in iz okolja (1). Hkrati narašča vedenje in zavedanje o javnozdravstvenem bremenu drugih vrst enterovirusov (EV), zato strokovna javnost zagovarja potrebo po vzpostavitvi robustnega in proaktivnega sistema spremljanja EV z namenom vzpostavitve ustreznih javnozdravstvenih ukrepov, ko/kjer so ti potrebni (2).

## ENTEROVIRUSI

Rod EV trenutno sestavlja 15 vrst: EV A–L in rinovirusi (RV) A–C (3). Sodijo v obširno virusno družino *Picornaviridae*, ki združuje majhne viruse (približno 30 nm premera) z genomom iz monopartitne, linearne, enovijačne, pozitivno orientirane RNA, velikosti 7–8 kilobaz, ki ga ščiti ikozaedrična kapsida brez ovojnice (4). Klasifikacija EV v genotipe poteka na osnovi primerjave nukleotidnih zaporedij regije genoma, ki nosi zapis za sintezo strukturne beljakovine VP1: EV-A sestavlja 25 genotipov, EV-B 63 genotipov, EV-C 23 genotipov in EV-D 5 genotipov (4).

EV vrst A–D so ubikvitarni človeški patogeni (5). Prenašajo se kapljično ali oralno-fekalno in povzročajo številna obolenja različnih težavnosti (2). Povzročajo obolenja pri posameznikih, pogosto pa so povzročitelji izbruhov. V vzorcih bolnikov jih lahko določimo skozi vse leto, običajno pa izražajo sezonski vzorec pojavljanja od pozne pomladi do jeseni (5).

## POLIOVIRUSI IN PROGRAM IZKORENINJENJA POLIOVIRUSOV

PV (divji serotipi 1, 2, 3) sodijo v vrsto EV-C in so povzročitelji poliomielitisa oziroma otroške paralize. Najpogosteje zbolijo otroci stari do 5 let, pri 1 od 200 okuženih pride do nepovratne doživljenjske paralize, od teh pa jih 5–10 % umre zaradi paralize dihalnih mišic. Zdravila za otroško paralizo ni, obstaja pa cepivo proti otroški paralizi (1). Po okužbi s PV (naravni ali s cepljenjem) se pri ljudeh razvije doživljenjska imunost, vendar zaščita pred enim serotipom, podobno kot pri drugih EV, ne zagotavlja zaščite proti ostalima dvema (6).

PV kapljično ali oralno-fekalno prenašajo izključno okuženi posamezniki. Pri ljudeh povzročajo akutno in nepersistirajočo okužbo. Človek je edini rezervoar PV, ki v okolju samostojno lahko preživijo le omejeno količino časa. S cepivom, ki zagotavlja doživljenjsko imunost, lahko učinkovito preprečimo njihovo kroženje v populaciji. Tako so izpolnjeni biološki principi za izkoreninjenje PV (7). Zato je WHO leta 1988

začela program za izkoreninjenje PV (angl. *Global Poliovirus Eradication Initiative*, GPEI), ki je v 30 letih dosegel pomembne rezultate. Število okuženih oseb se je zmanjšalo za več kot 99 % (350.000/leto v 1988, v primerjavi z 22/leto v 2017), število endemičnih držav pa s 125 na 3 (Afganistan, Pakistan in Nigerija) (1). Divji PV 2 je iz populacije in okolja odsoten od oktobra 1999, zato je globalna komisija za certifikacijo izkoreninjenja poliomielitisa (angl. *Global Commission for the Certification of the Eradication of Poliomyelitis*) septembra 2015 tudi uradno razglasila izkoreninjenje divjega PV 2. Divji PV 3 je iz populacije in okolja odsoten od novembra 2012, ko je bil identificiran zadnji primer tovrstne okužbe v Nigeriji. Predpostavljamo, da je trenutno v populaciji in okolju prisoten le še divji PV 1, pa še ta le na omejenem geografskem območju (1, 8).

Uporabljata se dve vrsti cepiva, oralno živo atenuirano cepivo (razvito leta 1961; trivalentno cepivo: sevi po Sabinu 1, 2, 3; od aprila 2016 se uporablja izključno dvovalentno cepivo: sevi po Sabinu 1 in 3) in parenteralno inaktivirano cepivo, razvito leta 1955 (6, 8, 9). Uporaba živega atenuiranega cepiva se je izkazala za dvorezni meč, saj se v cepljenih osebah živi atenuirani PV lahko namnožujejo in se nato z izločki sproščajo v okolje v obliki iz cepiva izvirajočih PV (angl. *vaccine derived poliovirus*, VDPV); ti lahko krožijo v okolju in so potencialno patogeni, zato lahko povzročajo obolenja pri posameznikih ali izbruhe v populaciji, predvsem tam, kjer je precepljenost s cepivom proti PV slabša (angl. *vaccine-associated paralytic polio*, VAPP) (5, 8). Znano je, da so atenuirani Sabinovi sevi genetsko nestabilni, zato prihaja do genetskih rekombinacij z drugimi EV, predvsem tistimi iz iste vrste EV-C in na ta način do razvoja novih, za ljudi potencialno patogenih sevov (2, 4–6, 8).

Pomemben del programa za izkoreninjenje PV vse od začetka predstavlja laboratorijsko virološko spremljanje kroženja

PV v populaciji in v okolju, saj hitra in specifična diagnostika PV omogoča učinkovite javnozdravstvene ukrepe za preprečevanje širjenja okužbe. V ta namen je WHO razvila mrežo referenčnih regionalnih in nacionalnih laboratorijev, ki z vsakoletno akreditacijo WHO dokazujejo visoko sposobnost dokazovanja EV in PV v vzorcih. Zlati standard predstavlja spremljanje bolnikov z akutno ohlapno paralizo, pri katerih se s predpisanimi specifičnimi izolacijskimi, serološkimi in molekularnimi metodami dokazuje prisotnost/odsotnost EV in PV v predpisanih vzorcih. Kriterij občutljivosti spremljanja zahteva analizo vsaj dveh bolnikov z akutno ohlapno paralizo na 100.000 otrok mlajših od 15 let na leto. V procesu izkoreninjenja PV so potrebne prilagoditve laboratorijskega virološkega spremljanja kroženja PV. Pogosta težava (tudi v Sloveniji) je, da številne države, ki so PV proste, ne uspejo zadostiti kriteriju občutljivosti predpisane vrste spremljanja, zato glede na situacijo in možnosti, poleg spremljanja bolnikov z akutno ohlapno paralizo, izvajajo dopolnilna oz. nadomestna spremljanja. Tako je npr. spremljanje EV v odpadnih vodah ali v rezidualnem blatu otrok, mlajših od 15 let. Tudi v času, ko se približujemo izkoreninjenju PV, ko se opušča uporaba oralnega živega atenuiranega cepiva in še nekaj časa po izkoreninjenju PV, bo treba vzdrževati visoko usposobljenost referenčnih regionalnih in nacionalnih laboratorijev v programu WHO, saj je nujno, da so, z namenom hitrega in ustreznega javnozdravstvenega ukrepanja, vse države, tudi tiste, ki so PV proste, sposobne zaznati in določiti iz cepiva izvirajoče PV, ki so lahko prisotni v okolju kot posledica pretekle uporabe oralnega živega atenuiranega cepiva ali morebiten vnos divjih ali iz cepiva izvirajočih PV iz drugih geografskih območij (5).

## OBVLADOVANJE OKUŽB Z ENTEROVIRUSI

EV so v svetu endemični, sodijo med najpogostejše povzročitelje obolenj pri posameznikih, povzročajo pa tudi izbruhe (11, 12). Okužbe z EV so pogosto asimptomatske, lahko pa povzročajo obolenja, kot so meningitis in meningoencefalitis, akutna ohlapna paraliza in akutni ohlapni mielitis, boleznj z izpuščajem (npr. bolezen rok, nog in ust), okužbe zgornjih in spodnjih dihal, miokarditis in neonatalno sepsa (2, 5, 13). EV povzročajo blažja ali težja obolenja, slednja so pogosta pri novorojenčkih in majhnih otrocih (14). Različni genotipi EV povzročajo določeno klinično sliko; isti genotip EV lahko povzroča različne klinične slike (4).

Virusi iz vrste EV-A so v več kot 90 % povzročitelji boleznj rok, nog in ust, če je povzročitelj EV; možni so zapleti v obliki encefalitisa in aseptičnega meningitisa. Najpogostejši povzročitelji so EV-A71, ki pogosto povzročajo težja in CV-A16, ki običajno povzročajo blažja obolenja. V vse večjem deležu ju nadomeščata CV-A6 in CV-A10 (12). Globalno EV-A prevladujejo v Aziji in ob Pacifiku, kjer povzročajo večje izbruhe boleznj rok, nog in ust, predvsem med otroci in predstavljajo pomemben javnozdravstveni problem (12, 15).

V preteklem obdobju so bile številne klinične študije usmerjene v raziskovanje genotipov EV, ki povzročajo težje okužbe osrednjega živčnega sistema, predvsem pri novorojenčkih in majhnih otrocih, pri katerih lahko pride do trajnih posledic ali smrti, posebej če do okužbe pride v prvem letu življenja (14, 16). Ocenjuje se, da različni genotipi EV, pogosto iz vrste EV-B (npr. E-30), povzročijo do 90 % aseptičnih meningitisov pri otrocih in do 77 % aseptičnih meningitisov pri odraslih, če je bil povzročitelj določen (14, 17, 18). Globalno so EV, ki povzročajo meningitise prevladujoči v ZDA in v Evropi (12). Med EV iz vrste EV-B so tudi

številni povzročitelji encefalitisa (pogosto CV-B5) in miokarditisa (pogosto CV-B3), pa tudi respiratornih in gastrointestinalnih obolenj (12, 17).

Zaradi pogostih mutacij in rekombinacij med EV so pogosta odkritja novih genotipov (4, 16, 17). V preteklem obdobju so tako identificirali številne nove genotipe znotraj vrste EV-C (C104, C105, C109, C117), ki večinoma povzročajo respiratorna obolenja različnih težavnosti, v redkih primerih pa lahko napredujejo v akutno ohlapno paralizo (4, 17). Možna je tudi genetska rekombinacija z divjimi in iz cepiva izvirajočimi PV, ki so ravno tako predstavniki vrste EV-C, na ta način pa do razvoja novih, potencialno patogenih sevov PV (2, 4, 5, 8, 10).

Od leta 2012 se je v populaciji ponovno pojavil genotip EV-D68 iz vrste EV-D, ki so ga prvič identificirali leta 1962 (19). Avgusta 2014 so v ZDA zaznali porast okužb z EV-D68 pri otrocih (velik delež je bilo otrok z astmo) s težjim respiratornim obolenjem, pri določenih pa se je v nadaljevanju razvil poliomielitisu podoben akutni ohlapni mielitis in doživljenjska paraliza (19–21). Primeri so dokazali še v Kanadi, Evropi in Aziji ter v letu 2014 celokupno zabeležili več kot 2.000 primerov okužb v 20 državah (19). Leta 2016 so identificirali nov sev EV-D68 (B3), ki je bil povezan s težjimi respiratornimi in nevrološkimi obolenji (16). Potrebne so dodatne preiskave za potrditev ali gre pri EV-D68 za dvoletni vzorec pojavljanja. Vsekakor pa sta identifikacija dejavnikov tveganja za težji potek okužbe in vzorcev pojavljanja EV-D68 pomembni informaciji za razvoj ustreznih javnozdravstvenih ukrepov (22).

Za zdravljenje okužb z EV uradno še ni bilo odobreno nobeno specifično protivirusno zdravilo. V fazi razvoja in testiranja so številna specifična protivirusna zdravila, ki delujejo bodisi na ravni zaviranja virusnih procesov, bodisi na ravni zaviranja gostiteljskih dejavnikov, ki sodelujejo v virusni

replikaciji. Teži se k razvoju protivirusnih zdravil s čim širšim spektrom delovanja na EV (13). Za enkrat ostaja zdravljenje večino-ma simptomatsko (14, 16).

Poleg cepiv proti PV, je v nekaterih azijskih državah (npr. Kitajska od leta 2015) uradno odobreno cepivo proti EV-A71. V fazi razvoja in testiranja so številna cepiva proti različnim tipom EV, predvsem tistim, za katere je znano, da povzročajo težja obolenja ali izbruhe (12). Zaradi številnih (sero/geno) tipov EV (nad 100) razvoj cepiva širokega spektra za zaščito populacije pred okužbo z EV ni možen (13). Teži pa se k razvoju polivalentnih cepiv, ko je z enim cepljenjem možna zaščita proti več (sero/geno)tipom EV (12).

## **SPREMLJANJE ENTEROVIRUSNIH OKUŽB**

Leta 2015 je WHO skupaj z ameriškim Centrom za nalezljive bolezni (angl. *Center for Disease Control*, CDC) izdala priporočila za spremljanje ter laboratorijske protokole za detekcijo in identifikacijo PV in EV v vzorcih bolnikov z namenom (5, 13, 15):

- hitrega javnozdravstvenega ukrepanja v primeru izbruhov okužb z EV,
- odkrivanja novih EV in proučevanja EV, ki povzročajo težja obolenja,
- za proučevanje bremena okužb z EV z namenom dolgoročnega načrtovanja javnozdravstvenih ukrepov in
- kot podpora razvoja protivirusnih zdravil in cepiv.

Poleg spremljanja okužb pri ljudeh, WHO priporoča spremljanje odpadnih vod na prisotnost PV, iz cepiva izvirajočih PV in EV, saj se je izkazalo za občutljiv sistem spremljanja kroženja teh virusov v okolju in v populaciji (16, 23).

Večina držav v praksi ne izvaja aktivnega spremljanja EV, saj je aktivno spremljanje še vedno omejeno na spremljanje PV v regionalnih in nacionalnih referenčnih la-

boratorijih (11). Večinoma je vzpostavljeno prostovoljno, regionalno ali nacionalno pasivno zbiranje podatkov o detekcijah EV in njihovi serološki ali genetski identifikaciji v diagnostičnih vzorcih bolnikov, zato je tudi breme okužb z EV na osnovi teh podatkov verjetno ocenjeno prenizko (11, 16). Zaradi vedno bolj razvidnega javnozdravstvenega bremena EV se v strokovni javnosti zagovarja potrebo po razvoju in vzpostavitvi robustnih in učinkovitih sistemov za proaktivno zbiranje čim bolj harmoniziranih viroloških in epidemioloških podatkov za podporo javnozdravstvenim ukrepom na področju okužb z EV, pa tudi okužb s sorodnimi RV in s humanimi parehovirusi (11).

## **LABORATORIJSKE METODE ZA SPREMLJANJE ENTEROVIRUSOV**

Na voljo so številne metode za detekcijo in karakterizacijo PV in EV, vključno z laboratorijskimi protokoli, ki sta jih objavila WHO in CDC (5, 11). V začetku 2018 je mednarodna skupina strokovnjakov objavila priporočila za detekcijo in karakterizacijo EV (2). Zlati standard za detekcijo EV so že nekaj časa molekularne metode za amplifikacijo nukleinskih kislin (reverzni prepis in PCR), saj so visoko občutljive in specifične ter hitre (2). Za široko spektralno diagnostiko EV se kot tarča najpogosteje uporablja konzervativna 5' neprepisujoča se regija genoma (2). Genotipska karakterizacija temelji na sekveniranju odseka nukleotidnega zaporedja gena za sintezo VP1 (450 nt), genotip EV lahko nato določimo s številnimi prosto dostopnimi bioinformatičnimi programi (2, 24). Za določitev novih genotipov EV, ki jih potrjuje študijska skupina za pikornaviruse pri Mednarodnem komiteju za taksonomijo virusov (angl. *International Committee for Taxonomy of Viruses*, ICTV), je potrebna sekvenca celotnega nukleotidnega zaporedja gena za sintezo VP1 (900 nt). Za spremljanje EV razvijajo tudi metode sekveniranja nove generacije – eden prvih



poskusov je uporaba metode sekveniranja nove generacije v spremljanju odpadnih vod, ki v pregledanih vzorcih odplak omogoča detekcijo EV vseh štirih vrst, ki okužujejo ljudi (16).

Konvencionalne metode, kot so npr. mikroskopiranje, izolacija virusov v celičnih kulturah in identifikacija virusnih izolatov z nevtralizacijskimi testi ter serološke metode, se v diagnostiki EV ne uporabljajo. So pa še vedno aktualne v predpisanem laboratorijskem spremljanju v procesu izkoreninjenja PV in v raziskovalne namene (2).

Diagnostični vzorci, primerni za laboratorijsko ugotavljanje povzročitelja pri bolnikih s sumom na okužbo z EV, so odvisni od klinične slike. Glede na to se priporoča odvzem vsaj enega od vzorcev: likvor, blato, respiratorni vzorec, manj pogosto tudi urin in kri (2). Pri tem je potrebno upoštevati posebnosti, kot je npr. dejstvo, da številnih EV, predvsem vrst EV-C in EV-D, ki povzročajo respiratorna obolenja, običajno ne detektiramo v blatu (4, 16). Pri snovanju sistema spremljanja EV okužb je zato treba posebno pozornost posvetiti tudi opredelitvi nabora ustreznih vrst kliničnih vzorcev (11).

## ZAKLJUČEK

Program izkoreninjenja PV pod okriljem WHO je v 30 letih dosegel dobre rezultate: PV so globalno skoraj izkoreninjeni iz populacije in okolja. Zaradi uporabe oralnega živega atenuiranega cepiva, v populaciji in okolju lahko krožijo sevi, ki izvirajo iz

cepiva in so potencialno patogeni. Tudi zaradi tega, bo treba do izkoreninjenja divjih PV in v začetnem obdobju po izkoreninjenju divjih PV ohraniti visoko raven usposobljenosti regionalnih in nacionalnih referenčnih laboratorijev za spremljanje PV in EV v populaciji in okolju.

EV so, kot ubikvitarni virusi, eni najpogostejših patogenov pri ljudeh: povzročajo številna obolenja različnih težavnosti; povzročajo obolenja pri posameznikih ali izbruhe. V zadnjem obdobju je bilo veliko raziskav usmerjenih v preučevanje tistih EV, ki povzročajo težja obolenja in izbruhe ter tako predstavljajo večje javnozdravstveno breme. Proti EV razvijajo specifična širokospektralna protivirusna zdravila in proti določenim EV razvijajo cepiva. Zato je vedenje o EV, ki ga je mogoče pridobiti iz učinkovitega, proaktivnega sistema spremljanja EV potrebno in javnozdravstveno pomembno. Kot ustreza rešitev spremljanja kroženja EV v populaciji in okolju se izkazuje kombinacija proaktivnega spremljanja bolnikov in spremljanja odpadne vode. Sodobne laboratorijske metode omogočajo hitro detekcijo in karakterizacijo EV ter so podlaga za izoblikovanje robustnega sistema spremljanja. WHO in CDC sta objavila protokole za detekcijo in karakterizacijo PV in EV. Mednarodna skupina strokovnjakov je, z namenom pridobivanja čim bolj harmoniziranih podatkov na mednarodnem nivoju, izdala priporočila za detekcijo in karakterizacijo EV.

## LITERATURA

1. WHO. Poliomyelitis [internet]. WHO; 2018 [citirano 2018 Nov 11]. Dosegljivo na: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/poliomyelitis>
2. Harvala H, Broberg E, Benschop K, et al. Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *JCV*. 2018; 101: 11–7.
3. ICTV. Genus: Enterovirus [internet]. ICTV; c2017 [citirano 2018 Nov 11]. Dosegljivo na: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/picornavirales/w/picornaviridae/681/genus-enterovirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/picornavirales/w/picornaviridae/681/genus-enterovirus)
4. Van Leer-Buter CC, Poelman R, Borger R, et al. Newly identified enterovirus C genotypes, identified in the Netherlands through routine sequencing of all enteroviruses detected in clinical materials from 2008 to 2015. *J Clin Microbiol*. 2016; 54 (9): 2306–14.

5. CDC. Enterovirus surveillance guidelines – guidelines for enterovirus surveillance in support of the Polio Eradication Initiative [internet]. CDC, WHO; 2015 [citirano 2018 Nov 11]. Dosegljivo na: [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0020/272810/EnterovirusSurveillanceGuidelines.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0020/272810/EnterovirusSurveillanceGuidelines.pdf)
6. WHO. Immunization, vaccines, biologicals [internet]. WHO; 2018 [citirano 2018 Nov 11]. Dosegljivo na: <http://www.who.int/immunization/diseases/poliomyelitis/en/>
7. Dowdle WR, Birmingham ME. The biologic principles of poliovirus eradication. *JID*. 1997; 175 (Suppl 1): S286–92.
8. Patel M, Cichi S. Addressing the challenges and opportunities of the polio endgame: lessons for the future. *JID*. 2017; 216 (Suppl 1): S1–8.
9. WHO. Biologicals – poliomyelitis [internet]. WHO; 2018 [citirano 2018 Nov 11]. Dosegljivo na: <https://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/polio/en/>
10. Bessaud M, Joffret ML, Blondel B, et al. Exchanges of genomic domains between poliovirus and other cocirculating species C enteroviruses reveal a high degree of plasticity. *Sci Rep*. 2016; 6: 38831.
11. Holm-Hansen CC, Midgley SE, Schjorring S, et al. The importance of enterovirus surveillance in a Post-polio world. *Clin Microbiol Infect*. 2017; 23 (6): 352–4.
12. Mao Q, Wang Y, Bian L, et al. EV-A71 vaccine licensure: a first step for multivalent enterovirus vaccine to control HFMD and other severe diseases. *Emerg Microbes Infect*. 2016; 5 (7): e75.
13. Bauer L, Lyoo H, van der Schaar HM, et al. Direct-acting antivirals and host-targeting strategies to combat enterovirus infections. *Curr Opin Virol*. 2017; 24: 1–8.
14. De Crom SCM, Rossen JWA, van Furth AM, et al. Enterovirus and parechovirus infection in children: a brief overview. *Eur J Pediatr*. 2016; 175: 1023–9.
15. Takahashi S, Metcalf CJE, Arima Y, et al. Epidemic dynamics, interactions and predictability of enteroviruses associated with hand, foot and mouth disease in Japan. *J R Soc Interface*. 2018; 15 (146).
16. Majumdar M, Martin J. Detection by Direct Next Generation Sequencing Analysis of Emerging Enterovirus D68 and C109 Strains in an Enterovirus Sample From Scotland. *Front Microbiol*. 2018; 9: 1–11.
17. Royston L, Tapparel C. Rhinoviruses nad respiratory enteroviruses: not as simple as ABC. *Viruses*. 2016; 8, 16.
18. Ahlbrecht J, Hillebrand LK, Schwenkenbecher P, et al. Cerebrospinal fluid features in adults with enterovirus nervous system infection. *Int J Infect Dis*. 2018; 68: 94–101.
19. Holm-Hansen CC, Midgley SE, Fischer TK. Global emergence of enterovirus D68: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2016; 16 (5): e64–e74.
20. Poelman R, Schuffenecker I, Van Leer-Buter C, et al. European surveillance for enterovirus D68 during the emerging North-American outbreak in 2014. *J Clin Virol*. 2015; 71:1–9.
21. Greninger AL, Naccache SN, Messacar K, et al. A novel outbreak enterovirus D68 strain associated with acute flaccid myelitis cases in the USA (2012–2014): a retrospective study. *Lancet Infect Dis*. 2015; 15 (6): 671–82.
22. Kramer R, Sabatier M, Wirth T, et al. Molecular diversity and biennial circulation of enterovirus D68: a systematic screening study in Lyon, France, 2010 to 2016. *Euro Surveill*. 2017. 23 (37): 1700711.
23. Asghar H, Diop OM, Weldegebriel G, et al. Environmental surveillance for polioviruses in the Global Polio Eradication Initiative. *J Infect Dis*. 2014; 210 (Suppl 1): S294–303.
24. Kroneman A, Vennema H, Deforche K, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol*. 2011; 51 (2): 121–5.
25. Messacar K, Asturias EJ, Hixon AM, et al. Enterovirus D68 and acute flaccid myelitis – evaluating the evidence for causality. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18 (8): e239–e247.



