



medicinski razgledi

Med Razgl | Letnik 51 | Supplement 6



4. Baničevi dnevi – Zoonoze

4. Baničevi dnevi – Zoonoze

Strani

Od 1–230

- | | |
|-----|---|
| 3 | ▶ Zoonoze – večni izziv / <i>Zoonoses – Eternal Challenge</i> – Tatjana Avšič-Županc |
| 9 | ▶ Državni program spremljanja zoonoz / <i>National Programme of Zoonoses Monitoring</i> – Vida Čadonič Špelič, Katja Hladnik Trček |
| 19 | ▶ Pomen spremljanja in obvladovanja zoonoz / <i>The Importance of Monitoring and Controlling Zoonoses</i> – Alenka Kraigher |
| 25 | ▶ Varnost živil med Scilo in Karibdo – med Evropsko agencijo za varnost hrane in potrošnikom / <i>Food Safety between Scylla and Charybdis – between the European Food Safety Authority and the Consumer</i> – Peter Raspor, Mojca Jevšnik, Andrej Kirbiš, Petra Raspor Lainšček, Mateja Ambrožič |
| 35 | ▶ Pojavljanje in občutljivost izolatov salmonel v Sloveniji / <i>Prevalence and Susceptibility of Salmonella Isolates in Slovenia</i> – Tjaša Žohar Čretnik, Alenka Štorman, Nadja Orešič, Marija Trkov, Ingrid Berce, Mateja Ravnik, Bojan Drinovec, Izток Štrumbelj, Alenka Andlovic, Tatjana Harlander |
| 45 | ▶ Kampilobakterioza – pojavnost in nadzor pri ljudeh in perutnini v Sloveniji / <i>Campylobacteriosis – Occurrence and Monitoring of Humans and Poultry in Slovenia</i> – Ingrid Berce, Igor Gruntar |
| 55 | ▶ Verotoksigena <i>Escherichia coli</i> v Evropi in Sloveniji – kaj vemo in kako pristopiti k problemu? / <i>Verotoxigenic Escherichia coli in Europe and Slovenia – What Do We Know and How to Approach the Problem?</i> – Marija Trkov, Alenka Andlovic, Ingrid Berce, Tjaša Žohar Čretnik, Mateja Ravnik, Metka Paragi |
| 63 | ▶ Ali postaja listerioza problem v Evropi in Sloveniji? / <i>Is Listeriosis Becoming a Problem in Europe and Slovenia?</i> – Katja Zelenik, Marija Lušicky, Marija Trkov, Slavica Lorenčič Robnik, Irena Zdovc |
| 71 | ▶ Brucelozna in njena diagnostika – problem veterinarske in humane medicine / <i>Brucellosis and Its Diagnostics – Problem of Veterinary and Human Medicine</i> – Brane Krt, Matjaž Očepek, Tatjana Avšič-Županc, Manica Mueller-Premru |
| 77 | ▶ Odpornost proti protimikrobnim zdravilom pri bakterijah, izoliranih iz živali in živil / <i>Antimicrobial Resistance of Bacteria Isolated from Animals and Food</i> – Irena Zdovc, Majda Golob, Katja Seme, Urška Zajc, Jerneja Ambrožič-Avguštin |
| 87 | ▶ Zoonotski potencial nekaterih enteričnih virusov in vloga vodnih virov pri njihovem kroženju v naravi / <i>Zoonotic Potential of Some Enteric Viruses and the Role of Water Sources in Their Circulation in Environment</i> – Andrej Steyer, Ivan Toplak, Mateja Poljšak-Prijatelj |
| 97 | ▶ Klinična obravnava bolnikov z vročinsko boleznijo po vbodu klopa v Sloveniji / <i>Clinical Treatment of Patients with Febrile Illness after Tick Bite in Slovenia</i> – Stanka Lotrič-Furlan, Petra Bogovič |
| 103 | ▶ Novosti v mikrobiološki diagnostiki klopno prenosljivih mikroorganizmov / <i>Update on Microbiological Diagnostics of Tick-Borne Pathogens</i> – Miša Korva, Tjaša Cerar, Katja Strašek-Smrđel, Eva Ružič-Sabljič, Tatjana Avšič-Županc |