Katarina Prosenc Trilar<sup>1</sup>, Nataša Berginc<sup>2</sup>

## Epidemije in pandemije gripe – sto let od pandemije španske gripe

### *Influenza Epidemics and Pandemics – One Hundred Years from Pandemic of Spanish Influenza*

#### IZVLEČEK

---

KLJUČNE BESEDE: gripa, pandemija, epidemija, španska gripa

Gripa je virusna nalezljiva bolezen z značilno klinično sliko, ki spremlja človeštvo že 500 let ali več in ki vsako leto povzroča epidemije, ki predstavljajo veliko javnozdravstveno breme. V svetovnem merilu letno gripo s težkim potekom preboleva 3–5 milijonov ljudi, 290.000–650.000 jih zaradi gripe umre. Gripa je pomemben vzrok odsotnosti z dela in predstavlja veliko obremenitev zdravstvenega sistema. Občasno, kadar se pojavi dovolj spremenjen virus influence, pa povzroči pandemijo, kar pomeni izjemno hitro širjenje izbruhov, višjo stopnjo obolevnosti, višjo smrtnost, prizadetost neobičajnih starostnih skupin in še dodatno povečano breme za zdravstvene sisteme. Domnevamo, da za izbruhe leta 1580 že lahko z gotovostjo trdimo, da je šlo za pandemijo gripe. Potem sledijo vedno kvalitetnejši opisi pandemij, a razvoj znanosti je omogočil dokaz virusa gripe šele v vzorcih, ki izvirajo iz pandemije leta 1918; španske gripe. Letos mineva 100 let od španske gripe, ki je bila najhujša pandemija v tem času. V prispevku opisujemo še značilnosti drugih pandemij, predvsem iz 20. in 21. stoletja.

#### ABSTRACT

---

KEY WORDS: influenza, pandemic, epidemic, Spanish flu

For at least five centuries influenza has been a clinically distinct contagious viral disease, every year causing epidemics which pose a considerable public health burden. Globally, 3–5 million people are stricken with the severe clinical course of influenza infection and there are 290,000–650,000 influenza related deaths annually. Influenza is an important cause of work absenteeism and poses a great burden on health systems. Occasionally, when a sufficiently distinct virus appears, it causes a pandemic, that is, fast spread of outbreaks, higher morbidity and mortality, it affects unusual age groups and poses an even greater burden on health systems. The first pandemic that we can consider with quite some certainty as a real influenza pandemic happened in 1580, followed by increasin-

---

<sup>1</sup> Mag. Katarina Prosenc Trilar, univ. dipl. biol., Laboratorij za javnozdravstveno virologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Bohoričeva ulica 15, 1000 Ljubljana; katarina.prosenc@nlzoh.si

<sup>2</sup> Nataša Berginc, univ. dipl. mikrobiol., Laboratorij za javnozdravstveno virologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Bohoričeva ulica 15, 1000 Ljubljana

gly better descriptions of pandemics, but the progress of science provided first proof of the influenza virus only in specimens from the 1918 pandemic, namely, the Spanish flu. This year marks the centenary of the Spanish flu which was the worse pandemic of the era. In the paper we are also describing other pandemics, particularly in the 20<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> century.

## UVOD

Gripa ali influenza je bila in je še bolezen, ki povzroča visoko javnozdravstveno breme. Zanj je značilen nenaden porast temperature, običajno suh kašelj, glavobol, izrazite bolečine v mišicah in sklepkih, slabo počutje, boleče grlo in izcedek iz nosu. Pri večini obolelih simptomi izzvenijo v tednu ali dveh brez medicinske pomoči, a v nekaterih primerih, posebej v skupinah z večjim tveganjem (starostniki, nosečnice, otroci mlajši kot pet let, ljudje s kroničnimi boleznimi ali imunskimi pomanjkljivostmi), je potek gripe lahko težek, lahko zahteva hospitalizacijo, možen je smrtni izid. Svetovna zdravstvena organizacija (angl. *World Health Organization*, WHO) ocenjuje, da globalno letno gripo s težkim potekom preboleva 3–5 milijonov ljudi, 290.000–650.000 jih zaradi gripe umre (1).

V Sloveniji so akutne okužbe dihal najpogostejši vzrok za obiske v zunajbolnišničnem zdravstvenem varstvu na primarni ravni in četrti najpogostejši vzrok hospitalizacij ter najpogostejši vzrok začasne odsotnosti z dela (2).

Virusi, ki povzročajo gripo, se stalno spreminjajo, da se izognejo delovanju imunskega sistema. Te manjše spremembe imenujemo antigenski zdrs (angl. *drift*). Tako ostane del populacije občutljive kljub poprejšnji okužbi in epidemije gripe se zato redno ponavljajo. V zmernih klimatih severne in južne poloble se ponavljajo vsako zimo, medtem ko je pojavljanje v tropskih predelih časovno manj opredeljeno (3). Pandemije, ki jih poenostavljeno opredeljujemo kot epidemije, ki se hitro razširijo v več svetovnih regijah in prizadenejo veliko šte-

vilu prebivalstva naenkrat, se pojavljajo v neenakomernih intervalih in sodeč po starih zapisih spremljajo človeštvo že zelo dolgo. Povzročajo jih močno antigensko spremenjeni virusi (antigenski premik, angl. *shift*) (4).

## VIRUSI INFLUENCE

Razumevanje gripe se je močno izboljšalo z odkritjem prenosa patogena prašičje gripe, ki je prešel filter, ki je sicer zadržal bakterije, ter okužil druge prašiče (5). Leta 1933 je sledilo odkritje influence A, leta 1940 influence B, leta 1950 influence C in leta 2011 influence D (6–9). Virus influence A je za človeka najpomembnejši, saj redno povzroča epidemije in občasno pandemije. Virus influence B povzroča epidemije, virus influence C povzroča blaga obolenja predvsem pri otrocih. Virus influence D so do zdaj našli le pri prašičih, govedu, ovcah in kozah. Vsi naštetih tipov virusov influence spadajo v družino *Orthomyxoviridae*, so sferične oblike, veliki so 80–120 nm, imajo enovijačno segmentirano RNA in lipidno ovojnico (9, 10).

V tem prispevku se bomo omejili na viruse influence A. Virus influence A vsebuje osem genomskih segmentov, ki kodirajo dve bazični beljakovini (PB1 in PB2), kislo beljakovino (PA), hemaglutinin (HA), nukleokapsidno beljakovino (NP), nevraminidazo (NA), matrično beljakovino (M1), ionski kanalček (M2) in dve nestrukturni beljakovini (NS1 in NS2) (11). Za fenotipske značilnosti virusov in za imunski odgovor gostitelja sta najpomembnejši površinski beljakovini HA in NA, katerih zgradba je zelo spremenljiva. Različice HA in NA so oštevilčene in so

del poimenovanja virusov influence. Poznamo 18 različic HA in 11 različic NA. Gostitelji vseh podtipov influence A (HA 1–16, NA 1–9) so vodni ptiči, izjemi sta le nedavno odkrita podtipa A (H17N10) in A (H18N11), ki so ju odkrili pri netopirjih. Poznamo veliko število različic kombinacij HA in NA. Poleg vodnih ptic so gostitelji lahko tudi druge živali kot npr. prašiči, konji, psi, mačke in celo tjujnji. Odkar je na voljo dovolj virološkega znanja, da nam je ta podatek na voljo, so pandemije povzročili podtipi A (H1N1), A (H2N2) in A (H3N2). Kot sezonska virusa trenutno krožita podtipa A (H1N1) in A (H3N2) in pa influenza tipa B (12, 13).

## PANDEMIJE

Enotna definicija pandemije ne obstaja in celo WHO je spremenila prejšnjo, bolj določeno definicijo tako, da glede na situacijo in potek vsakič posebej preuči različne dejavnike, oceni tveganje in se na podlagi le-teh odloči za morebitno razglasitev pandemije. Razglasitev pandemije je zelo pomemben korak, saj sproži številne ukrepe na mednarodni ravni in različne ukrepe na ravni posameznih držav (14). Eden od dejavnikov, ki jih spremljamo, ko preučujemo pandemije nalezljivih bolezni, je geografska razširjenost. Pričakujemo hitro širjenje bolezni, ki jo je v relativno kratkem času možno zaznati v več svetovnih regijah. Pomemben dejavnik je delež okuženih in simptomatskih bolnikov, ki mora biti visok, da bolezen v kratkem času eksplozivno zajame veliko ljudi. Poleg gripe sta bili takšni še na primer kuga v 14. stoletju in kolera v 18. stoletju. Pomembna je novost povzročitelja pandemije in s tem zelo nizka imunost populacije. Povzročitelj je lahko nov, kot večinoma pri gripi, ali pa se v populaciji pojavi po daljši odsotnosti, kot npr. ponavljajoče se pandemije kolere, ki jih je povzročil enak patogen. Pri gripi novost pomeni zamenjavo (antigen-ski premik, angl. *shift*) gena za HA in obi-

čajno tudi gena za NA in s tem nastanek genotipsko in fenotipsko novega virusa. Pomembni dejavniki so še infektivnost, nalezljivost in resnost povzročene obolenja. Resnost obolenja sicer ni običajen kriterij, s katerim ocenjujemo pandemijo, a v preteklosti so bile kot pandemije večinoma označeni izbruhi težkih bolezni, ki so pogosto imele tudi visoko smrtnost. Tako širjenja nove variante gripe, ki ima enak, a nekoliko spremenjen HA kot obstoječa varianta, klinična slika okužbe pa ni težja kot običajno, ne bomo poimenovali pandemija, čeprav se bo ta varianta hitro razširila po vsem svetu in okužila veliko ljudi. Pri gripi pa imamo tudi drugačen primer, ko imamo virus aviarnе influence A (H5N1), ki povzroči hudo obolenje in ima 60 % smrtnost. Najdemo ga v več regijah, pa njegovega pojavljanja ne poimenujemo pandemija, saj okužbe niso množične, prenos s človeka na človeka pa je izjemno redek. Kljub temu da splošno sprejete definicije pandemije nimamo in je verjetno tudi ni pričakovati, je vsem pandemijam vendarle skupna široka geografska razširjenost, prizadetost velikega števila ljudi in breme za zdravstvene in družbene sisteme (15).

Epidemije in pandemije gripe spremljajo človeštvo že zelo dolgo, vendar pred odkritjem virusa influence oz. možnostjo dokazovanja le-tega v ohranjenih bioloških vzorcih, lahko o tem, ali je izbruh res povzročila gripa, le domnevamo. Najzgodnejši opis, ki bi lahko ustrezal influenci, sega v leto 412 pr. n. št. Izbruh z značilnostmi, ki že zelo dobro ustrezajo pandemiji influence, je opisan iz let 1173–1174. Za izbruh v letu 1580 pa se večina raziskovalcev strinja, da je šlo za pravo pandemijo gripe. Začela se je v Aziji, se razširila v Afriko in naprej v Evropo. Evropo je zajela od juga proti severu v šestih mesecih in se razširila še v Ameriko. Zabeležena je bila visoka obolevnost in umrljivost. Od začetka 18. stoletja so različni dokumenti,

ki obravnavajo medicinsko tematiko, veliko popolnejši, zanesljivejši in rednejši. Naslednje pandemije, ki so jih z veliko gotovostjo povzročili virusi gripe, so bile v letih:

- 1729–1733 (začetek v Rusiji, širjenje na vzhod, zajame Evropo v šestih mesecih in svet v treh letih, pandemija je imela več valov, kasnejši so bili hujši),
- 1781–1782 (začetek na Kitajskem, širitev v Rusijo in na zahod, zajame Evropo v osmih mesecih, širi se v Severno Ameriko, obolelih je ogromno (30.000/dan v St. Peterburgu, dve tretjini prebivalcev Rima) največ med mladimi odraslimi, umrljivost ni zelo visoka),
- 1830–1833 (začetek na Kitajskem, širjenje na jug na Filipine v Indijo in Indonezijo, preko Rusije v Evropo in naprej v Ameriko, v Evropi je imela tri valove, kasnejši so bili hujši, delež obolelih je bil okoli 20–25 %, smrtnost je bila visoka),
- 1889–1892 (zelo dobro dokumentirana, najverjetneje začetek v centralni Rusiji, kjer se je zadržala šest mesecev, nato hit-

ro širjenje po vsej Evropi, Mediteranu, severni Afriki, severni in južni Ameriki, nadalje širitev v Singapur in na Kitajsko ter naprej v Indijo, Avstralijo in na Novo Zelandijo, delež okuženih je bil med 25–50 %, smrtnost okoli 0,15 %, največja smrtnost med starejšimi, trije valovi, kasnejši valovi so bili hujši, v arhivskih serumih so dokazali virus influence A (H2)) in

- 1898–1901 (izvor ni znan, hkratni izbruhi na različnih koncih sveta, potek bolezni je bil v veliko primerih blag, ta pandemija je vzbudila večjo pozornost šele s testiranjem arhivskih serumov, v katerih so določili protitelesa proti influenci A (H3)).

V času med omenjenimi pandemijami je možno, da je bila še kakšna, vendar so podatki preveč pomanjkljivi, da bi jih z gotovostjo uvrstili med pandemije gripe (4, 16). V zadnjih 100 letih smo bili priča štirim pandemijam (tabela 1) (14).

**Tabela 1:** Zadnje štiri pandemije gripe in njihove lastnosti.

Leto in poimenovanje	Regija začetka	Podtip influence	Ocena reprodukcijskega števila	Ocena umrljivosti	Ocena števila povzročenih smrti	Najbolj prizadete starostne skupine
1918 Španska	ni pojasnjeno	H1N1	1,2–3,0	2–3 %	20–50 milijonov	mladi odrasli
1957–1958 Azijska	južna Kitajska	H2N2	1,5	< 0,2 %	1–4 milijonov	vse skupine
1968–1969 Hongkonška	južna Kitajska	H3N2	1,3–1,6	< 0,2 %	1–4 milijonov	vse skupine
2009–2010 Prašičja	Severna Amerika	H1N1	1,1–1,8	0,02 %	100.000–400.000	otroci in mladi odrasli

## ŠPANSKA GRIPA

Zaradi visokega števila obolelih, hitrega širjenja in pogosto težkega poteka bolezni, velja španska gripa za najhujšo poznano pandemijo gripe. Kje se je pričela, ni natančno pojasnjeno. Ena od možnos-

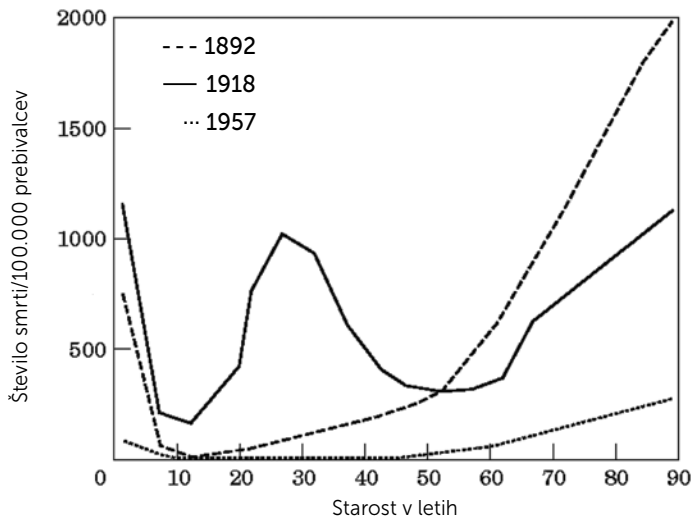
ti je prenos z delavci s Kitajske, ki so v letu 1918 prihajali v ZDA in Evropo. Na Kitajskem je v tistem času zabeleženo kroženje influence. Z gotovostjo pa so se prvi zabeleženi izbruhi pojavili marca 1918 na več koncih ZDA hkrati; v Detroitu (Michigan),

Južni Karolini in v zaporu San Quentin v Kaliforniji. Od tam se je obolenje širilo z rekruti, ki so se zbirali v vojaških bazah, ki so bile odlično okolje za širjenje okužbe. Vojniki so z ladjami potovali v Evropo in prenesli okužbo, ki je v aprilu in maju zajela praktično vso Evropo, Afriko ter v juniju dosegla še Kitajsko, Novo Zelandijo in Filipine. Hkrati je bilo to obdobje prve svetovne vojne, časopisne in radijske vesti so prvenstveno obravnavale vojne teme in mnoge države o izbruhih niso niti želele poročati, da slabe vesti ne bi vplivale na moralo vojakov in da nasprotna stran ne bi izvedela za težave. Španija v prvi svetovni vojni ni bila udeležena, poročala je hitreje in več in tako je večina zgodnjih novic o izbruhih gripe prišla iz Španije. Zbolel je tudi španski kralj in nekaj članov vlade in tako se je uveljavilo ime španska gripa. Po teži obolenj in smrtnosti se prvi val ni zelo razlikoval od običajnih epidemij gripe. Katastrofalne razsežnosti so prišle z drugim valom. Avgusta 1918 je influenza izbruhnila na ladji, ki je plula iz Anglije v pristanišče Free Town v Afriki. Smrtnost obolelih je bila desetkrat višja kot v prvem valu. Izbruhi so se iz pristaniškega mesta hitro razširili po Afriki. Začetek drugega vala pandemije z mnogo večjim deležem obolelih s težkim potekom bolezni in z visoko umrljivostjo so v Evropi najprej zabeležili v francoskem pristanišču Brest, od koder se je hitro širil po vodnih in kopenskih vojaških poteh po vsej Evropi in v Rusijo. V ZDA se je drugi val pričel v Bostonu, kamor je priplula ladja z okuženimi vojniki iz Evrope, in kmalu zajel vso državo. Pandemija je dosegla Indijo oktobra 1918, Avstralijo v januarju 1919. Tretji val je trajal od januarja do junija 1919, tudi zanj je bil značilen velik delež težkih potekov bolezni in visoka smrtnost (16). Težek potek bolezni in visoka smrtnost sta se pojavljala iz dveh razlogov. Prvi je bil sekundarna bakterijska pljučnica v času pred odkritjem

antibiotikov in je v večji meri prizadel starejše ljudi. Drugi je bil prehod od običajnih kliničnih znakov gripe v traheobronhitis, bronhiolitis, dihalno stisko, cianozo, hemoragije mukoznih membran in nastop smrti zaradi zadušitve. V teh primerih so avtopsije pokazale na pljučih intenzivne vnetne spremembe, adenopatije, v pljučih se je nabralo do liter tekočine. Tak potek je bil bolj pogost v starostni skupini 20–40 let (16). Visoka umrljivost mladih odraslih je bila ena od posebnosti španske gripe (slika 1). Vzroki zanj še niso popolnoma pojasnjeni. Iz testiranja arhivskih serumov domnevajo, da so lahko imeli starejši ljudje v preteklosti že stik z virusom influence, ki je imel podoben HA. Eden od možnih vzrokov hudih potekov in visoke umrljivosti pri mladih odraslih je lahko tudi pojav citokinske nevihte oz. pretiranega imunskega odgovora pri predhodno zdravih ljudeh (19). Na višku drugega vala je bila smrtnost v nekaterih evropskih mestih 10 %. Močno so bile prizadete tudi izolirane skupnosti Eskimov, kjer je bila smrtnost tudi 70 %, umrlo je 5 % prebivalcev otoka Guam v Pacifiku, 14 % na otočji Fidži, 22 % na Samoi. V celoti ocenjujejo, da je bila globalna umrljivost 2–3 % (10, 16).

V času pandemije metode za dokaz virusnih povzročiteljev še niso bile razvite, ohranili pa so se arhivski biološki vzorci bolnikov in nekaj trupel žrtev španske gripe na Aljaski, ki so se zaradi pokopa v zamrznjeno zemljo dobro ohranila. Histološke raziskave, raziskave genoma in rekonstrukcija virusov iz teh vzorcev so nam omogočili vpogled v virus, ki je to pandemijo povzročil (17). Gre za podtip A (H1N1) aviarnega izvora in zaenkrat ni mogoče ugotoviti, ali se je na človeka prenesel neposredno ali preko prilagoditve v vmesnem gostitelju (npr. prašiču) (18). Vsekakor ima gen za HA tega virusa virulenčne markerje, ki jih danes poznamo pri virusih s pandemskim potencialom, kot sta A (H5N1) in A (H7N9). Vsi dejavniki,





Slika 1: Smrti zaradi pljučnic in gripe v ZDA v treh pandemijah gripe (16).

zakaj je bil virus španske gripe tako dobro prenosljiv s človeka na človeka in zakaj je povzročal tako hudo patologijo in klinično sliko, še niso pojasnjeni (19). Z večjo prekuženostjo in z določenimi adaptacijami virusa je pandemija do konca leta 1920 izzvenela in pandemski virus je postal običajen sezonski virus, ki je z manjšimi spremembami krožil vse do leta 1957, ko se je pojavil nov pandemski virus A (H2N2) (4). Zanimivo je, da so se geni, ki jih je imel virus influence A (H1N1), prenašali in ohranili vse do virusov, ki krožijo še danes (18).

### AZIJSKA GRIPA

Virus influence, ki je povzročil pandemijo v letih 1957–1958, se je prvič pojavil v provinci Yunan na Kitajskem februarja 1957 in v aprilu že dosegel Hongkong, Singapur, Tajvan in Japonsko. Takrat je pod okriljem WHO že uspešno delovala mreža laboratorijev za spremljanje gripe in v maju 1957 so na izrednem sestanku pravilno ugotovili, da gre za pandemijo in predvideli nadaljnje širjenje. Kmalu so tudi ugotovili, da gre za popolnoma nov podtip influence A (H2N2), pri katerem sta gena za HA in NA

aviarnega in drugi geni humanega izvora. Do rekombinacije genov je najverjetneje prišlo v vmesnem gostitelju prašiču. Pandemija se je širila predvsem po kopenskih in ladijskih poteh in v šestih mesecih zajela ves svet. Na mnogih koncih sveta se je v začetku leta 1958 pojavil še drugi pandemski val (Evropa, Severna Amerika, bivša Sovjetska zveza), ki je bil po resnosti obolenj enak prvemu ali nekoliko težji. Okužilo se je 40–50 % prebivalstva od katerih je gripo težje prebolevalo 25–30 %. Smrtnost je bila najvišja med majhnimi otroki in starostniki in je skupaj dosegla okoli 0,02 % (slika 1). Ko se je pandemija končala, je virus influence A (H2N2) kot sezonski virus krožil le dobro desetletje, do leta 1968 (16, 20).

### HONGKONŠKA GRIPA

Izbruh hongkonške gripe se je pričel na Kitajskem julija 1968. V istem mesecu je povzročil obsežno epidemijo v Hongkongu in od tam so prišla tudi prva poročila. Kmalu so določili, da gre za nov podtip influence A (H3N2), ki ima novo pridobljena gena za HA in PB1, druge gene pa je virus ohranil

nil od prejšnjega pandemskega in kasnejše sezonskega virusa A (H2N2). V avgustu in septembru 1968 se je virus razširil po jugovzhodni Aziji, Avstraliji in do Irana. Okužba je prišla v ZDA z vojaki, ki so se vračali iz vietnamske vojne, in dosegla vrh decembra 1968. V Evropi se je širila počasi in dosegla vrh kar leto dni kasneje kot v ZDA. Nazadnje je pandemija sredi leta 1969 dosegla še Južno Ameriko in jug Afrike. Od prej krožečega virusa influence ohranjen gen za NA ni preprečeval okužb, je pa prispeval k pretežno blažjim obolenjem. Kljub vsemu pa sta bili na koncu obolevnost in smrtnost približno enaki kot v prejšnji pandemiji azijske gripe (tabela 1). Od pojava v letu 1968 nas sicer ves čas nekoliko spreminjajoči se virusi A (H3N2) spremljajo vsako sezono še danes in povzročajo znatno obolevnost in tudi umrljivost (16, 18, 20).

### PRAŠIČJA GRIPA A (H1N1)pdm09

Novi virus se je aprila 2009 pojavil v nekaj posamičnih primerih v Kaliforniji in v izbruhih v Mehiki in v istem mesecu so ga že dokazali v Evropi, Kanadi, Izraelu, na Novi Zelandiji. Virus so izolirali in karakterizirali 17. aprila 2009 ter ga poimenovali A (H1N1)pdm09, da se je ločil od takratnega sezonskega virusa A (H1N1). Nekateri izbruhi v Mehiki so bili alarmantni, s kar 60 % obolelih v določenem okolju. Širjenje je bilo izjemno hitro. Starostne skupine z največjo obolevnostjo so bili otroci in mladi odrasli (povprečna starost zbolelih je bila 18,1 let, 64 % med 10–29 let in le 1 % starejših od 60 let). Uradno je 11. junija 2009 že 135 držav poročalo o skupno 94.512 potrjenih primerih okužb z virusom A (H1N1)pdm09 ter o 429 smrtih; WHO je razglasila pandemijo. Na srečo se pandemija ni izkazala za tako hudo, kot je kazalo na začetku. Potek bolezni v večini primerov ni bil težek in smrtnost je bila nizka (tabela 1). Če ne bi imelo ime prašičja gripa slabšalnega

prizvoka, bi bilo kar ustrezno za nov virus, saj je nastal z rekombinacijo dveh prašičjih virusov; klasične prašičje gripe (potomka pandemske gripe iz 1918) in evrazijske prašičje gripe (vsi njeni geni so aviarnegega izvora). Po pandemiji se je virus A (H1N1)pdm09 ustalil kot sezonski virus, ki kroži v populaciji. To je bila prva pandemija, v kateri je bilo specifično cepivo proti pandemskemu virusu na voljo že med drugim valom, v oktobru 2009. Količino cepljenja in drugi ukrepi vplivali na potek pandemije, je težko ugotoviti. Kljub blagemu vtisu je bilo breme bolezni veliko, saj je bila bolj prizadeta mlajša populacija, kar kljub nizki smrtnosti pomeni večje število izgubljenih let zdravega življenja (18, 20, 21).

### ZAKLJUČEK

Gripa je že najmanj pet stoletij bolezen z značilno klinično sliko in stabilno patološko, pa vendar je praktično nemogoče napovedati, kdaj se bo pojavila v pandemski obliki, koliko časa bo krožil določen podtip ali sev, kakšna bo teža bolezni in smrtnost. Pandemije so vedno prišle nepričakovano, po dolgih ali krajših premorih po prejšnjih pandemijah, prizadete so bile različne starostne skupine, pandemski virusi so nastali z različnimi genskimi mehanizmi, vključeni so bili različni živalski gostitelji. Kar lahko ugotovimo je, da pandemije gripe predstavljajo dogodke, ko se pojavijo izjemno dobro prilagojeni virusi influence, ki so nekaj korakov pred imunostjo človeške populacije, ki pa jih bo v določenem času neizogibno spremenila v viruse sezonske gripe. Upamo lahko, da nam bodo bodoča znanstvena razkritja omogočila boljše razumevanje dinamike pandemij gripe in s tem boljše pripravljenost. Ker univerzalno cepivo proti gripji še ni na voljo in ker kljub utečenim postopkom razvoj specifičnega pandemskega cepiva terja svoj čas, se lahko za zdaj

pripravljamo le z dobrim in širokim načrtovanjem javnozdravstvenih ukrepov za primer pandemije. Čeprav so načrtovani in izvedeni javnozdravstveni ukrepi mar-

sikdaj kritizirani kot pretirani, se moramo zavedati, da je to edino orožje, ki nam je na voljo za omilitev posledic morebitne pandemije.

## LITERATURA

- WHO. World Health Organization (2018) influenza (seasonal) fact sheet [internet]. WHO; 2018 [citirano 2018 Oct 20]. Dosegljivo na: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
- Nacionalni inštitut za javno zdravje. Podatkovni portal [internet]. NIJZ; 2018 [citirano 2018 Oct 20]. Dosegljivo na: [https://podatki.nijz.si/pxweb/sl/NIJZ%20podatkovni%20portal/?px\\_language=sl&px\\_db=NIJZ%20podatkovni%20portal&rxid=0348ae0a-120c-42d5-97a3-a962d42152c4](https://podatki.nijz.si/pxweb/sl/NIJZ%20podatkovni%20portal/?px_language=sl&px_db=NIJZ%20podatkovni%20portal&rxid=0348ae0a-120c-42d5-97a3-a962d42152c4)
- Yang W, Lipsitch M, Shamana J. Inference of seasonal and pandemic influenza transmission dynamics. *PNAS*. 2015; 112 (9): 2723–8.
- Morens DM, Taubenberger JK. Pandemic influenza: certain uncertainties. *Rev Med Virol*. 2011; 21 (5): 262–84.
- Shope RE. Swine influenza. Part III. Filtration experiments and etiology. *J Exp Med*. 1931; 54: 373–85.
- Smith W, Andrewes CH, Laidlaw PP. A virus obtained from influenza patients. *Lancet*. 1933; 2: 66–8.
- Francis Jr T. A new type of virus from epidemic influenza. *Science*. 1940; 92: 405–8.
- Francis Jr T, Quilligan Jr JJ, Minuse E. Identification of another epidemic respiratory disease. *Science*. 1950; 112: 495–7.
- Hause BM, Ducatez M, Collin EA, et al. Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. *PLoS Pathogens*. 2013; 9: e1003176.
- Hilleman MR. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine*. 2002; 20: 3068–87.
- Koren S, Maver P, Jelen M. Ortomiksovirusi. In: Poljak M, Petrovec M, eds. *Medicinska virologija*. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011. p. 125–36.
- Centers for Disease Control and Prevention. Influenza (Flu). Influenza type A viruses [internet]. CDC; 2017 [citirano 2018 Oct 21]. Dosegljivo na: <https://www.cdc.gov/flu/avianflu/influenza-a-virus-subtypes.htm>
- Tong S, Zhu X, Li Y. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLOS Pathogens*. 2013; 9 (10): e1003657.
- WHO. Pandemic influenza risk management: A WHO guide to inform and harmonize national and international pandemic preparedness and response [internet]. WHO; 2017 [citirano 2018 Oct 21]. Dosegljivo na: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259893/WHO-WHE-IHM-GIP-2017.1-eng.pdf?sequence=1>
- Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. What is a pandemic? *J Infect Dis*. 2009; 200: 1018–21.
- Potter CW. Chronicle of influenza pandemics. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, eds. *Textbook of Influenza*. Oxford: Blackwell Science; 1998. p. 3–18.
- Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, et al. Initial genetic characterization of the 1918 „Spanish“ influenza virus. *Science*. 1997; 275 (5307): 1793–6.
- Taubenberger JK, Kash JC. Influenza virus evolution, host adaptation and pandemic formation. *Cell Host Microbe*. 2010; 7 (6): 440–51.
- Oxford JS, Gill D. Unanswered questions about the 1918 influenza pandemic: origin, pathology, and the virus itself. *Lancet Infect Dis*. V tisku 2018.
- Kilbourne DK. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12 (1): 9–14.
- Baldo V, Bertonecello C, Cocchio C, et al. The new pandemic influenza A/(H1N1)pdm09 virus: is it really „new“? *J Prev Med Hyg*. 2016; 57 (1): E19–E22.

Tamara Kastrin<sup>1</sup>, Metka Paragi<sup>2</sup>, Toni Oražem<sup>3</sup>, Alex-Mikael Barkoff<sup>4</sup>, Qiushui He<sup>5</sup>

## Javnozdravstveni pomen spremljanja oslovskega kašlja v Sloveniji

### *Public Health Significance of the Surveillance of Whooping Cough in Slovenia*

#### IZVLEČEK

---

KLJUČNE BESEDE: oslovski kašelj, javnozdravstveno spremljanje, cepljenje

Izvedli smo prvo javnozdravstveno raziskavo bakterije *Bordetella pertussis* v Sloveniji. Osamili smo 27 izolatov *B. pertussis* v kulturi, določili njihovo protimikrobno občutljivost na makrolide in lastnosti njihovih antigenov, povezanih s cepivi. Vsi testirani izolati so bili občutljivi na makrolide. Vsi proučevani izolati so izražali toksin oslovskega kašlja in antigena Fim2 ali Fim3. Ugotovili smo, da skoraj 90 % izoliranih izolatov ni izražalo antigena pertaktin, ki je ena od komponent acelularnega cepiva. Prve primere takih sevov smo opazili 15 let po uvedbi aceličnega cepiva, ki je vsebovalo pertaktin. Tudi ostali testirani genotipi antigenov se razlikujejo od tistih, ki so prisotni v cepivih. Čeprav je populacija precepljena v visokem odstotku, to ne prepreči širjenja bakterije *B. pertussis*, ki je v Sloveniji endemična in tudi epidemična.

#### ABSTRACT

---

KEY WORDS: pertussis, public health surveillance, pertussis vaccination

We conducted the first public health study of *Bordetella pertussis* in Slovenia. We cultured 27 *B. pertussis* isolates, determined their antimicrobial sensitivity to macrolides and their vaccine antigenic properties. All tested isolates were sensitive to macrolides. All of the studied isolates expressed the pertussis toxin and Fim2 or Fim3 antigens. We found that almost 90% of the isolates did not produce the antigen pertactin, which is one of the components of the acellular vaccine. The first cases of such strains were observed 15 years after the introduction of an acellular vaccine containing pertactin. Other tested genotypes of vaccine antigens differ from those present in vaccines. Although the population is highly immunised, this does not prevent the spread of *B. pertussis*, which is endemic as well as epidemic in Slovenia.

---

<sup>1</sup> Dr. Tamara Kastrin, univ. dipl. mikrobiol., Oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo Ljubljana, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Grablovičeva ulica 44, 1000 Ljubljana; tamara.kastrin@nlzoh.si

<sup>2</sup> Dr. Metka Paragi, univ. dipl. biol., Oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo Ljubljana, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Grablovičeva ulica 44, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Toni Oražem, dr. med., Oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo Ljubljana, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Grablovičeva ulica 44, 1000 Ljubljana

<sup>4</sup> Alex-Mikael Barkoff, Department of Medical Microbiology and Immunology, Institute of Biomedicine, University of Turku, Turku, Finland

<sup>5</sup> Dr. Qiushui He, Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Turku, Institute of Biomedicine, Turku, Finland; Department of Medical Microbiology, Capital Medical University, Beijing, China

## UVOD

Oslovski kašelj povzročata bakterija *Bordetella pertussis*, redkeje *Bordetella parapertussis*. Je zelo nalezljiva bolezen dihal, ki se prenaša kapljično (1, 2). Oslovski kašelj preprečujemo s cepljenjem, vendar kljub visoki precepljenosti ostaja endemičen in na splošno velja za eno od najslabše obvladovanih boleznih, proti katerim cepimo. Za oslovskim kašljem lahko zbolijo vsi, najhujše pa prizadene še necepljene dojenčke. V letu 2016 je bilo v Evropski uniji (EU) 29 primerov smrti, večina pri dojenčkih, mlajših od treh mesecev (3). Zdravljenje je učinkovito, če je uvedeno v zgodnji fazi bolezni. Kasneje uvedeno zdravljenje bistveno ne omili poteka bolezni in boleznih ne skrajša, je pa pomembno za preprečevanje širjenja okužbe (2). Bolezen zdravimo z makrolidnimi antibiotiki, čeprav iz Kitajske že poročajo o naraščanju števila protimikrobno odpornih sevov *B. pertussis* (4, 5). Izбира, katera mikrobiološka diagnostika je najbolj primerna, je odvisna predvsem od trajanja kliničnih znakov (6). V prvih dveh tednih od začetka kliničnih znakov je najbolj primerna osamitev bakterije v kulturi in dokaz z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (angl. *real-time polymerase chain reaction*, RT-PCR). RT-PCR ostaja zaradi boljše občutljivosti primeren do četrtega tedna od začetkov kliničnih znakov. Od četrtega tedna naprej je najprimernejša metoda serologija. Za namene javnozdravstvenega spremljanja je nujno bakterijo osamiti v kulturi. Ta metoda sicer velja za zlati standard, vendar se zaradi slabše občutljivosti bakterije na transport in počasne rasti bakterije uporablja redkeje in je v poplavi novih molekularnih metod dana nekoliko na stran. Poudariti pa moramo, da samo iz bakterijske kulture lahko določimo protimikrobno občutljivost, antigenske lastnosti bakterije, bakterijo tipiziramo, proučujemo njen genom in tako dobimo javnozdravstveno pomembne podatke.

V Sloveniji je bilo cepljenje s celičnim cepivom proti oslovskemu kašlju uvedeno leta 1959 in je močno znižalo število primerov. Leta 1999 je bilo celično cepivo zamenjano z neceličnim oz. acelularnim cepivom proti oslovskemu kašlju (angl. *acellular vaccine*, ACV). Leta 2009 smo v Sloveniji uvedli dodaten pozitivitveni odmerek (peti odmerek) za otroke v tretjem razredu osnovne šole (analiza izvajanja cepljenja). Precepljenost proti davici, tetanusu, oslovskemu kašlju, otroški paralizi in okužbam s *Haemophilus influenzae* tipa b je bila v Sloveniji v letu 2016 94,1 % in je že nekaj let zapored na državni ravni relativno visoka, vendar se znižuje (7). Najnižja precepljenost je v urbanih predelih, zlasti v ljubljanski regiji. V Sloveniji smo uporabljali dve različni ACV: Infanrix (GlaxoSmithKline Biologicals S.A.; vsebuje pertaktin (PRN)) in Pentaxim (Sanofi Pasteur S.A., PRN ni vključen), ki se med seboj v antigenski pokritosti razlikujeta v tem, da eno ima tudi antigen PRN, drugo pa ne.

Namen naloge je bil osamiti kulture *B. pertussis*, določiti njihovo protimikrobno občutljivost in antigenske lastnosti.

## METODE

V obdobju 2006–2017 (osem v letih 2006–2011 in 19 v 2014–2017) smo pridobili 27 kultur *B. pertussis* s področja celotne Slovenije. Večina izolatov je bila iz leta 2017, ko smo iz transportnih gojišč brisov, ki so bili na RT-PCR pozitivni, kultivirali bakterijo. Gojišča smo nacepili na Regan/Lowe-CH s cefaleksinom in brez njega ter ugotavljali rast *B. pertussis*. Kulture smo molekularno potrjevali z dokazom specifičnega odseka gena za promotorsko regijo toksina *B. pertussis*. Kulture *B. pertussis* smo poslali v referenčni laboratorij na Finsko: Institute of Biomedicine, Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Turku. Tam so kulturam izmerili izražanje pomembnih antigenov; pertusisnega to-

ksina (PT), PRN, filamentnega hemaglutinina (FHA) ter fimbrij 2 in 3 (Fim2 in Fim3) z metodo encimske imunoadsorpcijske preiskave (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) z uporabo specifičnih monoklonskih protiteles (8, 9). Izolatom, ki niso izražali PRN, so s sekvenciranjem gena *prn* ugotavljali vrsto mutacij. Izvedli so tudi genotipizacijo genov *prn*, *ptxP* in *ptxA* vseh izolatov po postopkih, ki so bili že opisani v predhodnih objavah (10). Protimikrobno odpornost proti makrolidom so najprej določali z molekularno metodo za detekcijo specifičnih alelov za mutacijo A2047G v 23S rRNA genu. Ker so vsi rezultati kazali na divji fenotip brez mutacije (občutljivi na makrolide), so naključno izbranim šestim izolatom določili minimalne inhibitorne koncentracije (angl. *minimal inhibitory concentration*, MIC) za eritromicin in azitromicin. Obe metodi sta bili predhodno natančno opisani v objavi (11).

## REZULTATI

Obravnavali smo vzorce, ki so bili z RT-PCR na IS481 pozitivni. Od 96 transportnih gojišč, ki smo jih nasadili na ustrezna gojišča, smo v 18 primerih (18,8 %) uspeli izolirati bakterijo *B. pertussis*. Brisi, iz katerih smo uspeli osamiti kulturo, so do našega laboratorija potovali po pošti v povprečju dva dni, razpon časa od odvzema do sprejema je bil od enega do (v enem primeru) pet dni. Vse kulture, ki so kazale tipično rast na selektivnem gojišču in tipičen videz pod mikroskopom, smo tudi potrdili z metodo RT-PCR z oligonukleotidi za dokaz insercijske sekvence IS481in za specifično tarčo promotorske regije PT (12). Ostalih devet bakterijskih kultur smo imeli zamrznjenih iz prejšnjih let.

Rezultati tipizacije so pokazali, da 17 od 27 izolatov ni izražalo PRN in en izolat ni izražal FHA. Vseh osem izolatov, zbranih v obdobju 2006–2011, je izražalo PRN, medtem ko 17/19 (89,5 %) izolatov, izoliranih v ob-

dobju 2014–2017, ni izrazilo PRN. Od 17 izolatov brez PRN smo pri 16 dokazali (94,1 %) vstavljanje elementa IS481 na pozicijo 1.613 gena *prn* in v enem primeru je manjkal promotor gena *prn* in kodirajočega dela na položaju od -297 do 1.325, kot je bilo že predhodno opisano (13). Vsi proučevani izolati so izražali PT in Fim2 ali Fim3.

Rezultati genotipizacije so pokazali, da so bili vsi, razen enega izolata genotipa *ptxA1* in *ptxP3*, en izolat je imel genotip *ptxA2-4*, *ptxP1*. Vsi izolati, razen enega, ki je bil NT (angl. *non-typeable*), so bili *prn2*. Vsi izolati so bili občutljivi na makrolide.

Za 20 od 27 primerov smo imeli tudi podatek o cepilnem statusu, vsi (19 primerov), razen enega so bili cepljeni skladno s cepilno shemo. Tudi ostalih sedem je bilo predvidoma cepljenih v otroštvu, saj gre za odrasle bolnike, vendar podatka o njihovem cepilnem statusu ni bilo.

## RAZPRAVA

V Sloveniji so bile v zadnjih desetih letih najvišje incidenčne stopnje oslovskega kašlja zabeležene v letih 2006–2007 (27,5–35,4/100.000 prebivalcev), leta 2010 (29,8/100.000 prebivalcev) in leta 2014 (19,4/100.000) (6). Visoke incidenčne stopnje se izmenjujejo z nižjimi na 2–4 leta, kar potrjuje, da je oslovski kašelj v Sloveniji endemičen in epidemičen. Poleg tega se pojavnost glede na starost bolnikov zvišuje, v letu 2011 je bila najvišja pojavnost pri bolnikih starih 11 let, v letu 2015 pa že pri bolnikih starosti 14 let (6).

Uvedba cepljenja je močno zmanjšala število primerov oslovskega kašlja. V 90. letih prejšnjega stoletja so zaradi varnosti cepivo zamenjali z neceličnim v večini evropskih držav. V evropskih državah so sheme cepljenja in cepiva različna, precepljenost je ustrezno visoka (> 90 %), vendar kljub temu ostaja oslovski kašelj endemična bolezen, s številnimi izbruhi (14, 15). Ena od razlag, zakaj se v zadnjih 20 letih pojavnost

povečuje, je prav zamenjava celičnega cepiva z neceličnimi. Drugi dejavniki so tudi boljše spremljanje, osveščenost zdravnikov in boljša diagnostika, zlasti uvedba RT-PCR in serologije. Celična cepiva, ki so jih prej uporabljali, so imela boljši in dolgotrajnejši imunski odziv, medtem ko je pri neceličnih cepivih imunost krajša in le-ta ne prepreči bakterijske kolonizacije (16). Poleg tega so s številnimi raziskavami dokazali prilagoditev bakterije, ki kaže na t. i. »vaccine escape«, oz. na prilagoditev bakterije na selekcijski pritisk neceličnih cepiv (10, 16, 17). Ta cepiva imajo namreč omejen nabor antigenov, in sicer od enega do pet antigenov; PT, FHA, PRN, Fim2 in Fim3. Sevi, ki se uporabljajo za proizvodnjo ACV, vsebujejo alele *ptxA2* in *ptxA4* ter *prn1* ali *prn7* (10). Ugotovili smo, da so bili vsi naši izolati *prn2*, z izjemo enega izolata, ki je bil NT. Poleg tega smo pri vseh, razen pri enem izolatu, dokazali alele *ptxA1* in *ptxP3*. Te ugotovitve so v skladu z nedavno evropsko študijo in kažejo, da večina izolatov nosi drugačne alele, kot so prisotni v acelularnih cepivih (10). Serotip Fim je bil v večini primerov Fim2; 21/27 (77,8 %). Ugotovili smo, da so bili vsi izolati po letu 2014, Fim2, medtem ko je bilo 6/8 (75 %) izolatov iz obdobja 2006–2014 Fim3. Podobne ugotovitve so objavili tudi v evropski študiji Barkoff s sodelavci. Dokazali so, da se je populacija *B. pertussis* spremenila po uvedbi ACV in postala bolj homogena (10, 17).

Dokazali smo, da so v Sloveniji prisotni sevi *B. pertussis*, ki ne izražajo PRN. 17 od 27 testiranih izolatov ni izražalo PRN, iz obdobja od leta 2014 naprej pa kar 17 od 19 primerov (89,5 %), medtem ko so vsi testirani izolati do leta 2011 izražali ta antigen. Glede na to, da je bila večina izolatov (88,2 %) od cepljenih oseb, potrjuje, da se je *B. pertussis* brez PRN sposobna prenašati in krožiti v precepljeni populaciji. Pojavljanje sevov brez PRN so opisali tudi v drugih novejših objavah (10, 16). Najbolj pogost opisani vzrok pojavljanja sevov brez PRN je bil in-

sercija elementa IS481, tako kot v naši raziskavi (18). Ohranjanje in širjenje sevov brez PRN predstavlja najverjetneje selekcijsko prednost za bakterijo, zlasti zaradi visoke precepljenosti z neceličnimi cepivi (19).

Iz rezultatov vidimo, da imajo različni sevi enake antigenske lastnosti, kar bi lahko kazalo na klonsko širjenje, vendar predvidevamo, da je bolj verjeten vzrok tega selekcijski pritisk cepljenja, saj so bili sevi, ki smo jih proučevali iz različnih krajevnih izbruhov v daljšem proučevanem obdobju, poleg tega pa iste fenotipske in genotipske lastnosti *B. pertussis* opisujejo tudi druge študije (8, 10, 11, 17) Študija analize genomov izolatov iz Anglije je pokazala, da vzrok povečanja števila primerov v 2012 ni bil posledica razširitve enega hipervirulentnega klona, temveč je šlo za več različnih, vendar sorodnih sevov (20). V tej študiji so dokazali tudi, da imajo geni, ki kodirajo za antigene, ki so prisotni v ACV, hitrejšo evolucijo od ostalih. Vsekakor bo za boljše poznavanje bakterije potrebno nadaljnje proučevanje in spremljanje na ravni sekvenciranja celotnega genoma. Prav tako potekajo razprave v smeri ustreznosti cepiva in možnosti izdelave bolj učinkovitih cepiv (21).

Laboratoriji rutinsko ne izvajajo testiranja protimikrobne občutljivosti, saj v glavnem izvajajo molekularno diagnostiko. Vsi naši izolati so bili občutljivi na makrolide, zato lahko potrdimo, da so makrolidi pravilni izbor za zdravljenje. Zaradi pojavljanja odpornih sevov na Kitajskem, v Ameriki in Evropi je potrebno nadaljnje spremljanje protimikrobne odpornosti *B. pertussis* (22–24). Zato ostaja pomembno ohranjanje klasične diagnostike z osamitvijo bakterijskih kultur zaradi možnosti tipizacije in spremljanja bakterijske občutljivosti ter ugotavljanja ustreznosti cepiv.

## ZAKLJUČEK

Opisujemo prvo javnozdravstveno raziskavo bakterije *B. pertussis* v Sloveniji. V

študiji smo dokazali, da je klasična diagnostika z osamitvijo bakterijskih kultur možna z uporabo ustreznih transportnih gojišč in tudi potrebna z vidika nacionalnega spremljanja oslovskega kašlja. Ugotovili smo, da se je pogostnost sevov, ki ne izražajo antigena PRN, bistveno povečala med obdobji 2006–2011 (0 %) in 2014–2017 (89,5 %), 15 let zatem, ko smo v Sloveniji uvedli ACV, ki je vsebovalo ta antigen. Dokazali smo tudi, da so v Sloveniji priso-

tni sevi z antigeni, ki se razlikujejo od tistih, ki so prisotni v ACV. Dokazali smo, da so makrolidi zdravilo izbora, saj so bili vsi izolati občutljivi. Naši rezultati poudarjajo potrebo po stalnem spremljanju bakterije *B. pertussis*, saj se širijo izolati, ki ne vsebujejo cepilnih antigenov. Nadaljnji napredek v metodologiji, predvsem na področju funkcionalne genomike in sekvenciranja celotnega genoma, pa bo omogočil boljše poznavanje te bakterije in njene evolucije.