- 109 ▶ Dejavniki, ki vplivajo na pojavnost klopnega meningoencefalitisa v Sloveniji / *Factors Affecting the Incidence of Tick-Borne Encephalitis in Slovenia* – Nataša Knap, Tatjana Avšič-Županc
- 119 ▶ Tuberkuloza kot zoonoza: pomen in diagnostika / *Tuberculosis as a Zoonosis: Importance and Diagnostics* – Mateja Pate, Manca Žolnir-Dovč, Matjaž Ocepek
- 127 ▶ Klinična obravnava bolnika s sumom na leptospirozo ali hemoragično mrzlico z renalnim sindromom / *Clinical Approach to Patients with Suspected Leptospirosis or Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome* – Emil Pal
- 135 ▶ Pomen mikrobiološke diagnostike leptospiroze / *The Importance of Microbiological Diagnosis of Leptospirosis* – Eva Ružič-Sabljič, Daša Podgoršek, Tjaša Cerar
- 141 ▶ Epidemiologija in ekologija hantavirusov v Sloveniji / *Hantavirus Epidemiology and Ecology in Slovenia* – Miša Korva, Katarina Resman, Luka Fajš, Tomi Trilar, Tatjana Avšič-Županc
- 151 ▶ Virus influence – kdaj lahko pričakujemo naslednjo pandemijo? / *Influenza Virus – When Can We Expect the Next Pandemic?* – Miroslav Petrovec, Franc Strle
- 157 ▶ Pojavnost povzročiteljev aviarne influence in vročice zahodnega Nila pri pticah v Sloveniji / *Incidence of Avian Influenza and West Nile in Birds in Slovenia* – Olga Zorman Rojs, Brigita Slavec, Joško Račnik, Uroš Krapež, Marko Zadavec, Alenka Dovč, Aleksandra Hari, Tomi Trilar, Tatjana Avšič-Županc
- 165 ▶ Mikrobiološka diagnostika najpogostejših eksotičnih zoonoz / *Microbiological Diagnostics of Important Exotic Zoonoses* – Tatjana Avšič-Županc, Miša Korva, Katarina Resman, Luka Fajš
- 171 ▶ Sledenje oseb, okuženih med izbruhom vročice Q leta 2007 / *Follow-Up of Subjects Infected during Q Fever Outbreak in 2007* – Daša Stupica
- 177 ▶ Tigrasti komar v Sloveniji – biologija in razširjenost / *Asian Tiger Mosquito in Slovenia – Biology and Distribution* – Katja Kalan, Tomi Trilar
- 185 ▶ Primeri uvožene mrzlice denga med slovenskimi gradbenimi delavci v Mombaju / *Cases of Imported Dengue Fever among Slovenian Construction Workers in Mumbai* – Andrea Pavlovič, Alenka Trop Skaza, Miša Korva, Irena Milotič, Lucija Beškovnik, Tatjana Avšič-Županc
- 191 ▶ Prenos humane granulocitne anaplazmoze s krvjo / *Human Granulocytic Anaplasmosis Transmitted by Blood Transfusion* – Matjaž Jereb, Blaž Pečavar, Janez Tomažič, Igor Muzlovič, Tatjana Avšič-Županc, Tanja Premru-Sršen, Snežana Levičnik-Stezinar, Primož Karner
- 199 ▶ Pojavnost bakterij iz rodu *Pasteurella* v kliničnih vzorcih in prikaz primera / *Pasteurella spp. in Clinical Specimens and a Case Report* – Maja Bombek, Andrej Golle, Jana Rejc Marko
- 207 ▶ Avtohtoni primeri okužb z virusom denga in Toscana v Južni Dalmaciji / *Autochthonous Dengue and Toscana Virus Infections in Southern Dalmatia* – Luka Fajš, Miša Korva, Katarina Resman, Tatjana Avšič-Županc
- 213 ▶ Zoonotski potencial bakterije *Clostridium difficile* / *Zoonotic Potential of Clostridium difficile* – Maja Rupnik, Valerija Zidarič, Matjaž Ocepek, Sandra Janežič
- 219 ▶ *Escherichia coli* z betalaktamazami z razširjenim spektrom delovanja – primerjava genotipov izolatov iz obolelih živali in živil živalskega izvora z genotipi iz človeških kužnin / *Escherichia coli Producing Extended-Spectrum Beta-Lactamases – Genotypes of Isolates from Diseased Animals and Food of Animal Origin Compared with Genotypes of Human Clinical Isolates* – Jerneja Ambrožič-Avguštin, Irena Zdovc, Iztok Štrumbelj
- 227 ▶ Izbruh klopnega meningoencefalitisa zaradi uživanja surovega kozjega mleka na koroški kmetiji / *Tick-Borne Encephalitis after Drinking Raw Goat Milk – the First Outbreak Reported in Slovenia* – Neda Hudopisk, Evgen Janet, Marjana Simetinger, Marta Grgič-Vitek, Edvard Potočnik, Miša Korva, Franc Strle, Tatjana Avšič-Županc