## LITERATURA

1. Kraigher A, Ihan A, Avčin T. Cepljenje in cepiva. Ljubljana: SZD, Inštitut za varovanje zdravja; 2011.
2. NIJZ: Oslovski kašelj – algoritem ukrepanja [internet]. NIJZ; 2016 [citirano 2016 Oct 3]. Dosegljivo na: [http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/publikacije/letopisi/2014/4.1\\_precepljenost\\_2014.pdf](http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/publikacije/letopisi/2014/4.1_precepljenost_2014.pdf)
3. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2016 – Pertussis [internet]. Stockholm: ECDC; 2016 [citirano 2016 Oct 3]. Dosegljivo na: <http://ecdc.europa.eu/en/health-topics/Pertussis/Pages/Annual-epidemiological-report-2016.aspx> in
4. Wang Z, Cui Z, Li Y, et al. High prevalence of erythromycin-resistant *Bordetella pertussis* in Xi'an, China. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20: O825–30.
5. Li Y, Liu X, Zhang B, et al. Where macrolide resistance is prevalent. *APMIS*. 2015; 123: 361–3.
6. Kastrin T, Paragi M, Grgič Vitek M, et al. Oslovski kašelj v Sloveniji - epidemiologija in novosti v mikrobiološki diagnostiki. In: Petrovec M, ed. Okužbe dihal. *Med Razgl*. 2016; 55 (Suppl 4): 111–9.
7. NIJZ: Analiza izvajanja cepljenja v Sloveniji v letu 2016 [internet]. NIJZ; 2016 [citirano 2016 Oct 3]. Dosegljivo na: <http://www.nijz.si/spremljanje-precepljenosti-deleza-cep-ljenih>
8. Barkoff AM, Mertsola J, Guillot S, et al. Appearance of bordetella pertussis strains not expressing the vaccine antigen pertactin in finland. *Clin Vaccine Immunol*. 2012; 19: 1703–4.
9. Barkoff AM, Guiso N, Guillot S, et al. A rapid ELISA-based method for screening *Bordetella pertussis* strain production of antigens included in current acellular pertussis vaccines. *J Immunol Methods*. 2014; 408: 142–8.
10. Barkoff AM, Mertsola J, Pierard D, et al. Surveillance of circulating *Bordetella pertussis* strains in Europe during 1998–2015. *J Clin Microbiol*. 2018; 56: e01998–17.
11. Lönnqvist E, Barkoff AM, Mertsola J, et al. Antimicrobial susceptibility testing of Finnish *Bordetella pertussis* isolates collected during 2006–2017. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018; 14: 12–6.
12. European Centre for Disease Prevention and Control. Guidance and protocol for the serological diagnosis of human infection with *Bordetella pertussis*. Stockholm: ECDC; 2012.
13. Weigand MR, Peng Y, Cassiday PK, et al. Complete genome sequences of bordetella pertussis isolates with novel pertactin-deficient deletions. *Genome Announc*. 2017; 14; 5 (37): e00973–17.
14. ECDC. Vaccine schedules in all countries of the European Union [internet]. ECDC; 2018 [citirano 2018 Nov 11]. Dosegljivo na: <https://vaccine-schedule.ecdc.europa.eu/>
15. Barkoff AM, Gröndahl-Yli-Hannuksela K, He Q. Seroprevalence studies of pertussis: what have we learned from different immunized populations. *Pathog Dis*. 2015; 73 (7).
16. Belcher T, Preston A. *Bordetella pertussis* evolution in the (functional) genomics era. *Pathog Dis*. 2015; 73 (8): ftv064.
17. Preston A. The role of *B. pertussis* vaccine antigen gene variants in pertussis resurgence and possible consequences for vaccine development. *Hum Vaccin Immunother*. 2016; 12 (5): 1274–6.
18. Pawloski LC, Queenan AM, Cassiday PK. Prevalence and molecular characterization



- of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in the United States. *Clin Vaccine Immunol.* 2014; 21 (2): 119–25.
19. Martin SW, Pawloski L, Williams M, et al. Pertactin-negative *Bordetella pertussis* strains: evidence for a possible selective advantage. *Clin Infect Dis.* 2015; 60: 223–7.
  20. Sealey KL, Harris SR, Fry NK, et al. Genomic analysis of isolates from the United Kingdom 2012 pertussis outbreak reveals that vaccine antigen genes are unusually fast evolving. *J Infect Dis.* 2015; 212: 294–301.
  21. Locht C. Will we have new pertussis vaccines? *Vaccine.* 2018; 36 (36): 5460–9.
  22. Wang Z, Cui Z, Li Y, et al. High prevalence of erythromycin-resistant *Bordetella pertussis* in Xi'an, China. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20: O825–30.
  23. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Erythromycin-resistant *Bordetella pertussis*—Yuma County, Arizona, May–October 1994. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1994; 43 (44): 807–10.
  24. Guillot S, Descours G, Gillet Y, et al. Macrolide-resistant *Bordetella pertussis* infection in newborn girl, France. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18: 966–8.

Tamara Kastrin<sup>1</sup>, Nataša Toplak<sup>2</sup>, Simon Koren<sup>3</sup>, Slovenska skupina za meningitise<sup>4</sup>, Metka Paragi<sup>5</sup>

## Uporaba sekvenciranja celotnega genoma za spremljanje invazivnih izolatov *Neisseria meningitidis* v javnem zdravstvu

### *Use of Whole Genome Sequencing for Public Health Surveillance of Invasive Neisseria Meningitidis*

#### IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Neisseria meningitidis*, javnozdravstveno spremljanje, sekvenciranje celotnega genoma

Spremljanje invazivnih izolatov *Neisseria meningitidis* je pomembno iz vidika javnega zdravja, kljub nizki stopnji pojavnosti v Sloveniji, predvsem zaradi možnosti pojava epidemij, visoke stopnje smrtnosti in možnosti preprečevanja s cepljenjem. Leta 1993 smo začeli z nacionalnim projektom spremljanja invazivnih bolezni, ki jih v Sloveniji povzročajo *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*. Invazivna meningokokna bolezen se v Sloveniji pojavlja endemično. Invazivne izolote *N. meningitidis* iz obdobja 2010–2017 smo proučevali z metodo sekvenciranja celotnega genoma in dokazali, da so genetsko heterogeni, hkrati pa smo dokazali tudi prisotnost pomembnih hipervirulentnih klonskih kompleksov. V Sloveniji je bila prevladujoča seroskupina B, ki je bila tudi najbolj genetsko heterogena, medtem ko sta bili seroskupini C in Y bolj homogeni in je večina izolatov pripadala že poznanemu klonskemu kompleksu. Zaradi potreb spremljanja izolatov z vidika pokritosti s cepivi, ki so zasnovana na izbranih antigenih, ostaja laboratorijsko spremljanje bistveno za spremljanje in hkrati preprečevanje ter obvladovanje te nevarne bakterije. Z razvojem in povečano dostopnostjo novjših molekularnih metod je njihova uporaba za namene poglobljenega nacionalnega spremljanja postala nujna. Sekvenciranje celotnega genoma bo v bližnji prihodnosti zagotovo služilo kot osnovna metoda spremljanja javnozdravstveno pomembnih povzročiteljev nalezljivih bolezni.

<sup>1</sup> Dr. Tamara Kastrin, univ. dipl. mikrobiol., Oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo Ljubljana, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Grablovičeva ulica 44, 1000 Ljubljana; tamara.kastrin@nlzoh.si

<sup>2</sup> Dr. Nataša Toplak, univ. dipl. bio., Omega d. o. o., Dolinškova ulica 8, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Dr. Simon Koren, univ. dipl. biokem., Omega d. o. o., Dolinškova ulica 8, 1000 Ljubljana

<sup>4</sup> Mag. Tjaša Žohar Čretnik, Manica Mueller - Premru, Barbara Zdolšek, Helena Ribič, Iztok Štrumbelj, Andrej Gole, Martina Kavčič, Ingrid Berce, Tatjana Harlander, Jerneja Fišer, Irena Pittaver-Vajdec, Viktorija Tomič

<sup>5</sup> Dr. Metka Paragi, univ. dipl. biol., Oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo Ljubljana, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Grablovičeva ulica 44, 1000 Ljubljana

## ABSTRACT

KEY WORDS: *Neisseria meningitidis*, public health surveillance, whole genome sequencing

Surveillance of invasive isolates of *Neisseria meningitidis* is an important public health issue despite their low incidence in Slovenia, mainly because of the potential for epidemics, a high mortality rate and the possibility of vaccine prevention. In 1993, we started the national surveillance project for monitoring invasive diseases caused in Slovenia by *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*. The invasive meningococcal disease is endemic in Slovenia. We studied invasive isolates of *N. meningitidis* from the 2010–2017 period using the method of whole genome sequencing and proved that they were genetically heterogeneous, at the same time we also demonstrated the presence of important hypervirulent clonal complexes. The serogroup B was the prevailing one and also the most genetically heterogeneous one in Slovenia. While serogroups C and Y were more homogeneous and most of the isolates belonged to the already known clonal complex. Due to the need for monitoring isolates from the point of view of vaccine coverage based on selected antigens, laboratory surveillance remains essential for monitoring and simultaneously preventing and controlling this dangerous bacterium. With the development and increased availability of newer molecular methods, their use has become necessary for comprehensive national surveillance purposes. In the near future, the use of whole genome sequencing will certainly serve as the basic surveillance method for agents causing infectious diseases significant for public health.

## UVOD

Povzročitelj invazivne meningokokne bolezni (angl. *invasive meningococcal disease*, IMD) je gramnegativna bakterija *Neisseria meningitidis* ali meningokok. Bakterija je izključno humani patogen in njen edini rezervoar je zgornji respiratorni trakt človeka. V endemičnih razmerah je okrog 10–35 % ljudi asimptomatskih nosilcev (1–3). Bakterija se prenaša kapljično, inkubacijska doba traja 1–10 dni, običajno 3–4 dni (4). Bakterija je pomemben vzrok dveh hudih bolezni, meningitisa in sepse, pri katerih lahko pride do smrti kljub razpoložljivosti učinkovitih antibiotikov. Smrtnost pri IMD je okrog 10 % (5). Meningokok ima številne virulentne dejavnike, s katerimi se izogne imunskemu sistemu gostitelja in je zato sposoben kolonizacije ter povzročanja bolezni. Glavni virulentni dejavnik je kapsula, ki je sestavljena iz kompleksnih polisaharidov. Na osnovi njene strukture

ločimo 13 seroskupin, vendar več kot 95 % vseh primerov invazivnih bolezni povzroča šest pomembnih seroskupin: A, B, C, W, Y in X (6). V razvitih državah je IMD endemična, z nizko stopnjo pojavnosti in povezana s seroskupinami B, C, W in Y, občasno se pojavljajo tudi epidemije. V letu 2016 je bilo v 30 državah Evropske unije (EU) oz. Evropskega gospodarskega prostora (EGP) prijavljenih 3.280 potrjenih primerov IMD. Povprečna stopnja pojavnosti je znašala 0,6 primerov na 100.000 prebivalcev, podobno kot v prejšnjih letih (7). V Sloveniji je bila v letu 2016 pojavnost IMD 0,3 na 100.000 prebivalcev.

Uvedba konjugiranih cepiv (pokrivajo seroskupine A, C, W in Y) je močno vplivala na pojavljanje bakterije. Tako so uspešno zmanjšali pojavnost in epidemije seroskupine A v meningitičnem pasu Afrike in epidemije seroskupine C po Evropi in Severni Ameriki (8). Opazen je porast seroskupin

W in Y (9, 10). Od leta 2014, ko je bilo cepivo Bexero licencirano v Evropi, je možno cepiti tudi proti *N. meningitidis* seroskupini B (NmB), ki je najpogostejša (54 % vseh IMD v letu 2016 po poročilu Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje boleznih (angl. *European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC)). Cepivo Bexero so septembra 2015 v Veliki Britaniji priključili shemi cepljenja otrok in se je do sedaj izkazalo kot učinkovito (11). Cepivo je osnovano na proteinskih antigenih: fHbp (angl. *factor H binding protein*), NadA (angl. *Neisseria adhesin A*), NHBA (angl. *Neisserial Heparin Binding Antigen*) in PorA v membranskih veziklih. Učinkovitost cepljenja z Bexero bo lahko določiti šele po nekajletni uporabi, saj je zaradi raznolikosti antigenov in ravni njihovega izražanja nemogoče natančno opredeliti pokritost. Na podlagi študij predvidevajo, da naj bi Bexero pokril 78 % invazivnih NmB v Evropi (12). Različne študije in »modeli« po svetu dokazujejo pokritost 66–91 % invazivnih NmB (13). Predvidevajo pa tudi, da lahko pokrije tudi določene izolote serogrupe W. Učinkovitost cepiva bi bila še večja, če bi imel vpliv tudi na nosilstvo, vendar tega še niso dokazali.

Novije metode molekularne tipizacije nam omogočajo natančnejšo opredelitev izolatov. Tako dobimo z metodo večgenske sekvenčne tipizacije (angl. *multilocus sequence typing*, MLST) podatek o sekvenčnih tipih (angl. *sequence type*, ST). Po smernicah ECDC priporočajo, da z metodo sekvenciranja dobimo t. i. »finetype«, ki natančneje opredeli izolat (14). Poleg sekvenčnega tipa ST določimo še nukleotidno zaporedje genov za PorAVR1, PorAVR2 in FetA, za študiranje antigenov, ki so povezani z cepivom Bexero, pa antigene fHbp, NadA, NHBA in PorA. Z razvojem novih tehnologij prihaja v ospredje in postaja vse bolj cenovno dostopna metoda sekvenciranja celotnega genoma (angl. *whole genome sequencing*, WGS). Tako dobimo celoten genetski zapis

za posamezen izolat. Iz teh podatkov lahko naredimo genetske študije tipizacije, sorodnosti, funkcionalne genomike, študije antigenov, povezanih s cepivi in s protimikrobno odpornostjo.

## METODE

V okviru nacionalnega spremljanja invazivnih obolenj, povzročenih s *H. influenzae*, *N. meningitidis* in *S. pneumoniae*, v Sloveniji na Oddelku za javnozdravstveno mikrobiologijo Ljubljana, Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) že od leta 1993 zbiramo invazivne izolote omenjenih bakterij. Izolote prejemo iz vseh 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. Vsem prejetim izolatom *N. meningitidis* smo potrdili identifikacijo, določili občutljivost za antibiotike, določili serokupino z metodo aglutinacije na stekelcu in z molekularno metodo verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) ter jih zamrznili na  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pri 61 izolatih, prejetih v obdobju 2010–2017, smo izvedli WGS. Bakterijsko DNA smo izolirali z aparatom Magna Pure Compact, Roche in ustreznim komercialnim kompletom MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I. Izolatom DNA izolatov smo fluorometrično izmerili koncentracijo. Za pravo knjižnice smo 150 ng izolirane DNA fragmentirali s pomočjo mešanice restrikcijskih encimov. Fragmentacijo smo načrtovali tako, da so bile dolžine nastalih fragmentov v območju 200–400 baznih parov, odvisno od instrumenta, ki smo ga v nadaljevanju uporabili za sekvenciranje. Dolžino fragmentov smo preverili z instrumentom LabChip GX (PerkinElmer). Pri pripravi knjižnice smo sledili navodi-

lom kompleta reagentov Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit proizvajalca Thermo Fisher Scientific. Posamezne vzorce smo označili s specifičnimi nukleotidnimi zaporedji, tako imenovanimi »barkodami«, s čimer smo omogočili hkratno sekvenciranje več vzorcev. Pripravljenim knjižnicam smo določili koncentracijo z instrumentom LabChip GX. Vezavo pripravljenih fragmentov na Ion Sphere kroglice in pomnoževanje knjižnic z emulzijskim PCR smo izvedli bodisi z instrumentom OneTouch II bodisi s sistemom IonChef (Thermo Fisher Scientific). Za sekvenciranje smo uporabljali vse tri razpoložljive instrumente Ion Torrent, in sicer Ion Torrent PGM, Proton ter S5. Za osnovno analizo sekvenc in prilaganje na referenčni genom smo uporabili programsko opremo Torrent Suite Software. S programom SPAdes, ki je tudi vključen v Torrent Suite Software, smo izvedli tudi *de novo* sestavljanje sekvenciranih zaporedij testiranih izolatov.

Sekvence izolatov smo vnesli v bazo Neisseria PubMLST (<http://PubMLST.org/neisseria>), ki jo je na Univerzi v Oxfordu razvil Keith Jolley (15). Z uporabo programa BigsDB (Bacterial Isolate Genome Sequence Database), ki se uporablja za kreiranje podatkovnih baz za hranjenje in analiziranje genskih sekvenc bakterijskih izolatov, smo določili profil MLST, PorAVR1, PorAVR2 in FetA ter profil antigenov, povezanih s cepivom Bexero (fHbp, NadA, NHBA in PorA). Z uporabo programa BIGSdb in programa Genome Comparator smo analizirali genetsko sorodnost proučevanih izolatov na osnovi analize cgMLST v1.0 (jedrni genom MLST) (16). Jedrni genom (angl. *core genome*) pomeni vse gene ki so prisotni v vseh izolatih določene bakterijske vrste. Pri *N. meningitidis* je tako definiranih 1.605 genov.

## REZULTATI

Povprečna letna pojavnost za obdobje 2010–2017 je bila 0,4/100.000. Najvišja po-

javnost je bila v starostni skupini mlajših od dveh let, kjer je znašala letno v povprečju 7,8/100.000 v obdobju 2010–2017. Sledijo mladostniki, starosti 15–19 let, s povprečno letno pojavnostjo 1,1/100.000. V letu 2015 smo opazili porast v skupini otrok, zlasti pri mlajših od dveh let, ko je pojavnost dosegla 14,2/100.000.

V laboratorij smo v obdobju 2010–2017 prejeli 66 izolatov. 71 % vseh je pripadalo seroskupini B, 17 % seroskupini C, 11 % seroskupini Y in 1 % seroskupini Z. Z metodo MLST smo izolate natančneje opredeli in jim določili tip ST. Najpogostejši sekvenčni tipi so pripadali klonskim kompleksom ST-41/44 complex (14 izolatov; 23 %), ST-11 complex (8 izolatov; 13 %), ST-269 complex (7 izolatov; 11,5 %), ST-32 complex (7 izolatov; 11,5 %), ST-213 complex (4 izolati; 6,5 %) in ST-23 complex (4 izolati; 6,5 %). Seroskupina B je bila najbolj variabilna, saj smo pri izolatih te seroskupine zaznali 26 različnih tipov ST, največ iz klonskih kompleksov ST-41/44 complex (13 od 43 primerov), ST-269 complex (7 od 43 primerov), in ST-32 complex (7 od 43 primerov). Pri izolatih seroskupine C smo opazili večjo homogenost, saj smo pri 7 od 10 dokazali ST-11 (finetype P1.5-1,10-8: F3-6). Tudi pri izolatih seroskupine Y smo opazili homogenost, saj smo pri 4 od 7 dokazali ST-23 complex, (najpogostejši »finetype« P1.5-1,2-5: F5-8: ST-23).

Pri proučevanju antigenov, povezanih s cepivom Bexero, smo prav tako opazili visoko stopnjo variabilnosti. Cepivo Bexero vsebuje antigene, ki so jih opredelili kot tip BAST-1 (Bexsero® Antigen Sequence Type), in sicer fHbp 1, NHBA 2, NadA 8, PorAVR1 7-2 in PorAVR2 4. Od 43 izolatov seroskupine B, se je pri 17 ujema vsaj en alel znotraj profila BAST. Najbolj pogost profil BAST je bil 1076 (fHbp 14, NHBA 29, NadA 0, PorA 7-2,4), imelo ga je pet izolatov.

S programom Genome Comparator smo analizirali genetsko sorodnost proučevanih

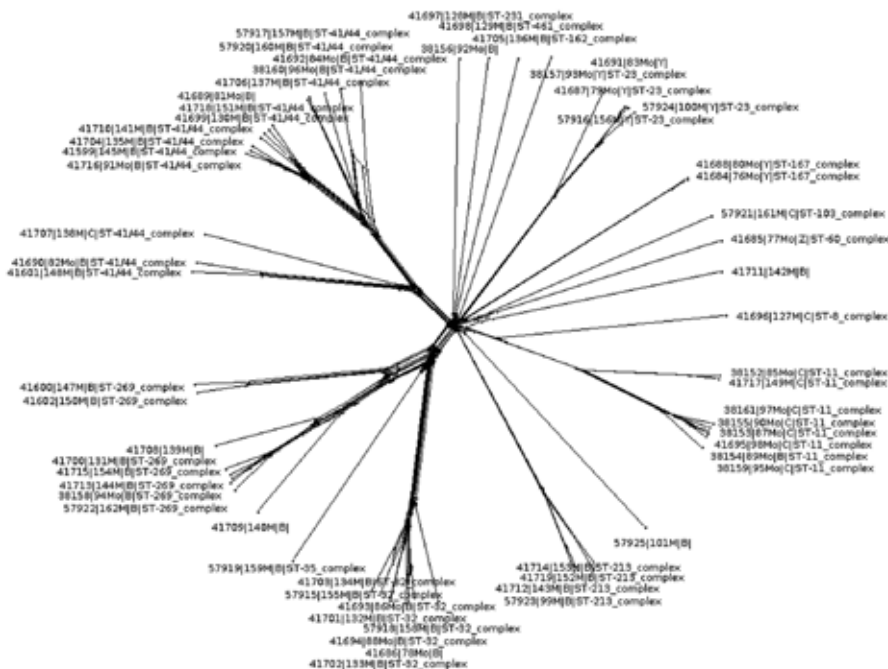
izolatov na osnovi večgenske sekvenčne tipizacije jedrnega genoma (angl. *core genome multiple locus sequence typing*, cgMLST) (1.605 jedrnih genov). Ugotovili smo, da izolati tvorijo nekaj večjih skupin, ki se ujemajo z že predhodno opisanimi klonskimi kompleksi. Za porast pojavnosti v letu 2015 v skupini otrok niso odgovorni genetsko povezani sevi, temveč so izolati genetsko zelo različni. Najbolj sorodni so izolati znotraj kompleksa CC-11.

## RAZPRAVA

V Sloveniji spremljamo invazivne meningokoke na nacionalni ravni že od leta 1993 naprej. V Sloveniji je prijavna incidenčna stopnja potrjenih primerov IMD nizka in podobna kot v evropskem povprečju (v letu 2016 je znašala 0,6/100.000 prebivalcev).

IMD je redka, vendar zelo resna bolezen. Ima velik javnozdravstveni pomen, predvsem zaradi visoke smrtnosti, možnosti trajnih posledic pri prebolelih in možnosti pojava epidemij ter hkrati možnosti preprečevanja s cepljenjem. Zato je spremljanje na nacionalni ravni, tako laboratorijsko kot epidemiološko, velikega pomena.

S spremljanjem, z obravnavo vsakega primera bolezni, lahko preprečimo nadaljnje primere. IMD spada v prvo skupino nalezljivih bolezni po Zakonu o nalezljivih boleznih in Pravilniku o prijavi nalezljivih bolezni. Zdravnik mora ob sumu ali postavitvi diagnoze IMD prijaviti v šestih urah na Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ) vsak možen, verjeten ali potrjen primer (4). Klasična laboratorijska diagnostika temelji na gramskem razmazu in osamitvi bakterije iz vzorca. Ta način diagnostike je počasen, saj traja vsaj 24 ur, navadno



**Slika 1:** Populacija invazivnih meningokokov v Sloveniji, 2010–2017, analiza Neighbor-Net, SplitsTree4 na osnovi cgMLST (1.605 jedrnih genov). cgMLST – večgenska sekvenčna tipizacija jedrnega genoma (angl. *core genome multiple locus sequence typing*, cgMLST).

več, hkrati pa je neuporaben v primeru, ko je bolnik že prejel antibiotike. Glede na razpoložljivost molekularnih metod, bi morali zdravniki vzorce pri sumu na IMD poslati na oboje, osamitev v kulturi in molekularno diagnostiko. Tako je zapisano tudi v algoritmu. Znano je, da so molekularne metode bolj občutljive, hitreje, zaznajo tudi mrtve bakterije. V številnih objavah poročajo o nujnosti molekularne diagnostike pri sumu na IMD, saj lahko tako dokažemo tudi do 40 % več pozitivnih primerov (17, 18).

Za potrebe nacionalnega spremljanja je nujno laboratorijsko spremljanje te javnozdravstveno pomembne bakterije. V Sloveniji vsa leta prevladuje seroskupina B, ki je pa genetsko najbolj variabilna. Cepivo proti tej seroskupini je osnovano na štirih antigenih, ki so tudi zelo raznoliki. Zato so za spremljanje nujne bolj natančne molekularne analize. Z njimi lahko natančneje opredelimo populacijo meningokokov. V Sloveniji smo dokazali, da je celotna populacija invazivnih meningokokov genetsko raznolika, hkrati pa sestavljena iz več sorodnih skupin oz klonskih kompleksov. Vsi pogostejši dokazani klonski kompleksi vsebujejo tudi pomembne hipervirulentne klone, ki se širijo po svetu (CC-11, CC41/44, CC32) (19–21). Medtem ko so izolati v seroskupini B genetsko heterogeni, so izolati iz seroskupine C in Y bolj sorodni. Znotraj opazovanih antigenov, povezanih s cepivom Bexero, BAST, smo dokazali visoko raznolikost. Vendar glede na to, da je možna še križna reaktivnost, prisotnost drugega alela še ne pomeni nujno, da reaktivnosti ni. Zato pri proučevanju antigenov, njihovega izražanja in reaktivnosti zgolj nukleotidna zaporedja niso dovolj za opredelitev ujemanja

s cepivom. Učinkovitost cepljenja s cepivom Bexero bo mogoče določiti šele po nekajletni uporabi. Na podlagi evropske študije predvidevajo, da naj bi cepivo Bexero pokrilo 78 % invazivnih meningokokov seroskupine B (12).

## ZAKLJUČEK

Kljub nizki stopnji pojavnosti ima bakterija *N. meningitidis* velik javnozdravstveni pomen, predvsem zaradi možnosti pojava epidemije. Z razvojem novih molekularnih tehnologij in tudi njihovo dostopnostjo je njihova uporaba v namene poglobljenega spremljanja postala nujna. S proučevanjem invazivnih meningokokov v Sloveniji v obdobju 2010–2017 smo dokazali, da prevladuje seroskupina B, ki pa je zelo heterogena. Pomembna je tudi seroskupina C, ki je bila genetsko zelo homogena in večina izolatov je pripadala hipervirulentnemu klonskemu kompleksu CC-11, ki je bil opisan v številnih izbruhih (21–23). Razmere v Sloveniji so endemične, prisotni so pomembni klonski kompleksi, ki jih najdemo tudi drugje po svetu, vključno s hipervirulentnimi kloni, zmožnimi povzročati epidemije. Zato je javnozdravstveno spremljanje na ravni države nujno. Pomembno pa je tudi osveščanje o pomenu hitre molekularne diagnostike in upoštevanju meningokoknega algoritma, saj samo tako lahko spremljamo dejansko stanje v državi. Z uvedbo novega cepiva proti seroskupini B, ki temelji na antigeni sestavi, bo tudi iz tega vidika treba zagotoviti nadaljnje poglobljeno molekularno spremljanje zaradi natančne opredelitve izolatov in proučevanja ujemanja antigenov v cepivu s krožečimi.

## LITERATURA

- Stephens DS. Uncloaking the meningococcus: dynamics of carriage and disease. *Lancet*. 1999; 353 (9157): 941–2.
- Cartwright KA, Stuart JM, Jones DM, et al. The Stonehouse survey: Nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidemiol Infect*. 1987; 99 (3): 591–601.
- Caugant DA, Maiden MC. Meningococcal carriage and disease-population biology and evolution. *Vaccine*. 2009; 27 (Suppl 2): B64–70.
- NIJZ. Invazivna meningokokna bolezen – algoritem ukrepanja [internet]. NIJZ; 2017 [citirano 2018 Nov 11]. Dosegljivo na: <http://www.nijz.si/sl/meningokokni-meningitis-algoritem-ukrepanja-za-strokovno-javnost>
- Goldacre MJ, Roberts SE, Yeates D. Case fatality rates for meningococcal disease in an English population, 1963–1998: database study. *BMJ*. 2003; 327 (7415): 596–7.
- Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and *Neisseria meningitidis*. *Lancet*. 2007; 369 (9580): 2196–210.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Invasive meningococcal disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2016. Stockholm: ECDC; 2018.
- Chang Q, Tzeng YL, Stephens SD. Meningococcal disease: changes in epidemiology and prevention. *Clin Epidemiol*. 2012; 4: 237–45.
- Törös B, Thulin Hedberg S, Jacobsson S, et al. Surveillance of invasive *Neisseria meningitidis* with a serogroup Y update, Sweden 2010 to 2012. *Euro Surveill*. 2014; 19 (42).
- Campbell H, Ladhani S. The importance of surveillance: Group W meningococcal disease outbreak response and control in England. *Int Health*. 2016; 8 (6): 369–71.
- Parikh SR, Andrews NJ, Beebejaun K, et al. Effectiveness and impact of a reduced infant schedule of 4CMenB vaccine against group B meningococcal disease in England: a national observational cohort study. *Lancet*. 2016; 388 (10061): 2775–82.
- Vogel U, Taha MK, Vazquez JA, et al. Predicted strain coverage of a meningococcal multicomponent vaccine (4CMenB) in Europe: a qualitative and quantitative assessment. *Lancet Infect Dis*. 2013;13 (5): 416–25.
- O’Ryan M, Stoddard J, Toneatto D. A multi-component meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB): the clinical development program. *Drugs*. 2014; 74 (1): 15–30.
- European Centre for Disease Prevention and Control. External quality assurance scheme for *Neisseria meningitidis* – 2012. Stockholm: ECDC; 2013.
- Jolley KA, Maiden MCJ. BIGSdb: scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*. 2010; 11: 595.
- Bratcher HB, Corton C, Jolley KA, et al. A gene-by-gene population genomics platform: de novo assembly, annotation and genealogical analysis of 108 representative *Neisseria meningitidis* genomes. *BMC Genomics*. 2014; 15: 1138.
- Bryant PA, Li HY, Zaia A, et al. Prospective study of a real-time PCR that is highly sensitive, specific, and clinically useful for diagnosis of meningococcal disease in children. *J Clin Microbiol*. 2004; 42 (7): 2919–25.
- Corless CE, Guiver M, Borrow R, et al. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 1553–8.
- Jandova Z, Musilek M, Vackova Z, et al. Serogroup and clonal characterization of Czech invasive *Neisseria meningitidis* strains isolated from 1971 to 2015. *PLoS One*. 2016; 11 (12): e0167762.
- Lucidarme J, Hill DM, Bratcher HB, et al. Genomic resolution of an aggressive, widespread, diverse and expanding meningococcal serogroup B, C and W lineage. *J Infect*. 2015; 71 (5): 544–52.
- Read RC. *Neisseria meningitidis*; clones, carriage, and disease. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20: 391–5.
- Yazdankhah SP, Caugant DA. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. *J Med Microbiol*. 2004; 53: 821–32.
- Taha MK, Claus H, Lappann M, et al. Evolutionary events associated with an outbreak of meningococcal disease in men who have sex with men. *PLoS One*. 2016; 11 (5): e0154047.





Sandra Janežič<sup>1</sup>

# Uporaba sekvenciranja genomov za tipizacijo bakterij v molekularni epidemiologiji

## *Application of Whole Genome Sequencing for Bacterial Typing in Molecular Epidemiology*

### IZVLEČEK

---

**KLJUČNE BESEDE:** sekvenciranje genomov, večgenska sekvenčna tipizacija jedra genoma, analiza polimorfizmov posameznih nukleotidov, prenosi

Izbruhi bakterijskih okužb, predvsem izbruhi z večkratno odpornimi bakterijami, predstavljajo grožnjo v bolnišnicah povsod po svetu. Za epidemiološki nadzor in razumevanje prenosov in širjenja patogenih mikroorganizmov so se zelo zgodaj začele uporabljati tipizacijske metode. Te metode so na začetku temeljile na primerjavi fenotipskih markerjev, pozneje pa so le-te zamenjale genotipske metode, ki temeljijo na analizi manjšega dela bakterijskega genoma. V zadnjih letih sta z razvojem novih generacij sekvenciranja postala bolj dostopna sekvenciranje in analiza genomskih zaporedij, ki jih s pridom uporabljamo tudi za genotipizacijo bakterij. Analiza genomskih zaporedij trenutno predstavlja metodo z največjo močjo razlikovanja, s katero lahko razlikujemo celo znotraj sorodnih bakterijskih vrst ali filogenetskih linij, kar nam ostale metode ne omogočajo. Po drugi strani pa lahko s primerjavami genomov izolate uvrstimo tudi v globalnem kontekstu, oz. iz genomskih zaporedij določimo *in silico* tudi gene, ki kodirajo dejavnike virulence in antibiotične odpornosti. V tem prispevku bom predstavila uporabo sekvenciranja genomov bakterij za potrebe epidemiološkega nadzora, različne pristope za tipizacijo na podlagi analize genomskih zaporedij in nekaj naših primerov iz prakse.

### ABSTRACT

---

**KEY WORDS:** genome sequencing, core genome multiple locus sequence typing, single nucleotide polymorphism analysis, transmissions

Outbreaks of bacterial infections, especially outbreaks caused by multiple-resistant bacteria pose a threat in hospitals around the world. Very early on typing methods were introduced for epidemiological surveillance and understanding pathogen transmission and spread patterns. At the beginning these methods were based on the characterization of phenotypic markers and were later replaced by genotyping methods based on analyzing a small segment of the bacterial genome. In recent years, whole genome

---

<sup>1</sup> Doc. dr. Sandra Janežič, univ. dipl. mikr., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Center za medicinsko mikrobiologijo, Oddelek za mikrobiološke raziskave, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor; sandra.janezic@ntzoh.si

sequencing and analysis has become more accessible and affordable as a genotyping tool. Analysis of whole genome sequences currently provides ultimate discriminatory power and can be used as a method for differentiating between related bacteria and even within bacterial lineages, which is mostly impossible with other methods. On the other side, whole genome comparisons enable positioning of isolates within the global context or *in silico* determination of microbial virulence genes and antimicrobial drug resistance determinants. This paper presents the application of whole genome sequencing of bacteria for epidemiological surveillance needs, different typing approaches based on genome sequence analysis and a few examples from our practice.

## UVOD

Okužbe in izbruhi okužb, ki jih povzročajo večkratno odporne bakterije, predstavljajo grožnjo v bolnišnicah povsod po svetu (1). Zato so se za epidemiološki nadzor in razumevanje prenosov ter širjenja patogenih mikroorganizmov že zelo zgodaj začele uporabljati tipizacijske metode, s katerimi določamo sorodnost izolatov iste vrste. Na začetku so tipizacijske metode temeljile na primerjavi fenotipskih markerjev (antibiogrami, proteinski profili ali npr. serotipizacija, ki se uporablja še danes), pozneje pa so le-te zamenjale genotipske metode. V začetku so bile to metode, ki so temeljile na analizi manjšega dela bakterijskega genoma – šlo je za primerjavo prstnega odtisa po pomnoževanju (polimorfizem dolžin pomnoženih delov (angl. *amplified fragment length polymorphism*, AFLP), verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR), PCR ribotipizacija itd.), restrikciji dela genona (analiza polimorfizma restrikcijjskih fragmentov (angl. *restriction fragment length polymorphism*, PCR-RFLP)), celotnega genoma (pulzna gelska elektroforeza (angl. *pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE)) ali analizi nukleotidnega zaporedja enega (tipizacija gena *slpA*) ali nekaj genov (večgenska sekvencna tipizacija (angl. *multilocus sequence typing*, MLST)). Naštete metode niso splošno primerne za vse bakterijske vrste, imajo tudi različne moči razlikovanja, zato je tre-

ba izbrati ustrezno metodo glede na bakterijo kot tudi glede na epidemiološko vprašanje, na katerega želimo s tipizacijo dobiti odgovor (2). Zahvaljujoč napredku v tehnologijah sekvenciranja v zadnjih dveh desetletjih, je sekvenciranje bakterijskih genomov postalo precej bolj dostopno, tako v pogledu cene kot hitrosti (3). V klinični mikrobiologiji se sekvenciranje genomskih zaporedij uporablja predvsem na področju javnozdravstvene mikrobiologije, t. j. za tipizacije mikroorganizmov (4). Prednost sekvenciranja genomskih zaporedij v primerjavi s klasičnimi metodami je univerzalna metodologija (z enakimi pristopi lahko posekvenciramo genome različnih bakterij), prav tako pa lahko analizo genomskih zaporedij uporabimo na različnih ravneh, tako za spremljanje prenosov okužb (od osebe do osebe, t. i. forenzična epidemiologija), lokalnega širjenja povzročiteljev okužb, raziskovanje izbruhov in ponavljajočih se okužb (ali gre za ponovno okužbo z drugim sevom ali recidiv) kot tudi za raziskovanje globalne epidemiologije in populacijske strukture vrste (5, 6). Z eno metodo lahko tako odgovorimo na več vprašanj, raziščemo izbruh, hkrati pa izolate uvrstimo tudi v globalnem kontekstu (določimo npr. genotip) (7).

Poleg tega pa analize genomskih zaporedij počasi stopajo tudi na področje diagnostične mikrobiologije. Iz genomskih zaporedij lahko določimo, kateri vrsti pripada

izolat, poiščemo gene, ki kodirajo znane dejavnike virulence (t. i. virulom), ali gene, ki kodirajo rezistence na antibiotike (t. i. rezistom) (8).

### PRISTOPI ZA PRIMERJAVE GENOMSKIH ZAPOREDIJ

Za določanje sorodnosti med izolati na osnovi analize in primerjave genomskih zaporedij so v uporabi različni pristopi. Dva najpogostejša sta analiza polimorfizmov posameznih nukleotidov (angl. *single nucleotide variant*, SNV ali *single nucleotide polymorphism*, SNP) ter primerjava alelnega profila jedra genoma (angl. *core genome multiple locus sequence typing*, cgMLST) (5).

Za analizo SNP velja, da ima trenutno največjo moč razlikovanja (angl. *discriminatory power*), saj nam omogoča razlikovanje med dvema izolatom, če se razlikujeta v enem samem nukleotidnem mestu. Pri tem pristopu največkrat odčitke (to so kratke sekvence genoma, surovi podatki, ki jih dobimo s sekvenciranjem, angl. *reads*) ali soseske (že sestavljeni odčitki, angl. *contigs*) vseh izolatov, ki jih primerjamo, najprej poravnamo na referenčni genom, nato pa poiščemo variabilna mesta, torej mesta, kjer se ti izolati razlikujejo in na podlagi tega ocenimo sorodnost izolatov (bodisi s pomočjo filogenetskih dreves ali matrike, ki nam pokaže število SNP med pari izolatov). Slabost metode je, da moramo za vsak dodatni izolat, ki ga vključimo v primerjavo, celotno analizo izvesti od začetka; iz tega razloga tudi ne moremo standardizirati nomenklature (9).

Vprašanje na mestu je tudi, koliko SNP lahko dopustimo med dvema izolatom, da ju še označimo kot klonalna, da ocenimo, ali sta npr. del izbruha, oz. da je res prišlo do prenosa med dvema ali več osebami. To ni neka univerzalna številka, ki bi bila enaka za vse bakterije, ampak je odvisna od molekularne ure, torej od tega, kako hitro se v genomu neke določene bakte-

rijske vrste kopičijo mutacije, kako hitro se genom spreminja. Hitrost spreminjanja bakterijskih genomov najlažje ocenimo s sekvenciranjem izolatov, ki jih dobimo iz zaporednih, nekajmesečnih vzorčenj istega bolnika. Za nekatere klinično pomembne bakterije so molekularne ure že ocenili. Tako se npr. genom bakterije *Staphylococcus aureus* spreminja s hitrostjo  $3 \times 10^{-6}$  mutacije na nukleotidno mesto na leto, kar je približno 8–9 mutacij na genom na leto. Precej počasneje se mutacije kopičijo pri bakteriji *Escherichia coli*, približno ena mutacija na genom na leto ali pri *Mycobacterium tuberculosis*, kjer lahko pričakujemo med 0 in 1 mutacijo v celotnem genomu na leto (5). Za bakterijo *Clostridioides difficile* se npr. v skladu s temi ocenami, dva izolata pojmuje kot klonalna in sta potencialno del izbruha, če se razlikujeta v 1–2 SNP, in kot nesorodna izolata, ki se razlikujeta v  $> 10$  SNP (10).

Analizo SNP lahko uporabimo tako za proučevanje globalnega širjenja sevov kot tudi za forenzično epidemiologijo. S pomočjo analize SNP so npr. za bakterijo *C. difficile* pokazali, kako se je iz ZDA in Kanade v Evropo in v Azijo širil hipervirulentni sev, PCR ribotip 027, ki je še vedno odgovoren za številne okužbe in izbruhe okužb povsod po svetu (11). Po drugi strani pa so objavljeni številni primeri, kjer so z analizo SNP uspešno raziskali izbruh, pot širjenja in vir okužbe (npr. izbruh z bakterije *S. aureus* odporne na meticilin (angl. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) na oddelku za posebno nego novorojenčkov v bolnišnici v Veliki Britaniji) ali pa primeri, kjer so z analizo SNP pri bolnikih s ponavljajočimi se okužbami s *C. difficile* razlikovali med okužbo z novim sevom ali recidivom stare okužbe (12–14).

Druga metoda, ki se pogosto uporablja za primerjavo celotnih genomskih zaporedij, je t. i. cgMLST. Metoda deluje na enakem principu kot klasična MLST, ki odraža variabilnost v nukleotidnem zaporedju večje-

ga števila genov. Število genov, ki sestavljajo shemo MLST, je pri večini bakterij sedem, zaradi česar je moč razlikovanja MLST običajno prenizka za raziskovanje izbruhov in je bolj primerna za globalne epidemiološke študije in filogenetske analize (15). Pri cgMLST pa se v primerjavo vključi več 100 do preko 2.000 genov (odvisno od bakterijske vrste), zaradi tega se poveča sama moč razlikovanja metode in jo lahko uporabimo tudi za raziskovanje izbruhov in prenosov. V shemo cgMLST so vključeni geni jedra genoma, ki so prisotni pri večini izolatov določene vrste (9, 16).

Na voljo so tudi že različni komercialni (BioNumerics (Applied Maths) in SeqSphere (Ridom)) in prosto dostopni (Enterobase) programi in baze, ki nam omogočajo analizo in primerjavo izolatov. Shema cgMLST (natančno definiran nabor genov vključenih v primerjavo) so na voljo za številne klinično pomembne bakterije, kot so *Acinetobacter baumannii*, *Brucella melitensis*, *C. difficile*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus* idr. (<https://www.cgmlst.org/>).

Ker pri cgMLST primerjava ne temelji neposredno na primerjavi nukleotidnega zaporedja, ampak alelnih profilov (vsak gen, ki ima drugačno nukleotidno zaporedje od prejšnjega, dobi novo alelna številko in takšno zaporedje alelnih števil predstavlja alelni profil) in ker se nukleotidna zaporedja alelov ter alelni profili shranjujejo v skupne baze, lahko enostavno dodajamo nove izolate in jih primerjamo z že analiziranimi izolati v bazi. Prednost tega je, da lahko uporabimo enotno nomenklaturu in tako lahko naše izolate primerjamo tudi na globalni ravni (16). Slabost tega pristopa je, da programi in baze (razen Enterobase) niso prosto dostopni.

Pri uvajanju novih tipizacijskih pristopov je pomembna tudi kompatibilnost s prejšnjimi metodami, predvsem za spremljanje širjenja določenih sevov v času, brez potrebe, da bi že okarakterizirane izolate

morali še enkrat tipizirati z novo metodo. Iz genomskih zaporedij lahko *in silico* določimo npr. profil MLST, spa-tip (pri *S. aureus*), tip PFGE (če imamo celotne, zaključene genome) ali serotip pri salmonelah (9, 17, 18).

## PREGLJED PRIMEROV IZ PRAKSE

Na Oddelku za mikrobiološke raziskave, Center za mikrobiologijo, Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) uporabljamo sekvenciranje in primerjavo genomskih zaporedij na različnih področjih in za različne bakterije. Primarno nas zanima predvsem epidemiologija bakterije *C. difficile*; rezervoarji bakterije, poti prenosa ter širjenje sevov s spremenjenimi toksinskimi geni. V sodelovanju z drugimi oddelki NLZOH in drugimi inštitucijami pa pristope primerjalne genomike največkrat uporabimo za identifikacijo vira ali poti okužbe, za *in silico* tipizacijo (MLST ali serotipizacijo salmonel) ter za določanje viruloma ali rezistoma, slednje samo za raziskovalne namene ali za potrebe epidemiološkega nadzora.

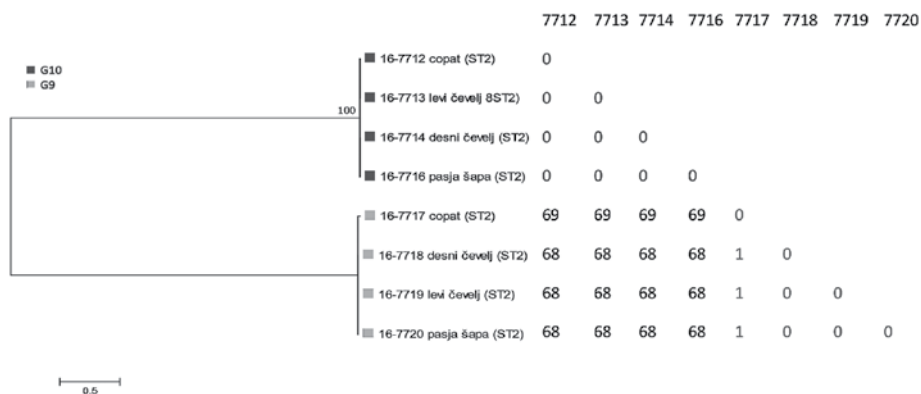
Genome sekvenciramo s sistemom MiSeq (Illumina), za analize pa uporabljamo različne prosto dostopne (CSIPhylogeny, Center for Genomic Epidemiology) ali komercialne (SeqSphere, Ridom) programe. V nadaljevanju podajam povzetek nekaj primerov iz prakse.

*C. difficile* je pomembna patogena bakterija, ki povzroča črevesne okužbe. Čeprav jo povezujemo večinoma z bolnišničnim okoljem, pa v zadnjih letih opažamo porast okužb tudi v domačem okolju, kar kaže na obstoj zunajbolnišničnih rezervoarjev (19). V eni od raziskav smo ugotovili, da so spore bakterije *C. difficile* pogosto prisotne na podplatih čevljev, hišnih copat in pasjih šapah ter da pogosto v istem gospodinjstvu na vseh treh površinah (podplatih in pasjih šapah) najdemo enake PCR-ribotipe. PCR-ribotipizacija je metoda izbora za genotipizacijo *C. difficile*, vendar ima nizko moč

razlikovanja. Ker nas je zanimalo, ali gre za klonalne izolate, smo tem izolatom sekvencirali genome ter njihovo sorodnost določili z analizo SNP. V dveh gospodinjstvih smo na podplatih čevljev in copat ter pasjih tačkah našli izolate, ki so se razlikovali v 0–1 SNP (slika 1), kar kaže, da te površine lahko prispevajo k razširjanju spor (20).

V podobni raziskavi smo na primer pokazali, da se spore *C. difficile* lahko na podplatih čevljev prenašajo v bolnišničnem

okolju (znotraj posameznih oddelkov ali med različnimi oddelki) in da lahko predstavljajo tudi nevarnost za okužbe hospitaliziranih bolnikov, saj smo z analizo SNP pokazali, da so nekateri izolati s podplatov sorodni (0–2 SNP) z izolati, ki smo jih izolirali iz bolnikov (Janežič in sod., poster predstavljen na kongresu ICDS (angl. *International C. difficile Symposium*); [http://www.icds.si/wp-content/uploads/2018/09/P101\\_Janezic-Sandra.pdf](http://www.icds.si/wp-content/uploads/2018/09/P101_Janezic-Sandra.pdf)).



**Slika 1:** Primerjava genomskih zaporedij z analizo SNP osmih izolatov bakterije *Clostridium difficile*, izoliranih s podplatov čevljev, hišnih copat, z blazinic pasjih tačk iz dveh različnih gospodinjstev (G10 in G9). Klonalne izolate smo našli znotraj posameznega gospodinjstva, medtem ko izolati iz različnih gospodinjstev niso bili sorodni (> 10 SNP razlike). Število SNP med pari izolatov je prikazano v matriki na desni (20). SNP – polimorfizem posameznega nukleotida (angl. *single nucleotide polymorphism*).

V sodelovanju s Kliniko za pediatrijo Univerzitetnega kliničnega centra Maribor smo s pristopom primerjalne genomike potrdili domnevo, da je vir okužbe 2,5-mesečnega dojenčka z bakterijo *S. aureus*, ki se je kazala kot gastroenteritis, materino mleko (otrokova mati je namreč imela na dojki absces, povzroččen s *S. aureus*). Skupaj smo analizirali štiri izolate, dva iz otroka (iz brisa nosne sluznice ter blata) ter dva iz matere (enega iz mleka in enega iz brisa nosne sluznice). Genomska zaporedja smo primerjali z analizo SNP (s programom CSIPhylogeny, prosto dostopnim na spletni strani Cen-

ter for Genomic Epidemiology). Vsi štirje izolati so imeli do največ sedem SNP med pari izolatov, pri čemer sta se izolat iz brisa nosne sluznice dojenčka in izolat iz materinega mleka razlikovala v samo dveh nukleotidnih mestih (rezultati niso prikazani, članek v pripravi).

V sodelovanju z Oddelkom za medicinsko mikrobiologijo Celje (NLZOH) vpeljujemo metodo serotipizacije salmonel *in silico*. Serotipizacija je fenotipska metoda in je še vedno pomembna metoda za sledenje in tipizacijo bakterije *Salmonella Enterica*. Določene deleža (10–15%) izolatov ni mogo-

če fenotipsko serotipizirati. Pri tej izolatih lahko serotip določimo na podlagi analize genomskega zaporedja.

Za serotipizacijo *in silico* sta na voljo dva prosto dostopna programa SISTR (angl. *Salmonella In Silico Typing Resource*) (<https://lfz.corefacility.ca/sistr-app/>) in SeqSero 1.0 (<http://www.denglab.info/SeqSero>). Program SISTR napove serotip na podlagi analize *wzx* in *wzy* genov regije *rfb* za določanje somatskega (O) antigena in *fliC* ter *fliB* za določanje H1 in H2 antigena. Napovedano antigensko formulo nato primerja z referenčno bazo serotipov WKL, na podlagi katere določi serotip. Pri antigenskih formulah, pri katerih ni mogoče nedvoumno določiti serotipa samo na podlagi analize genov *wzx/wzy*, program SISTR določi še MLST (n = 7 genov) in cgMLST (n = 330 genov) sekvenčni tip ter na podlagi tega ponudi najverjetnejši serotip testiranemu izolatu (21). SeqSero predvidi serotip samo

na podlagi analize *rfb* regije za določanje somatskega antigena in *fliC* ter *fliB* za določanje antigena H1 in H2, ter zaporedja primerja z bazo (22).

## ZAKLJUČEK

Sekvenčiranje in primerjava genomskih zaporedij ima potencial, da postane prevladujoča metoda v klinični mikrobiologiji, ki bo s standardiziranimi protokoli omogočala podrobnejšo karakterizacijo patogenih mikroorganizmov. Predvsem na področju javnozdravstvene mikrobiologije primerjava genomskih zaporedij že velja za metodo izbora za tipizacijo izolatov za spremljanje izbruhov in širjenja sevov. Analiza genomskih zaporedij nam omogoča tudi karakterizacijo genov, ki kodirajo dejavnike virulence, in determinant, ki kodirajo odpornost na antibiotike, kar je skupaj s tipizacijo bistveno za učinkovit nadzor nalezljivih bolezni.

## LITERATURA

1. Wong H, Eso K, Ip A, et al. Use of ward closure to control outbreaks among hospitalized patients in acute care settings: a systematic review. *Syst Rev*. 2015; 4 (1): 152.
2. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13 (Suppl 3): 1–46.
3. Gilchrist CA, Turner SD, Riley MF, et al. Whole-genome sequencing in outbreak analysis. *Clin Microbiol Rev*. 2015; 28 (3): 541–63.
4. Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J Biotechnol*. 2017; 243: 16–24.
5. Didelot X, Bowden R, Wilson DJ, et al. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nat Rev Genet*. 2012; 13 (9): 601–12.
6. Quainoo S, Coolen JPM, van Hijum SAFT, et al. Whole-genome sequencing of bacterial pathogens: the future of nosocomial outbreak analysis. *Clin Microbiol Rev*. 2017; 30 (4): 1015–63.
7. Leopold SR, Goering RV, Witten A, et al. Bacterial whole-genome sequencing revisited: portable, scalable, and standardized analysis for typing and detection of virulence and antibiotic resistance genes. *J Clin Microbiol*. 2014; 52 (7): 2365–70.
8. Balloux F, Brønstad Brynildsrud O, van Dorp L, et al. From theory to practice: translating whole-genome sequencing (WGS) into the clinic. *Trends Microbiol*. 2018; 1605: 1–14.
9. Pearce ME, Alikhan N-F, Dallman TJ, et al. Comparative analysis of core genome MLST and SNP typing within a European *Salmonella* serovar Enteritidis outbreak. *Int J Food Microbiol*. 2018; 274: 1–11.
10. Eyre DW, Golubchik T, Gordon NC, et al. A pilot study of rapid benchtop sequencing of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium difficile* for outbreak detection and surveillance. *BMJ Open*. 2012; 2 (3).
11. He M, Miyajima F, Roberts P, et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nat Genet*. 2013; 45 (1): 109–13.
12. Harris SR, Cartwright EJP, Török ME, et al. Whole-genome sequencing for analysis of

- an outbreak of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13 (2): 130–6.
13. Sim JHC, Truong C, Minot SS, et al. Determining the cause of recurrent *Clostridium difficile* infection using whole genome sequencing. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017; 87 (1): 11–6.
  14. Eyre DW, Babakhani F, Griffiths D, et al. Whole-genome sequencing demonstrates that fidaxomicin is superior to vancomycin for preventing reinfection and relapse of infection with *Clostridium difficile*. *J Infect Dis.* 2014; 209 (9): 1446–51.
  15. Maiden MCJ, Jansen van Rensburg MJ, et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11 (10): 728–36.
  16. Bletz S, Janežič S, Harmsen D, et al. Defining and evaluating a core genome multilocus sequence typing scheme for genome-wide typing of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.* 2018; 56 (6).
  17. Yachison CA, Yoshida C, Robertson J, et al. The validation and implications of using whole genome sequencing as a replacement for traditional serotyping for a National Salmonella Reference Laboratory. *Front Microbiol.* 2017; 8: 1044.
  18. Sabat AJ, Hermelijn SM, Akkerboom V, et al. Complete-genome sequencing elucidates outbreak dynamics of CA-MRSA USA300 (ST8-*spa* t008) in an academic hospital of Paramaribo, Republic of Suriname. *Sci Rep.* 2017; 7: 41050.
  19. Crobach MJT, Vernon JJ, Loo VG, et al. Understanding *Clostridium difficile* colonization. *Clin Microbiol Rev.* 2018; 31 (2): e00021–17.
  20. Janežič S, Mlakar S, Rupnik M. Dissemination of *Clostridium difficile* spores between environment and households: Dog paws and shoes. *Zoonoses Public Health.* 2018; 55 (6): 669–74.
  21. Yoshida CE, Kruczkiewicz P, Laing CR, et al. The Salmonella in silico typing resource (SISTR): an open web-accessible tool for rapidly typing and subtyping draft Salmonella genome assemblies. *PLOS ONE.* 2016; 11 (1): e0147101.
  22. Zhang S, Yin Y, Jones MB, et al. Salmonella serotype determination utilizing high-throughput genome sequencing data. *J Clin Microbiol.* 2015; 53 (5): 1685–92.





Marija Trkov<sup>1</sup>, Manica Mueller - Premru<sup>2</sup>, Mateja Pirš<sup>3</sup>, Ingrid Berce<sup>4</sup>, Alenka Štorman<sup>5</sup>, Mateja Ravnik<sup>6</sup>, Metka Paragi<sup>7</sup>, Eva Grilc<sup>8</sup>, Tjaša Žohar Čretnik<sup>9</sup>

## Spremljanje salmonel, listerij in *E. coli*, ki povzročajo črevesne okužbe, z molekularnimi metodami

### *Molecular Surveillance of Salmonella, Listeria and Diarrheagenic E. coli*

#### IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: spremljanje z molekularnimi metodami, salmonela, listerija, *Escherichia coli*, ki povzroča črevesne okužbe

Salmoneloze, listerioze in okužbe z verocitotoksigenimi *E. coli* (VTEC) so med pogostejšimi zoonozami v Evropski uniji. Medtem ko ostaja število potrjenih primerov salmoneloz in okužb z VTEC v zadnjih letih stabilno, število okužb z listerijami počasi narašča. V Evropi je za spremljanje teh bolezni pri ljudeh in preiskovanje izbruhov odgovoren Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni. V ta namen se uporablja različne molekularne metode, kot so pulzna gelska elektroforeza, analiza MLVA za *Salmonella* Enteritidis in *Salmonella* Typhimurium, molekularna serotipizacija za listerije in odkrivanje genov, povezanih z virulenco, ter določanje podtipov genov, ki nosijo zapise za verocitotoksine za VTEC. V zadnjem času pa se vedno bolj uporablja metodologija sekvenciranja celotnega genoma, zlasti za obravnavo izbruhov na splošno in spremljanje listerioz. V prispevku je predstavljeno tudi spremljanje v Sloveniji. Mednarodno dogovorjene standardizirane molekularne metode tipizacije omogočajo primerjavo med humanimi izolati in izolati iz hrane, krme in živali.

#### ABSTRACT

<sup>1</sup> Dr. Marija Trkov, univ. dipl. inž. živil. tehnol., Oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo Ljubljana, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Grablovičeva ulica 44, 1000 Ljubljana; marija.trkov@nlzoh.si

<sup>2</sup> Prof. dr. Manica Mueller - Premru, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1104 Ljubljana

<sup>3</sup> Asist. dr. Mateja Pirš, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1104 Ljubljana

<sup>4</sup> Ingrid Berce, dr. vet. med., spec. klin. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Nova Gorica, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Vipavska cesta 13, 5000 Nova Gorica

<sup>5</sup> Alenka Štorman, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Celje, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Ipavčeva ulica 18, 3000 Celje

<sup>6</sup> Mag. Mateja Ravnik, univ. dipl. kem., Oddelek za medicinsko mikrobiologijo Kranj, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj

<sup>7</sup> Dr. Metka Paragi, univ. dipl. biol., Oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo Ljubljana, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Grablovičeva ulica 44, 1000 Ljubljana

<sup>8</sup> Mag. Eva Grilc, dr. med., Oddelek za nalezljive bolezni, Nacionalni inštitut za javno zdravje, Trubarjeva cesta 2, 1000 Ljubljana

<sup>9</sup> Asist. mag. Tjaša Žohar Čretnik, dr. med., spec. klin. mikrobiol., Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

KEY WORDS: molecular surveillance, *Salmonella*, *Listeria*, diarrheagenic *Escherichia coli*

Salmonellosis, listeriosis and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) infections are some of the most commonly reported zoonotic diseases within the European Union. While the number of confirmed cases of salmonellosis and VTEC infections has remained stable in recent years, the number of *Listeria* infections is slowly increasing. The European Centre for Disease Prevention and Control is in charge of the European union-wide surveillance of these diseases in humans and investigating outbreaks. Various molecular typing methods are used for this purpose, such as pulsed-field gel electrophoresis, multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for *Salmonella* Enteritidis and *S. Typhimurium*, molecular serotyping for *Listeria*, virulence gene detection and subtyping of verocytotoxin encoding genes for VTEC. Recently, whole genome sequencing has been increasingly used, particularly for outbreak investigation in general and *Listeria* surveillance. The paper also presents surveillance in Slovenia. Globally agreed standard molecular typing methods enable comparison of human isolates with isolates from food, feed and animals.

## UVOD

Najpogostejši način okužbe s salmonelami, listerijami, verocitotoksigenimi *E. coli* (VTEC) in nekaterimi drugimi patogenimi tipi *E. coli* je z uživanjem kontaminirane hrane (1). Salmoneloze so med najpogosteje prijavljenimi bakterijskimi zoonozami, ki povzročajo tako posamezne primere okužb kot tudi izbruhe (2–3). Listerioze so sicer redko prijavljene zoonoze, saj se prijavlja večinoma invazivne okužbe. Vendar so pri teh simptomi dolgotrajni, hudi in lahko ogrožajo življenje (4–5). Spremljanje patogenih črevesnih *E. coli* pa je pomembno zaradi njihove velike raznolikosti. Nekateri patogeni tipi (npr. VTEC) lahko povzročajo zelo huda obolenja, zaradi spremenljivosti teh bakterij pa se pojavljajo novi patogeni tipi s kombinacijo dejavnikov virulence in posledično povečano patogenostjo (6).

Bakterije iz rodu *Salmonella* so v naravi zelo razširjene, bolezen pa lahko povzročijo pri ljudeh in živalih. Rod obsega dve vrsti, *S. enterica* in *S. bongori*, znotraj vrste *S. enterica* razlikujemo različne podvrste. Poznamo nad 2.500 različnih serotipov salmonel, bolezni

pri ljudeh pa najpogosteje povzročata *S. Enteritidis* in *S. Typhimurium* (2, 7, 8). Pri okuženih s salmonelami se pojavi driska, ki je lahko vodena ali krvava, bolečine v trebuhu, lahko tudi bruhanje in povišana telesna temperatura. Težave pri večini obolelih izzvenijo v nekaj dneh, pri kroničnih bolnikih lahko vztrajajo več tednov, zapleti pa so redki (9).

Tudi listerije so v naravi zelo razširjene, saj jih najdemo v zemlji, vodi, silaži, odplakah, iztrebkih ljudi, domačih in divjih živali in tudi v različnih živilih. Čeprav so v okolju zelo razširjene, povzročajo bolezen pri ljudeh predvsem vrsta *Listeria monocytogenes*, pri živalih pa tudi *L. ivanovii*. Invazivne okužbe z *L. monocytogenes* so sicer redke, vendar je klinična slika bolezni zelo resna, saj lahko pride do sepse in vnetja osrednjega živčnega sistema. Okužba je zlasti nevarna za nosečnice, novorojenčke, starejše in ljudi z oslABLJENO imunostjo. Večina okužb z *L. monocytogenes* je sporadičnih, v izbruhe pa je navadno vključeno majhno število bolnikov. Dolga inkubacijska doba, starost in zdravstveno stanje bolnikov dodatno otežujeta iskanje virov okužb (5). Sposobnost tvorbe biofilmov, odpornost proti dezinfek-

fekcijskim sredstvom, rast pri temperaturi hladilnikov ter visoki koncentraciji soli in nitratov povečujejo možnost prisotnosti *L. monocytogenes* v hrani (10).

Bakterije vrste *Escherichia coli*, ki povzročajo črevesne okužbe (angl. *diarrheagenic Escherichia coli*, DEC), delimo med verocitotoksigene (VTEC) ali *E. coli*, ki izdelujejo Šigove toksine (angl. *Shiga toxin-producing Escherichia coli*, STEC), enteropatogene (EPEC), enterotoksigene (ETEC), enteroinvazivne (EIEC), enteroagregativne (EAEC) in difuzno adherentne *E. coli* (DAEC). Odkrivajo pa tudi nove patotipe, pri katerih gre pogosto za kombinacije njihovih lastnosti (11). Glavna značilnost verocitotoksigenih *E. coli* (VTEC/STEC) je izdelovanje verocitotoksinov. Pri okuženih bolnikih povzročajo drisko, ki je lahko tudi krvava. Najresnejši zaplet pri okužbi je hemolitični uremični sindrom (HUS). EPEC povzročajo histopatološke spremembe epitelnih celic črevesne sluznice (angl. *attaching and effacing lesions*). Značilnost ETEC je izdelovanje toplotno neobstojnega (angl. *heat-labile*, LT) in/ali toplotno obstojnega enterotoksina (angl. *heat-stable*, ST). EIEC so zelo podobne šigelam, tako po kliničnih znakih bolezni, ki jo povzročajo, kot po mehanizmu virulence. EAEC so genetsko zelo raznolike, redki dejavniki virulence so skupni vsem sevom. Povzročajo lahko krvavo ali dolgotrajno drisko (6).

V prispevku predstavljamo stanje v Evropi glede okužb ljudi s salmonelami, listerijami in patogenimi črevesnimi *E. coli* (zlasti VTEC) ter splošen pomen in način spremljanja njihovih lastnosti, zlasti z molekularnimi metodami, ki poteka pod okriljem Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. *European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) in pri nas.

## MATERIALI IN METODE

Podatki o prijavljenih primerih okužb s salmonelami, listerijami in VTEC v Sloveniji in Evropi so povzeti iz gradiv ECDC,

Evropske agencije za varnost hrane (angl. *European Food Safety Authority*, EFSA) in Nacionalnega inštituta za javno zdravje (NIJZ). Izolati salmonel, listerij in *E. coli* so bili osamljeni iz humanih vzorcev v laboratorijih Oddelkov za medicinsko mikrobiologijo Celje, Maribor, Murska Sobota, Novo mesto, Koper, Kranj, Nova Gorica, Oddelka za javnozdravstveno mikrobiologijo (OJM) Ljubljana, Centra za medicinsko mikrobiologijo (CMM) Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (NLZOH), na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo (IMI) Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani in v Splošni bolnišnici dr. Franca Derganca v Novi Gorici, tipizirani pa so bili na OJM Ljubljana, NLZOH.

## PRIJAVLJENI PRIMERI OKUŽB S SALMONELAMI, *L. MONOCYTOGENES* IN VEROCITOTOKSIGENIMI *E. COLI*

### Salmoneloze

V letu 2016 je bilo v državah Evropske unije (EU), ki so posredovale podatke v ECDC, potrjenih 94.530 primerov salmoneloz. Za kampilobakteriozami so druga najpogostejše prijavljena zoonoza. Število prijavljenih primerov sicer variira v posameznih državah članicah, tudi v Sloveniji, vendar pa je na splošno v zadnjih letih stanje prijav dokaj stabilno (tabela 1). Trend upadanja primerov pa se kaže od leta 2008–2017. Kaže se sezonska porazdelitev okužb s salmonelami, največ jih je v poletnih mesecih (2, 8). V letu 2016 so bili med petimi najpogostejšimi serotipi, ki so povzročili okužbe pri ljudeh, naslednji: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, monofazna *S. Typhimurium*, *S. Infantis* in *S. Derby*. Podobno kot v prejšnjih letih so tudi leta 2016 *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* in monofazna *S. Typhimurium* predstavljale 70 % potrjenih primerov okužb znanega serotipa. Število okužb s *S. Enteritidis* je leta 2016 nara-

slo glede na leti 2014 in 2015, število okužb s *S. Typhimurium* se je zmanjšalo, število okužb z monofazno *S. Typhimurium* pa je ostalo stabilno. S *S. Enteritidis* so bile pogosto okužene kokoši nesnice, piščanci in piščančje meso, s *S. Typhimurium* pa prašiči in svinjsko meso ter govedo in goveje meso (2). *Salmonelle* so bile leta 2016 najpogostejše povzročiteljice izbruhov v EU zaradi uživanja okužene hrane in vode, kjer je bil povzročitelj ugotovljen. Tako so v državah EU v letu 2016 povzročile 22,3 % vseh izbruhov, med bakterijskimi povzročitelji pa kar 65,8 % izbruhov. Najpogosteje ugotovljen serotip je bil *S. Enteritidis*, delež tega serotipa se je v primerjavi z letom 2015 v državah EU povečal za 23,6 %. Sicer pa je med letoma 2010–2016 opazen trend upadanja števila izbruhov, povzročenih s salmonelami, vendar pa obstajajo razlike med posameznimi državami (3).

## Listerioze

V Sloveniji in Evropi je incidenca okužb z bakterijo *L. monocytogenes* na osnovi prijav nizka, saj so prijavljene predvsem invazivne oblike okužb, torej sepse in vnetja osrednjega živčnega sistema (5). V letu 2016 je 28 držav EU poročalo o 2.536 potrjenih invazivnih primerih listerioz. V Evropi je v zadnjih letih povprečna incidenca okužb na 100.000 prebivalcev razmeroma stabilna. Opazen pa je trend povečevanja števila med letoma 2008–2016, ki se kaže tudi za Slovenijo (tabela 1) (4). Invazivne listerijske okužbe sicer veljajo za redkejšje, vendar je stopnja hospitalizacije in umrljivosti v državah EU najvišja v primerjavi z drugimi zoonozami, ki jih spremlja ECDC. Tako je v letu 2016 umrlo 247 bolnikov (16,2 %), v letu 2015 pa celo 270 (17,7 %). Za okužbo z *L. monocytogenes* so bolj dovzetne imunsko oslABLJENE osebe, otroci, kronični bolniki, nosečnice, plod, novorojenčki in starejše osebe. Delež starejših od 64 let, zlasti pa starejših od 84 let, v državah EU stalno

narašča. Tako se je delež bolnikov, starejših od 64 let, povečal s 52,9 % leta 2008 na 61,9 % leta 2016, delež starejših od 84 let, pa se je povečal s 7,6 % na 10,4 % (4). Med letoma 2008–2016 se v Evropi kaže sezonska porazdelitev primerov okužb, z večjim vrhom v poletnih in precej manjšim v zimskih mesecih (4). Ljudje se okužijo predvsem s kontaminirano hrano, kot so ribe in izdelki iz rib, meso in mesni izdelki, toplotno neobdelani oz. nezadostno obdelani mleko in mlečni izdelki, surova, slabo oprana zelenjava in sadje (5).

## Okužbe z verocitotoksigenimi *E. coli*

DEC so pomembne povzročiteljice drisk, ECDC pa trenutno spremlja le okužbe z VTEC. V letu 2016 so države EU poročale o 6.378 potrjenih primerih okužb z VTEC. V primerjavi z letom 2015 se je incidenca povišala za 8,3 %. Na splošno je bilo število prijavljenih primerov v EU med letoma 2012–2017 stabilno (tabela 1), vendar višje kot pred letom 2011, ko je prišlo do velikega izbruha z *E. coli* O104:H4. Leto 2011 je bilo na nek način prelomno, saj se je diagnostika VTEC zaradi izbruha izboljšala. Naraščajoč trend okužb se kaže med letoma 2008–2016 na Finskem, Madžarskem, Irskem, Nizozemskem, Švedskem, v Franciji, Italiji, Litvi in tudi v Sloveniji. Do okužb prihaja skozi vse leto, vendar pa jih je več v toplejših mesecih leta. V državah, ki so v letu 2016 posredovale podatke o hospitalizaciji, je bilo 34,6 % bolnikov hospitaliziranih, deset jih je umrlo. Do zapleta HUS je prišlo pri 390 bolnikih. Največ teh bolnikov je bilo starih med 0–4 leta (59 %), med 4–14 let je bilo starih 20 % bolnikov. V letu 2016 je bila pri bolnikih s HUS prvič najpogostejša serološka skupina O26 (33,0 %). Sledila ji je O157 (24,8 %), ki je bila do leta 2016 na prvem mestu. Ta ugotovitev je zelo pomembna, saj so v tem letu VTEC O26 tudi najpogosteje osamili iz vzorcev

živil (12). Podobno kot pretekla leta je bila pri bolnikih, okuženih z VTEC, najpogosteje ugotovljena serološka skupina O157 (38,6 % od ugotovljenih seroloških skupin), čeprav se njen delež glede na ostale serološke skupine zmanjšuje v primerjavi s preteklimi leti. Na drugem mestu je bila serološka skupina O26, njen delež pa se je glede na leti 2015 in 2014 povečal. Na tretjem mestu so neugotovljene serološke skupine

O, ki so jim sledile O103, O146, O91, O145 in O128 (12). V letu 2016 sta bila zabeležena dva velika izbruha z VTEC na Finskem in v Veliki Britaniji ter mednarodni izbruh v Romuniji in Italiji z VTEC O26 (12, 13).

Tabela 1 prikazuje število prijavljenih primerov salmoneloz, listerioz in okužb z VTEC na 100.000 prebivalcev med letoma 2010–2017 v Sloveniji, v primerjavi z evropskimi državami, ki so posredovale podatke v ECDC.

**Tabela 1:** Prijavljeni primeri salmoneloz, listerioz in okužb z VTEC v Sloveniji in v državah Evropske unije/Evropskega ekonomskega območja med letoma 2010–2017 (14). VTEC – verocitotoksigena *E. coli*, N – število prijavljenih primerov bolnikov, SI – Slovenija, EU – Evropska unija, EEA – Evropsko ekonomsko območje (angl. *European Economic Area*).

Leto	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Salmonele N/100.000 prebivalcev (SI)	17,73	19,51	19,07	15,35	28,97	19,44	15,07	13,31
Salmonele N/100.000 prebivalcev (EU/EEA)	23,29	22,68	21,94	20,39	20,67	20,99	20,40	19,65
Listerije N/100.000 prebivalcev (SI)	0,54	0,24	0,34	0,78	0,87	0,63	0,73	0,63
Listerije N/100.000 prebivalcev (EU/EEA)	0,36	0,34	0,38	0,40	0,47	0,43	0,47	0,48
VTEC N/100.000 prebivalcev (SI)	0,98	1,22	1,41	0,83	1,41	1,11	1,26	1,60
VTEC N/100.000 prebivalcev (EU/EEA)	1,11	2,94	1,70	1,81	1,77	1,69	1,81	1,75

## SPREMLJANJE LASTNOSTI SALMONEL, LISTERIJ IN VEROCITOTOKSIGENIH *E. COLI* Z MOLEKULARNIMI METODAMI V EVROPI IN PRI NAS

Okužbe ljudi s salmonelami, listerijami in VTEC v Evropi spremlja ECDC v okviru programa FWD (angl. *Food and Waterborne Diseases and Zoonoses*). Odgovoren je tudi za zaznavanje in obravnavo mednarodnih izbruhov ter drugih nenavadnih dogodkov, pri svojem delu sodeluje tudi z drugimi pristojnimi inštitucijami v Evropi in svetu. Države članice, med njimi tudi Slovenija, posredujejo v sistem TESSy (angl. *The European Surveillance System*) določene epidemiološke podatke o bolnikih in laboratorijske

podatke o povzročiteljih bolezni (1). Konec leta 2012 je ECDC ustanovil bazo TESSy MSS (angl. *Molecular Surveillance Service*). Ta je namenjena zbiranju podatkov molekularnih tipizacij salmonel, listerij, *E. coli* (zlasti VTEC) in večkratno odporne *Mycobacterium tuberculosis* (15). Eden od osnovnih pogojev uspešnega delovanja je bil dogovor o lastnostih izolatov, ki se jih bo spremljalo, in izbor nekaterih molekularnih metod za tipizacijo, njihova standardizacija pa je omogočila primerljivost rezultatov med različnimi evropskimi laboratoriji. Kakovost in primerljivost dobljenih podatkov se zagotavlja z uspešnim sodelovanjem laboratorijev držav članic v zunanjih preverjanjih kakovosti (angl. *external quality assesment*,

EQA). V začetku je bila pulzna gelska elektroforeza (angl. *pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE) široko sprejeta metoda tipizacije, tako za spremljanje salmonel, listerij in *E. coli*, kakor tudi za obravnavo izbruhov. Kasneje se je za molekularno tipizacijo *S. Typhimurium* in *S. Enteritidis* začela uporabljati metoda MLVA (angl. *multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis*), ki omogoča boljše razlikovanje med izolati kot PFGE (1). V zadnjem času pa se v svetu vedno bolj uveljavlja metodologija sekvenciranja celotnega genoma oz. sekvenciranja naslednje generacije (angl. *whole genome sequencing/next generation sequencing*, WGS/NGS) (16, 17). ECDC spodbuja njeno uporabo v državah EU z različnimi izobraževanji, organizacijo zunanjih preverjanj kakovosti, v določenih primerih pa tudi s financiranjem izvedbe preiskave WGS. Pomembno vlogo pri iskanju virov in širjenju okužb bo imela skupna baza podatkov molekularnih tipizacij salmonel, listerij in VTEC, ki jo ustanovljata ECDC in EFSA. Vsebovala pa bo podatke o izolatih, osamljenih iz vzorcev živali, krme, živil in iz humanih vzorcev (18).

V nadaljevanju predstavljamo metode, zlasti molekularne, ki jih na OJM Ljubljana uporabljamo za salmonela, listerije in DEC zaradi spremljanja in razjasnjevanja nenavadnih dogodkov v Sloveniji, kakor tudi v povezavi z ECDC.

## Spremljanje salmonel

Pri preiskovanju domačih in mednarodnih izbruhov, povzročenih s salmonelami, se za tipizacijo teh bakterij v Sloveniji že vrsto let uporablja metoda PFGE (19). Slabo zmožnost razlikovanja med izolati smo ugotovili zlasti za serotip *S. Enteritidis*, ki je bil pogost povzročitelj domačih izbruhov s salmonelami (20, 21). Boljše razlikovanje omogoča metoda MLVA, ki jo uporabljamo za tipizacijo serotipov *S. Enteritidis* in *S. Typhimurium* (20, 22, 23).

Tako vsako leto testiramo določeno število izolatov, za letošnje leto pa načrtujemo tipizacijo vseh slovenskih humanih izolatov omenjenih serotipov. Rezultati teh tipizacij omogočajo boljše spremljanje salmoneloz in hitrejše odzivanje na dogajanje doma in v svetu.

Kot zanimivost predstavljamo velik mednarodni izbruh, do katerega je sprva prišlo v 14 evropskih državah, povezan pa je bil z uživanjem okuženih jajc s *S. Enteritidis* iz Poljske. Od 1. 5. 2016 do 24. 2. 2017 je bilo odkritih 218 potrjenih primerov. Največ ljudi je zbolelo konec septembra 2016, kmalu za tem pa je bil odkrit vir okužbe. Pri izolatih iz izbruha sta bila ugotovljena profila MLVA 2-9-7-3-2 in 2-9-6-3-2. Na podlagi preiskav WGS sta bila pri izolatih ugotovljena dva različna, vendar genetsko sorodna skupka. Po uvedbi ustreznih ukrepov na farmah kokoši nesnic in v distribucijski mreži se je število okuženih bolnikov začelo hitro zmanjševati. Hrvaška in Madžarska sta poročali tudi o smrtnih primerih (24). Da bi ugotovili morebitno vključenost Slovenije v ta izbruh, smo jeseni leta 2016 zbrali 29 izolatov *S. Enteritidis*, ki so jih medicinski laboratoriji CMM, NLZOH in IMI osamili istega leta iz iztrebkov bolnikov. S tipizacijo PFGE smo ugotovili pet različnih profilov, kar 22 izolatov pa je imelo enak profil PFGE. S tipizacijo MLVA smo ugotovili 13 različnih profilov MLVA (Trkov in sod., neobjavljeni podatki). Trije izolati so imeli profil 2-9-7-3-2, ki je ustrezal profilu MLVA *S. Enteritidis* iz izbruha. S preiskavo WGS je bilo ugotovljeno, da sta dva izolata sodila v prvi WGS skupek, en pa v drugega (24). V letu 2017 so se ponovno začeli pojavljati novi primeri okužb, število je najbolj naraslo maja in septembra (25). Metoda MLVA se je izkazala kot dobra presejalna metoda za izbor izolatov *S. Enteritidis* za nadaljnja testiranja z WGS.

## Spremljanje listerij

V Sloveniji poteka sistematično zbiranje

humanih izolatov *L. monocytogenes* od leta 2010. Tako smo do konca leta 2017 zbrali 94 izolatov. Vsem smo določili serotip in molekularno serološko skupino, tipizacija s PFGE z dvema restriksijskima encimoma pa nam je omogočala nadaljnje razlikovanje oz. ugotavljanje sorodnosti med izolati (26). Rezultate teh preiskav posredujemo skupaj z določenimi epidemiološkimi podatki v bazo molekularnih podatkov ECDC TESSy MSS. V Sloveniji je bilo največ invazivnih listerijskih okužb sporadičnih, zaznali pa smo tudi določene povezane primere. Tako je prišlo v poletnih mesecih leta 2013 do kopičenja primerov v novomeški regiji, kjer so zaradi okužbe z *L. monocytogenes* zboleli kar trije bolniki. Vsi trije izolati listerij so pripadali istemu serotipu in molekularni serološki skupini. Izolata dveh bolnikov sta imela enak profil PFGE, izolat enega bolnika pa se je razlikoval. Kljub obsežni epidemiološko mikrobiološki preiskavi vir okužbe ni bil potrjen (27). V juliju 2017 sta bila potrjena dva primera listerioze pri zakonskem paru, ki se je najverjetneje okužil z uživanjem tatarskega bifteka. Izolati *L. monocytogenes*, osamljeni iz različnih kužnin obeh bolnikov, so pripadali serotipu 1/2a in molekularni serološki skupini IIa ter imeli enak profil PFGE (28). Zaradi naraščajočega trenda potencialno nevarnih invazivnih listerijskih okužb v Evropi ECDC spodbuja tipizacijo izolatov z WGS. Tako je bilo v sklopu študije ECDC ELiTE (angl. *European Listeria Typing Exercise*) tipiziranih preko 2.700 izolatov *L. monocytogenes* iz 27 držav EU/EEA, ki so bili osamljeni iz humanih vzorcev med letoma 2010–2015. Preiskavo WGS so izvedle posamezne države same ali pa v okviru ECDC. Vključenih je bilo tudi 68 slovenskih izolatov, ECDC pa nam je nadalje omogočil preiskavo WGS tudi za izolate, ki so bili osamljeni do konca leta 2017 (10). Na ta način spodbuja evropske države k celovitemu, z WGS podprtem spremlja-

nju listerioz. Pridobljeni rezultati preiskav omogočajo primerjavo med humanimi evropskimi izolati, hkrati pa tudi z izolati iz živil, krme, živali in okolja, ter tako omogočajo iskanje virov in širjenja okužb.

## **Spremljanje *E. coli*, ki povzročajo črevesne okužbe**

Uporaba molekularnih metod, zlasti verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR), je nujna že za odkrivanje DEC, za spremljanje lastnosti izolatov pa se uporablja še druge metode (6, 29, 30). Na OJM Ljubljana že vrsto let testiramo določeno število vzorcev na prisotnost VTEC, EPEC, A/EEC (angl. *attaching and effacing E. coli*), ETEC, EIEC in EAEC. Tabela 2 prikazuje število odkritih primerov posameznih patogenih tipov DEC ter okvirno število preiskanih vzorcev pri bolnikih z drisko med letoma 2013–2017 (Trkov in sod., neobjavljeni podatki). Vendar teh podatkov ne moremo šteti kot podatke o dejanskem številu okuženih z DEC, saj so sodelujoči medicinski laboratoriji NLZOH in IMI, ki so posredovali vzorce, le-te že sami presejalno testirali z molekularnimi in fenotipskimi metodami ali pa jih izbrali na kakšen drugačen način (npr. starost bolnikov, klinično sliko bolezni, potovanja). Vzorca, pri katerih je bila ugotovljena prisotnost gena za intimin (*eae*), vendar brez genov za verocitotoksine, so prikazani skupaj. Gre za EPEC in A/EEC, ki so prevladovale v vseh letih preiskovanega obdobja. Opazen je trend povečevanja števila bolnikov, okuženih z VTEC. Večinoma so bile na tretjem mestu ugotovljene okužbe z EAEC, vendar moramo poudariti, da je bila preiskava za odkrivanje le-teh izvedena zgolj na vzorcih, kjer drugi patogeni tipi DEC niso bili ugotovljeni. Primeri ETEC so bili pogosto povezani s potovanji bolnikov v dežele s slabšimi higienskimi razmerami. Okužbe z EIEC pa so bile zelo redke. Pri izolatih VTEC se nadalje določa prisot-

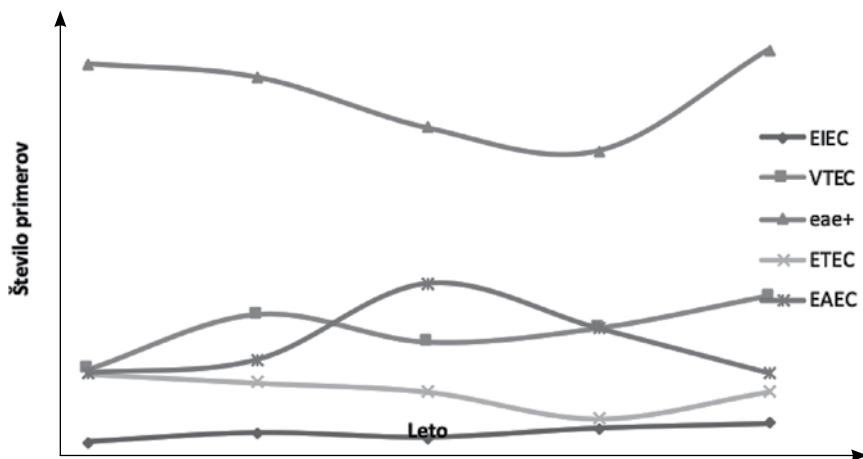


tnost gena za enterohemolizin, preverja se prisotnost nekaterih genov, značilnih za EAEC, določa se podtipe genov za verocitotoksine *vtx1* (1a, 1c, 1d) in *vtx2* (2a-2g) (31) in se jih tipizira s PFGE z restrikcijskim encimom *XbaI* (19). Ta metoda še vedno omogoča dobro razlikovanje med izolati *E. coli*, saj smo za izolate VTEC ugotovili zelo raznolike profile PFGE celo znotraj istih sero-

loških skupin O (Trkov in sod., neobjavljeni podatki). Za tipizacijo patogenih *E. coli* se široko uporablja tudi serotipizacija, ki je draga in zamudna. Zaradi velike raznolikosti lastnosti sevov *E. coli*, ki povzročajo črevesne okužbe in posledično številnih različnih metod, ki se uporabljajo za njihovo preiskovanje, obeta metodologija WGS možnost za nadomestilo teh metod (16).

**Tabela 2:** Število preiskanih vzorcev na OJM Ljubljana na DEC in število potrjenih primerov med letoma 2013–2017. OJM – oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo, DEC – *E. coli*, ki povzročajo črevesne okužbe (angl. *diarrheagenic Escherichia coli*), EPEC – enteropatogena *E. coli*, A/EEC – angl. *attaching and effacing E. coli*, ETEC – enterotoksigena *E. coli*, EIEC – enteroinvazivna *E. coli*, EAEC – enteroagregativna *E. coli*, *eae+* – intimin pozitivni vzorci.

Patotip/Leto	2013	2014	2015	2016	2017
EPEC in A/EEC ( <i>eae+</i> )	84	81	70	65	87
VTEC	17	29	23	26	33
ETEC	16	14	12	6	12
EIEC	1	3	2	4	5
EAEC	16	19	36	26	16
Število preiskanih vzorcev	426	740	693	757	740



**Slika 1:** Število bolnikov, okuženih s posameznimi patotipi DEC med letoma 2013–2017. Primeri z ugotovljenim genom *eae* in brez genov *vtx* so prikazani skupaj. DEC – *Escherichia coli*, ki povzročajo črevesne okužbe (angl. *diarrheagenic Escherichia coli*), EPEC – enteropatogena *E. coli*, A/EEC – angl. *attaching and effacing E. coli*, ETEC – enterotoksigena *E. coli*, EIEC – enteroinvazivna *E. coli*, EAEC – enteroagregativna *E. coli*, *eae+* – intimin pozitivni vzorci.

## ZAKLJUČEK

Spremljanje salmoneloz, listerioz in okužb z DEC ter raziskovanje izbruhov, zlasti velikih mednarodnih, je povezano s številnimi izzivi. Ti so po eni strani povezani s sodobnim načinom pridelave in predelave hrane ter kompleksnostjo oskrbovalnih verig zaradi globalizacije, po drugi pa z raznolikostjo uporabljenih laboratorijskih metod, ki ovirajo učinkovito komunikacijo pri prepoznavanju povzročiteljev. Uporaba mednarodno dogovorjenih, standardiziranih metod tipizacije omogoča primerljivost podatkov med državami, kot tudi med zdravstvenimi, živilskimi in veterinarskimi inštitucijami znotraj držav. Zaradi izjemne informativnosti in moči razlikovanja med posameznimi povzro-

čitelji nalezljivih bolezni v prihodnje veliko obeta tehnologija WGS/NGS. Dodatno pomoč pri spremljanju in preiskovanju izbruhov omogoča vzpostavitev skupnih baz molekularnih podatkov za salmonele, listerije in VTEC, ki so osamljene iz humanih in drugih vzorcev.

## ZAHVALA

Avtorice se zahvaljujemo Slavici Lorenčič Robnik, Živi Petrovič, Marici Lugovsky, Tatjani Harlander, Tanji Stojoski Šurbanovski, Andreju Rojniku in Iztoku Štrumblju iz Oddelkov za medicinsko mikrobiologijo Maribor, Celje, Novo mesto, Koper, Murska Sobota CMM, NLZOH za posredovanje izolatov in epidemioloških podatkov.

## LITERATURA

1. Schjørring S, Niskanen T, Torpdahl M, et al. Evaluation of molecular typing of foodborne pathogens in European reference laboratories from 2012 to 2013. *Euro Surveill.* 2016; 21 (50): 1–8.
2. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Salmonella. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal.* 2017; 15 (12): 21–56.
3. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Food-borne outbreaks. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal.* 2017; 15 (12): 189–217.
4. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Listeria. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal.* 2017; 15 (12): 56–78.
5. Trkov M, Müller-Premru M, Božanič V, et al. Invazivne listerijske okužbe - starostniki kot ranljiva skupina. In: Petrovec M, ed. Okužbe pri starostnikih. *Med Razgl.* 2017; 56 (Suppl 3): 219–28.
6. Trkov M, Žohar Čretnik T, Pirš M, et al. Problematika odkrivanja bakterij *Escherichia coli*, ki povzročajo črevesne okužbe. In: Petrovec M, ed. Okužbe prebavil. *Med Razgl.* 2015; 54 (Suppl 2): 73–81.
7. Grimont PAD, Weill FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th ed. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur; 2007.
8. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal.* 2016; 14 (12): 35–114.
9. Nacionalni inštitut za javno zdravje: Salmoneloza (okužbe s salmonelami) [internet]. NIJZ; 2015 [citirano 2018 Aug 8]. Dosegljivo na: <http://www.nijz.si/sl/salmoneloza-okuzbe-s-salmonelami>
10. van Walle I, Björkman JT, Cormican M, et al. Retrospective validation of whole genome sequencing - enhanced surveillance of listeriosis in Europe, 2010 to 2015. *Euro Surveill.* 2018; 23 (33): 1–11.
11. Cointe A, Birgy A, Liguori S, et al. Characterization of an emerging hybrid O80 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) combining multiresistance and extra-intestinal virulence. 10th International symposium on Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections; VTEC 2018; Florence; 2018. p. 67.

12. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*. 2017; 15 (12): 78–100.
13. Usein CR, Ciontea AS, Militaru CM, et al. Molecular characterisation of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains: results of an outbreak investigation, Romania, February to August 2016. *Euro Surveill*. 2017; 22 (47): 1–8.
14. Surveillance atlas of infectious diseases [internet]. ECDC; 2017 [citirano 2018 Sep 18]. Dosegljivo na: <https://ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>
15. van Walle I. ECDC starts pilot phase for collection of molecular typing data. *Euro Surveill*. 2013; 18 (3).
16. Joensen KG, Tetzschner AM, Iguchi A, et al. Rapid and easy *in silico* serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. *J Clin Microbiol*. 2015; 53 (8): 2410–26.
17. Jensen AK, Björkman JT, Ethelberg S, et al. Molecular typing and epidemiology of human listeriosis cases, Denmark, 2002–2012. *Emerg Infect Dis*. 2016; 22 (4): 625–33.
18. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Report of the third joint meeting of the ECDC's food- and waterborne diseases and zoonoses network and of the EFSA's zoonoses monitoring data network. One health approach to collaborative response to foodborne disease outbreaks in EU/EEA [internet]. EFSA and ECDC; 2018 [citirano 2018 Nov 11]. Dosegljivo na: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2018.EN-1487>
19. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis*. 2006; 3 (1): 59–67.
20. Trkov M, Štorman A, Žohar Čretnik T, et al. Molekularna tipizacija salmonel pri obravnavi izbruhov. In: Kraigher A, Berger T, Nikolič S, eds. Javno zdravje – povezovanje za zdravje. Ljubljana: Sekcija za preventivno medicino Slovenskega zdravniškega društva; 2016. p. 81–2.
21. Grilc E, Praprotnik M, Trkov M. Črevesne nalezljive bolezni in zoonoze. In: Kraigher A, Sočan M, Klavs I, et al, eds. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2014. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje; 2015. p. 63–6.
22. European Centre for Disease Prevention and Control. Laboratory standard operating procedure for multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. Stockholm: ECDC; 2016. p. 1–9.
23. European centre for disease prevention and control. Laboratory standard operating procedure for MLVA of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. Stockholm: ECDC; 2011. p. 1–11.
24. European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority. Multi-country outbreak of *Salmonella* Enteritidis phage type 8, MLVA type 2-9-7-3-2 and 2-9-6-3-2 infections [internet]. ECDC and EFSA; 2017 [citirano 2018 Jul 1]. Dosegljivo na: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1188>
25. European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority. Multi-country outbreak of *Salmonella* Enteritidis infections linked to Polish eggs [internet]. ECDC and EFSA; 2017 [citirano 2018 Avg 17]. Dosegljivo na: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1353>
26. One-day (24–28 h) standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Listeria monocytogenes* by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) [internet]. PulseNet USA, CDC; 2009 [citirano 2017 May 8]. Dosegljivo na: [http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/5.3\\_2009\\_PNetStandProtLMonocytogenes.pdf](http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/5.3_2009_PNetStandProtLMonocytogenes.pdf)
27. Košir M, Trkov M, Zdovc I. Epidemiološka in mikrobiološka preiskava listerijskih okužb v zdravstveni regiji Novo mesto v letu 2013. *e-NBOZ*. 2014; 7: 7–19.
28. Trop Skaza A, Grilc E. Listerioza. *e-NBOZ*. 2017; 5: 27.
29. Persson S, Olsen KE, Scheutz F, et al. A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic *Escherichia coli* in the routine diagnostic laboratory. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13 (5): 516–24.
30. Cerna JF, Nataro JP, Estrada-Garcia T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol*. 2003; 41 (5): 2138–214.
31. Scheutz F, Teel LD, Beutin L, et al. Multicenter evaluation of sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol*. 2012; 50 (9): 2951–63.

Nataša Berginc<sup>1</sup>, Katarina Prošenc Trilar<sup>2</sup>

# Pomen molekularne epidemiologije pri spremljanju gripe

## *Use of Molecular Epidemiology in Surveillance of Influenza*

### IZVLEČEK

---

KLJUČNE BESEDE: gripa, molekularna biologija, epidemiologija, spremljanje bolezni

Mednarodna mreža za spremljanje gripe v okviru Svetovne zdravstvene organizacije izvaja virološko in epidemiološko spremljanje gripe za hitro zaznavanje in proučevanje sprememb virusov gripe, za pridobivanje informacije za vsakoletni izbor cepiva proti gripi ter zbira viruse za vsakoletno proizvodnjo cepiva proti gripi. Molekularna epidemiologija uporablja molekularne tehnike za raziskovanje vprašanj, ki jih proučuje epidemiologija. Uporaba molekularne epidemiologije pri spremljanju virusov gripe je omogočila sprotno molekularno spremljanje profilov kroženja virusov gripe in hitro zaznavanje genskih sprememb, ki se odražajo v fenotipskih in antigenskih lastnostih virusov gripe. To pa je močno izboljšalo učinkovitost javnozdravstvenih ukrepov za obvladovanje bremena vsakoletnih epidemij gripe in za hitro odzivanje v primeru pojava ali širjenja spremenjenih ali novih sevov in podtipov virusov gripe, kar smo v prispevku ilustrirali s primeri.

### ABSTRACT

---

KEY WORDS: influenza, molecular biology, epidemiology, disease surveillance

The World Health Organization Global Influenza Surveillance and Response System performs virological and epidemiological surveillance of influenza for detecting and studying changes in influenza viruses, collecting information relevant for annual influenza vaccine selection and collecting viruses for annual vaccine production. Molecular epidemiology employs molecular techniques for exploring issues in epidemiological studies. The use of molecular epidemiology in influenza surveillance facilitated real-time monitoring of circulation patterns of influenza viruses and early detection of genetic changes reflected in phenotypic and antigenic characteristics of influenza viruses. This greatly improved public health management of seasonal influenza epidemics and rapid response in case of emergence or spread of changed or new influenza strains and subtypes, illustrated with some examples in the paper.

---

<sup>1</sup> Nataša Berginc, univ. dipl. mikr., Laboratorij za javnozdravstveno virologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Bohoričeva ulica 15, 1000 Ljubljana; [natasa.berginc@nlzoh.si](mailto:natasa.berginc@nlzoh.si)

<sup>2</sup> Mag. Katarina Prošenc Trilar, univ. dipl. biol., Laboratorij za javnozdravstveno virologijo, Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Bohoričeva ulica 15, 1000 Ljubljana

## UVOD

Za virus gripe je značilno, da je ubikvitaren, se hitro širi in se neprestano spreminja, kar se odraža v spremembah njegovih antigenskih lastnosti in posledično v njegovi izraziti sposobnosti izmikanja imunskemu odgovoru okuženih posameznikov (1–3). Gripa v svetovnem merilu predstavlja veliko javnozdravstveno breme, saj po ocenah Svetovne zdravstvene organizacije (angl. *World Health Organization*, WHO) vsako leto za gripo zboli milijarda ljudi, pri 3–5 milijonih ima gripa težji potek z možnimi zapleti. Od 290.000 do 650.000 jih zaradi gripe umre, gripa je pomemben vzrok odsotnosti z dela in predstavlja veliko obremenitev zdravstvenega sistema (2, 4). Prvo cepivo proti gripi so uporabili leta 1942 in kmalu ugotovili, da je za dobro učinkovitost cepiva bistveno, da izbor virusnih komponent cepiva upošteva antigenske spremembe, ki se pojavljajo v krožečih virusih gripe (4). Za začetek organiziranega spremljanja gripe štejemo ustanovitev globalnega programa za gripo (angl. *Global Influenza Programme*, GIP) leta 1947, leta 1952 pa je bila nato v okviru WHO ustanovljena globalna mreža za spremljanje gripe (angl. *Global Influenza Surveillance Network*, GISN oz. od leta 2011 *Global Influenza Surveillance and Response System*, GISRS) s tremi pogloblitimi nalogami: spremljati antigenske spremembe virusov gripe, pridobiti informacije za vsakoletni izbor cepiva proti gripi in zbirati viruse za vsakoletno proizvodnjo cepiva proti gripi (1, 5). Čeprav ostaja osnovni namen globalnega spremljanja gripe ves čas nespremenjen, se je skozi čas bistveno spremenil način delovanja (lat. *modus operandi*), ki ga je omogočil razvoj znanosti in tehnologije v raziskovanju in diagnostiki virusov gripe (4). Molekularna epidemiologija omogoča boljše razumevanje in obvladovanje nalezljivih boleznin in se je uveljavila tudi v proučevanju in spremljanju virusov gripe (5, 6).

## MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA

Epidemiologija nalezljivih boleznin proučuje dejavnike, ki vplivajo na pojavljanje in širjenje nalezljivih boleznin v času in prostoru, ter dejavnike, ki določajo prenos in razvoj boleznin pri posamezniku in v populaciji (7). Poglavitni namen pridobivanja te vrste znanja je razvoj in uvedba ustreznih javnozdravstvenih ukrepov za zmanjšanje javnozdravstvenega bremena nalezljivih boleznin (6).

Pri molekularni epidemiologiji gre za integracijo molekularnih tehnik, ki temeljijo predvsem na analizi zaporedja nukleinskih kislin (NK) ali aminokislin (AK) povzročiteljev nalezljivih boleznin, na področja, ki jih proučuje epidemiologija (6). Čeprav v splošnem velja, da je izraz molekularna epidemiologija leta 1979 prvič uporabil Lower, je izraz že pred njim leta 1973 uporabil Kilbourne v objavi, ki je opisovala globalno distribucijo podtipov virusov gripe (8, 9). Opozoriti je treba na pogosto površno rabo izraza molekularna epidemiologija, saj le-ta ni zgolj molekularna taksonomija, filogenija ali populacijska genetika, temveč gre za aplikacijo molekularnih tehnik pri proučevanju epidemioloških vprašanj (7). Molekularna epidemiologija proučuje povzročitelje in patogenezo nalezljivih boleznin, ugotavlja naravne rezervoarje in vzorce kroženja povzročiteljev nalezljivih boleznin v populaciji in v okolju ter načine in pogoje prenosa povzročiteljev nalezljivih boleznin v populaciji in v okolju (6).

## MEDNARODNA MREŽA ZA SPREMLJANJE GRIPE

Mednarodno mrežo za spremljanje gripe v okviru WHO trenutno sestavlja 144 nacionalnih centrov za gripo, ki delujejo v skladu s pravili in standardi, ki jih določa WHO (angl. *WHO Terms of Reference for National Influenza Centres*, *WHO Global Epidemiological Surveillance Standards for Influenza*) (4,

5, 10). Poleg Nacionalnih centrov za gripo je v mrežo vključenih še šest kolaborativnih centrov, štiri esencialni regulativni laboratoriji in 13 referenčnih laboratorijev za gripo H5 (1). Namen virološkega in epidemiološkega spremljanja gripe v okviru WHO ostaja zmanjšanje bremena bolezni, z zagotavljanjem čim bolj zgodnje in kakovostne informacije za uvedbo ustreznih javnozdravstvenih ukrepov ter zagotavljanje virusov za vsakoletno proizvodnjo cepiva proti gripi (5). Glavne naloge mreže so (5):

- zaznati začetek in konec sezone gripe na določenem geografskem območju,
- sproti identificirati tipe in podtipe krožečih virusov gripe ter jih primerjati s tistimi, ki krožijo na drugih geografskih območjih,
- identificirati in preučevati antigenske in genske značilnosti krožečih tipov in podtipov virusov gripe ter povezavo njihovih značilnosti z aktualnim cepivom in/ali značilnostmi/težavnostjo obolenj,
- sproti ugotavljati občutljivost krožečih virusov gripe na protivirusna zdravila,
- zagotoviti viruse oz. virusne izolate za proizvodnjo cepiva proti gripi,
- identificirati in spremljati skupine z večjim tveganjem za razvoj težjega obolenja (starostniki, nosečnice, otroci mlajši od 5 let, ljudje s kroničnimi boleznimi ali imunskimi pomanjkljivostmi) in
- sprotno obveščanje strokovne javnosti za ustrezno javnozdravstveno obvladovanje situacije povezane z gripo na svetovni, regionalni in nacionalni ravni.

Mednarodna mreža za spremljanje gripe v okviru WHO predstavlja prvi, najbolj razvit in vzorčni model globalnega sodelovanja različnih strok za zagotavljanje informacij, virusov in specifičnih reagentov za obvladovanje nalezljivih bolezni javnozdravstvenega pomena (4).

## MOLEKULARNE ZNAČILNOSTI VIRUSOV GRIPE

Viruse gripe iz virusne družine *Orthomyxoviridae* delimo v štiri rodove, A–D. Virusi gripe imajo značilen segmentiran genom iz negativno orientirane enovijačne RNA, ki nosi zapis za vsaj deset strukturnih in nestrukturnih beljakovin – gripa A in B imata po osem, gripa C in D pa po sedem segmentov. Virusno sredico predstavlja virusni ribonukleinski kompleks, ki ga sestavlja segmentirani genom RNA, vezan na strukturne beljakovine (nukleoprotein (NP), polimerazni bazični protein 1 in 2 (PB1, PB2) in polimerazni kisli protein (angl. *polymerase acidic protein*, PA)). Virusno sredico obdaja kompleksna virusna ovojnica. Virusno sredico neposredno obdaja matrična beljakovina 1 (M1), na katero je vezan jedrni eksportni sistem iz nestrukturnih beljakovin 1 in 2 (NS1, NS2). Matrična beljakovina 2 (M2) pa ima v ovojnici vlogo ionskega kanalčka. Virusno ovojnico prehajata še strukturni beljakovini hemaglutinin (HA) in nevraminidaza (NA), ki sta izpostavljeni na zunanji površini virusne ovojnice, igrata pomembno vlogo pri virusnem razmnoževanju in širjenju ter določata antigenske lastnosti virusa gripe (11).

Viruse gripe A, glede na prisotnost HA in NA na površini, delimo v številne podtipe (poznamo 18 podtipov HA in 11 podtipov NA), ki okužujejo ptice in sesalce, vodne ptice pa so njihov naravni rezervoar, razen za podtipe H17 in H18, ki jih najdemo pri netopirjih (influenca podobni netopirski virusi H17N10 in H18N11) (11). Med ljudmi krožijo podtipi H1N1 in H3N2 (ter H2N2 med 1957 in 1968), ki povzročajo vsakoletne epidemije in občasne pandemije. Človek se lahko okuži tudi z drugimi podtipi (npr. H5, H6, H7, H9, H10), če pride do neposrednega prenosa teh virusov s ptic na sesalce/ljudi ali pa preko vmesnega gostitelja, npr. prašiča, ki ga uspešno okužujejo tako ptičji kot člo-

veški podtipi virusov gripe (1, 11). Virusi gripe B okužujejo samo ljudi in tvorijo relativno homogeno skupino virusov, ki se je v 70. in 80. letih preteklega stoletja razvila v dve liniji, Yamagata in Victoria. Linija Yamagata se je v 80. in 90. letih preteklega stoletja razširila po vsem svetu, linija Victoria pa je ostala omejena na Azijo vse do leta 2002, ko se je razširila tudi na druga geografska območja (12, 13). Okužbe ljudi z gripo C so redke in povzročajo blažja obolenja, okužbe z gripo D pa pri ljudeh še nismo zaznali (11).

Evolucija virusov gripe poteka s pomočjo dveh mehanizmov, z antigenskim zdrsom (angl. *drift*) in z antigenskim premikom (angl. *shift*), ki se oba zgodita na molekularni ravni in se lahko izrazita na fenotipski in antigenski ravni. Pri antigenskem zdrsu gre za relativno konstantno kopičenje točkovnih mutacij zaradi odsotnosti popravljalnih mehanizmov pri sintezi virusne RNA in se na molekularni ravni odraža v spremembah zaporedja AK (11). Nastajajo novi sevi virusov gripe, ki lahko pridobijo sposobnost izmakniti se imunskemu odgovoru okuženih in povzročajo vsakoletne izbruhe in epidemije gripe (3, 11, 14). Antigenski premik pa je posledica preazporejanja/izmenjave (angl. *reassortment*) segmentov genoma med dvema različnima podtipoma virusov gripe, ki istočasno okužita istega posameznika (11). Nastajajo novi podtipi virusov gripe (11, 14). Antigenski premik so do sedaj opazili samo znotraj istega rodu gripe (A, B, C). Spremembe virusa gripe zaradi antigenškega premika imajo lahko pandemski potencial (11).

## MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA PRI SPREMLJANJU VIRUSOV GRIPE

Virološko spremljanje pomeni kontinuirano in sistematično zbiranje in analizo virusov z namenom preučevanja in spremljanja njihovih značilnosti. Skupaj z epidemiološkim spremljanjem je enakovred-

ni sestavni del sistemov za spremljanje nalezljivih bolezni (14). Nacionalni center za gripo v okviru WHO lahko suvereno opravlja svojo nalogo virološkega spremljanja virusov gripe le takrat, ko izvaja tako metode virusne izolacije, antigenske karakterizacije virusnih izolatov in fenotipsko testiranje odpornosti proti protivirusnim zdravilom, kot tudi metode molekularne identifikacije in karakterizacije. Le na ta način lahko prispeva viruse za proizvodnjo cepiva proti gripi ter ustrezno informacijo o kroženju virusov gripe in njihovih lastnostih (5, 10, 14). Priporočene metode je WHO objavila v Priročniku za laboratorijsko diagnostiko in virološko spremljanje gripe. Metode sproti dopolnjuje (14).

Molekularne tehnike so močno izboljšale možnosti za analizo in karakterizacijo virusov gripe, s tem pa razumevanje njihove evolucije, patogeneze in epidemiologije (1). Molekularne metode, ki se uporabljajo pri virološkem spremljanju gripe, so predvsem metode amplifikacije in detekcije RNA (najpogosteje verižna reakcija s polimerazo z reverznim prepisom v realnem času (angl. *real-time reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-RT-PCR)) in metode določanja nukleotidnega zaporedja virusne RNA (najpogosteje sekveniranje po Sangerju, v zadnjem obdobju vedno bolj tudi metode sekveniranja nove generacije) (5, 14).

Uporaba RT-RT-PCR omogoča (5, 14):

- detekcijo in identifikacijo tipa virusa gripe v vzorcu bolnika ali v celični kulturi,
- določitev podtipa gripe A in linije gripe B,
- detekcijo in identifikacijo neobičajnih/novih tipov in podtipov virusov gripe v vzorcu bolnika ali v celični kulturi (H5, H7, H9 idr.) in
- specifično detekcijo odpornosti na protivirusna zdravila.

Nacionalni centri za gripo so dolžni informacijo o krožečih tipih, podtipih in linijah virusov gripe ter o njihovih posebnostih (npr. pojavu odpornosti na protivirusna zdravila) v realnem času oz. na tedenski ravni poročati WHO, ki podatke redno obdeluje in objavlja (5). S tem je omogočeno sprotno molekularno spremljanje profilov kroženja virusov gripe, kar je močno izboljšalo možnosti za sprejem učinkovitih javnozdravstvenih ukrepov za sprotno obvladovanje bremena vsakoletnih epidemij gripe (1, 5).

Informacija o nukleotidnem zaporedju virusne RNA služi za identifikacijo in preučevanje specifičnih mutacij s potencialnim biološkim pomenom, kot so razvoj odpornosti na protivirusna zdravila, spremembe antigenskih lastnosti in patogenosti virusa ter za študij evolucije virusa (14). Mreža za spremljanje gripe je že v poznih 80. letih preteklega stoletja v procesu vsakoletnega izbora cepiva proti gripi, poleg informacije o antigenskih lastnostih krožečih virusov, enakovredno upoštevala tudi informacijo o nukleotidnem zaporedju gena za HA, kar je danes običajna praksa (1). Leta 2008 je bila ustanovljena baza GISAIID (angl. *Global Initiative on Sharing All Influenza Data*), ki je postala integralni del globalnega sistema zbiranja in izmenjave podatkov o virusih gripe (klinični, epidemiološki in virološki podatki ter nukleotidno zaporedje vsaj gena za HA) (4, 15).

Razumevanje profilov pojavljanja in kroženja novih sezonskih sevov virusov gripe je ključno znanstveno in javnozdravstveno vprašanje, saj pogojuje vsakoletne izbruhe epidemije gripe ter se odraža pri učinkovitosti cepiva proti gripi. V študiji, ki je vključevala primerjavo kliničnih in epidemioloških podatkov z analizo nukleotidnega zaporedja približno 10.000 genov za HA sezonskih virusov gripe, ki so globalno krožili med leti 2000 in 2012, so ugotovili, da so značilnosti kroženja gripe A (H3N2) bistveno drugačne od značilnosti krože-

nja gripe A (H1N1) in gripe B (linija Victoria in Yamagata). Za seve gripe A (H3N2) je bilo značilno, da se na določenem geografskem območju niso obdržali skozi več sezonskih epidemij, ampak so jih sproti nadomeščali novi sevi gripe A (H3N2), ki so običajno izvirali iz J in JV Azije. Nasprotno so se sevi gripe A (H1N1) in gripe B izkazali za gensko bolj stabilne in so na določenem geografskem območju vztrajali skozi več sezonskih epidemij, kar se je odražalo v nižjih stopnjah antigenske evolucije teh virusov, v nižji povprečni starosti okuženih, v redkejših in blažjih sezonskih epidemijah (16). Ta raziskava je tudi potrdila, da je antigenski zdrs osnovni genski mehanizem in virološka osnova za razvoj novih sevov s spremenjenimi antigenskimi lastnostmi, ki povzročajo vsakoletne epidemije gripe in zahtevajo nenehno posodabljanje komponent v cepivu proti gripi (3, 16).

Primerjava nukleotidnih zaporedij virusov gripe B je omogočila tudi dokončno potrditev diferenciacije virusov gripe B v dve ločeni liniji. Obe liniji sta v populaciji z veliko verjetnostjo krožili že v poznih 70. in zgodnjih 80. letih preteklega stoletja (1). V sezoni gripe 1988–1989 sta krožila dva očitno različna virusa gripe B, ki sta izkazovala različne antigenske lastnosti v postopku antigenske karakterizacije s testom inhibicije hemaglutinacije. Šele takrat so lahko s primerjavo nukleotidnih zaporedij identificirali dve genski liniji gripe B, Victoria in Yamagata (1, 17). Informacija o razliki v nukleotidnih zaporedjih virusov dveh različnih linij gripe B je omogočila razvoj specifičnih molekularnih metod (npr. RT-RT-PCR) za njuno identifikacijo, diferenciacijo in posledično spremljanje v realnem času (14). Študije so potrdile tudi, da okužba posameznika z eno linijo gripe B ne zagotavlja navzkrižne zaščite proti drugi liniji gripe B (18, 19). Vsa ta dognanja so utemeljila razvoj in uvedbo štirivalentnega cepiva proti gripi, ki vključuje po enega predstavnika viru-



sov gripe A, (H1N1) pdm09 in (H3N2) ter po enega iz vsake linije gripe B, Victoria in Yamagata, in ki nadomešča uporabo trivalentnega cepiva (3).

Za zdravljenje gripe so na voljo tri vrste protivirusnih zdravil (14, 20):

- derivati adamantanov (amantadin, rimantadin; učinkovita samo proti virusom gripe A, pri katerih pa se je razvila visoka stopnja odpornosti),
- zaviralci polimeraze (favipiravir, redkeje uporabljen) in
- zaviralci NA (oseltamivir, zanamivir, peramivir; učinkoviti proti virusom gripe A in B; v večinski uporabi).

V začetku januarja 2008 so v norveškem Nacionalnem centru za gripo ugotovili povečan delež virusov gripe A (H1N1) odpornih proti oseltamiviru. Do enake ugotovitve so pri norveških virusih istočasno prišli tudi v kolaborativnem centru v Londonu, kamor so z Norveške poslali prve sezonske viruse gripe za analizo pred izborom sevov za cepivo proti gripi za prihodnjo sezono, ki poteka vsako leto februarja. Analiza nukleotidnega zaporedja za NA je dokazala mutacijo histidina v tirozin na mestu 275 v N1 oz. 274 v N2 (mutacija H274Y v genu za NA prinaša visoko stopnjo odpornosti na oseltamivir, virusi pa ostanejo občutljivi na zanamivir). Sledilo je hitro obveščanje globalne strokovne javnosti, pospešena molekularna analiza krožečih virusov gripe A (H1N1) in razvoj specifičnih molekularnih metod za hitro detekcijo virusov s to specifično mutacijo. Do konca januarja 2008 so bili na oseltamivir odporni virusi gripe A (H1N1) dokazani v večini evropskih držav, delež odpornih virusov pa je znašal do 67 % (21). Zaradi zgodnjega odkritja in obveščanja o pojavu odpornosti je bilo še isto sezono gripe mogoče sprejeti ustrezne javnozdravstvene ukrepe (uporaba ustreznih protivirusnih zdravil, ki je izrednega pomena pri bolnikih s težjim potekom ali iz ogro-

ženih skupin) (1, 4, 21). Študija pojava mutacije H274Y in odpornosti na oseltamivir pri gripi A (H1N1) na Japonskem pa je, denimo, pokazala, da se je na njihovem območju odporni sev razširil šele v naslednji sezoni gripe, saj je bilo med virusi iz sezone 2007–2008 odpornih le 0,4 % sevov, v sezoni 2008–2009 pa kar 100 % sevov, kar je v sezoni 2007–2008 na Japonskem vodilo v drugačno strategijo pri uporabi protivirusnih zdravil kot v Evropi (22). Odporni sevi gripe A (H1N1) so se v velikem deležu razširili globalno, a so bili med pandemijo leta 2009 izpodrinjeni z gripo A (H1N1) pdm09, pri kateri za enkrat ugotavljamo nizko stopnjo odpornosti na oseltamivir (20).

Molekularne tehnike nam omogočajo tudi boljši nadzor nad virusi s pandemskim potencialom (14). Prašičji virusi gripe A (H1N1) in (H3N2) običajno ne okužujejo ljudi, občasno pa povzročijo sporadične okužbe in jih v teh primerih označujemo z oznako »variant (v)« (23). Prašiče lahko (tudi hkrati) okužujejo tako ptičji kot človeški virusi gripe in zato lahko služijo kot vmesni gostitelji, v katerih lahko pride do prerazporejanja/izmenjave segmentov virusnih genomov, do antigenskega premika in razvoja sevov s pandemskim potencialom (11). Tudi za virus gripe A (H1N1) pdm09, ki se je med človeško populacijo razširil v pandemiji leta 2009, je bil ugotovljen prašičji izvor (23). Julija 2011 so v ZDA pri ljudeh odkrili prvi primer gripe A (H3N2)v, ki je vseboval M1 virusa gripe A (H1N1) pdm09; največ primerov so odkrili leta 2012 (skupno 309) pri otrocih, mlajših od 5 let, ki so bili v neposrednem stiku s prašiči; v celoti pa so med 2011 in koncem 2017 našli 426 primerov okužb ljudi z gripo A (H3N2)v (24).

## ZAKLJUČEK

Epidemiologija nalezljivih bolezni proučuje dejavnike, ki vplivajo na pojavljanje, širjenje in razvoj nalezljivih bolezni z namenom, da bi razvili in uvedli ustrezne

javnozdravstvene ukrepe za zmanjšanje javnozdravstvenega bremena nalezljivih bolezni. Molekularna epidemiologija uporablja molekularne tehnike za raziskovanje vprašanj, ki jih proučuje epidemiologija. Mednarodna mreža v okviru WHO izvaja virološko in epidemiološko spremljanje gripe za hitro zaznavanje in proučevanje sprememb virusov gripe, pridobivanje informacije za vsakoletni izbor cepiva proti gripi ter zbiranje virusov za vsakoletno proizvodnjo cepiva proti gripi. Virološko spremljanje gripe nujno vključuje tako metode virusne izolacije, anti-genске karakterizacije in fenotipsko testiranje odpornosti proti protivirusnim

zdravilom, kot tudi sodobne molekularne metode za hitro diagnostiko in karakterizacijo (npr. RT-RT-PCR) ter za določanje zaporedja NK. Uporaba molekularne epidemiologije pri spremljanju virusov gripe je omogočila sprotno molekularno spremljanje profilov kroženja virusov gripe in hitro zaznavanje genskih sprememb, ki se odražajo v fenotipskih in antigenskih lastnostih virusov gripe. Vse to pa je močno izboljšalo možnosti za sprejem učinkovitih javnozdravstvenih ukrepov za obvladovanje bremena vsakoletnih epidemij gripe in za hitro odzivanje v primeru pojava ali širjenja spremenjenih ali novih sevov in podtipov virusov gripe.

## LITERATURA

- Ziegler T, Mamahit A, Cox NJ. 65 years of influenza surveillance by a World Health Organisation – coordinated global network. *Influenza Other Respir Viruses*. 2018; 12: 558–65.
- Zhang W, Wood J. The Global Influenza Surveillance and Report System – 65 years of building trust and sharing and a role model for global health security. *Influenza Other Respir Viruses*. 2018; 12: 566.
- Dos Santos G, Neumeier E, Bekkat-Berkani R. Influenza: Can we cope better with the unpredictable. *Hum Vaccin Immunother*. 2016; 12 (3): 699–708.
- Hay A, McCauley JW. The WHO global influenza surveillance and response system (GISRS) – a future perspective. *Influenza Other Respir Viruses*. 2018; 12 (5): 551–7.
- Global Epidemiological Surveillance Standards for Influenza [internet]. WHO; 2014 [citirano 2018 Nov 11]. Dosegljivo na: [http://www.who.int/influenza/resources/documents/WHO\\_Epidemiological\\_Influenza\\_Surveillance\\_Standards\\_2014.pdf](http://www.who.int/influenza/resources/documents/WHO_Epidemiological_Influenza_Surveillance_Standards_2014.pdf)
- Eyboosh S, Haghdooost AA, Mostafavi E, et al. Molecular epidemiology of infectious diseases. *Electronic Physician*. 2017; 9 (8): 5149–58.
- Foxman B, Riley L. Molecular epidemiology: focus on infection. *Am J Epidemiol*. 2001; 153 (12): 1135–41.
- Vineis P. Commentary: First steps in molecular epidemiology: Lower et al. 1979. *Int J Epidemiol*. 2007; 36 (1): 20–22.
- Kilbourne ED. The molecular epidemiology of influenza. *J Infect Dis*. 1973; 127 (4): 478–87.
- WHO. Terms of Reference for National Influenza Centers of the Global Influenza Surveillance and Response System [internet]. WHO; 2017 [citirano 2018 Nov 11]. Dosegljivo na: [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/national\\_influenza\\_centers/tor\\_nic.pdf](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/national_influenza_centers/tor_nic.pdf)
- Mostafa A, Abdelwhab EM, Mettenleiter TC, et al. Zoonotic potential of influenza A viruses: a comprehensive overview. *Viruses*. 2018; 10 (9): 497.
- Biere B, Bauer B, Schweiger B. Differentiation of influenza B virus lineages Yamagata and Victoria by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2010; 48 (4): 1425–7.
- Jennings L, Huang QS, Barr I, et al. Literature review of the epidemiology of influenza B disease in 15 countries in the Asia-Pacific region. *Influenza Other Respir Viruses*. 2018; 12 (3): 383–411.
- WHO. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza [internet]. WHO; 2011 [citirano 2018 Nov 11]. Dosegljivo na: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090\\_eng.pdf;jsessionid=F0701BFBE1E2706C93C0A083554F8D4D?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090_eng.pdf;jsessionid=F0701BFBE1E2706C93C0A083554F8D4D?sequence=1)
- GISAIID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data) [internet]. c2008–2018 [citirano 2018 Nov 11]. Dosegljivo na: <https://www.gisaid.org/>

16. Bedford T, Riley S, Barr IG, et al. Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift. *Nature*. 2015; 523 (7559): 217–20.
17. Rota PA, Wallis TR, Harmon MW, et al. Co-circulation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology*. 1990; 175 (1): 59–68.
18. Chiu SS, Feng S, Chan KH, et al. Hospital-based vaccine effectiveness against influenza B lineages, Hong Kong, 2009-2014. *Vaccine*. 2016; 34 (19): 2164–9.
19. Horthongkham N, Athipanyasilp N, Pattama A, et al. Epidemiological, clinical and virological characteristics of influenza B virus from patients at the hospital tertiary care units in Bangkok during 2011-2014. *PLoS ONE*. 2016; 11 (7): e0158244.
20. Li TC, Chan MC, Lee N, et al. Clinical implications of antiviral resistance in influenza. *Viruses*. 2015; 7 (9): 4929–44.
21. Hauge SH, Dudman S, Borgen K, et al. Oseltamivir-resistant influenza A (H1N1), Norway, 2007-08. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15 (2): 155–62.
22. Baranovich T, Saito R, Suzuki Y, et al. Emergence of H274Y oseltamivir-resistant A(H1N1) influenza viruses in Japan during the 2008-2009 season. *J Clin Virol*. 2010; 47 (1): 23–8.
23. Bangaru S, Nieuwma T, Kose N, et al. Recognition of influenza H3N2 variant virus by human neutralizing antibodies. *JCI Insight*. 2016; 1(10): e86673.
24. CDC - Case Count: Detected U.S. Human Infections with H3N2v by State since August 2011 [internet]. Centers for Disease Control and Prevention; 2018 [citirano 2018 Nov 11]. Dosegljivo na: <https://www.cdc.gov/flu/swineflu/h3n2v-case-count.htm>





## 10. Baničevi dnevi

Mikrobiologija  
v javnem zdravstvu