4. Baničevim dnevom na pot

Letna dvodnevna strokovna srečanja Sekcije za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe Slovenskega zdravniškega društva potekajo že vrsto let. Na njih se srečujemo slovenski klinični in medicinski mikrobiologi in drugi strokovnjaki v različnih krajih ob številnih temah. Vedno smo na srečanjih začutili predano regionalno in skupno slovensko delo, željo po novem, boljšem, v prid bolnikom.

Od leta 2008 so srečanja poimenovana po prof. dr. Stanku Baniču, enem od utemeljiteljev sodobne slovenske medicinske mikrobiologije. S tem je srečanjem že v imenu zapisana zaveza zlahtnosti. Prof. dr. Stanko Banič se je v 60 letih strokovnega dela tvorno dotaknil številnih področij, s čimer je njegovo delo postalo zgled pristopa k problemom sodobne medicine – pojave je možno preučevati in reševati le s pogledom z različnih strani.

Zoonoze spremljajo človeštvo že od nekdaj, zdaj te, zdaj one so vedno pomenile hudo breme. Znova je napočil čas njihove povečane pomembnosti. Prenaseljenost ljudi in živali, klimatske spremembe, uporaba antibiotikov, številna potovanja ljudi ter prevoz hrane in živali med državami in celinami ... Globalne spremembe prinašajo neslutene posledice. Tema je interdisciplinarna, zato je med avtorji najti strokovnjake zelo številnih strok – vsak je prispeval dragocen kamenček v mozaik tega srečanja.

Preglednemu uvodnemu delu sledijo zoonoze, ki se prenašajo s hrano, nato tiste, ki se prenašajo z vektorji, sledijo porajajoče se zoonoze ter sklop zanimivih primerov in tem.

Upamo, da bo srečanje primerno mesto za živahne razprave in učinkovite dogovore. Prvih pet črk besede srečanje nam v boju proti zoonozam utegne priti zelo prav – a sreča je naklonjena pogumnim, dejavnim in sodelujočim.

V imenu organizatorjev se zahvaljujem zavzetim avtorjem in požrtvovalnim recenzentom, uredništvu Medicinskih razgledov, sponzorjem in vsem ostalim, ki so kakorkoli pripomogli, da bo srečanje izvedeno in je pričujoči zbornik izšel.

Zanimivo je, da je pogost pozdrav ob slovesu na gorskih stezicah in v ravninskem Prekmurju enak:

Srečno!

Iztok Štrumbelj

Tatjana Avšič - Županc¹

Zoonoze – večni izziv

Zoonoses – Eternal Challenge

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: zoonoze, zoonotični mikroorganizmi, porajajoče se okužbe, antropogeni dejavniki, podnebno-okoljski dejavniki, spremljanje in obvladovanje zoonoz

Zoonoze so nalezljive bolezni, ki se prenašajo iz okuženih ali bolnih živali na ljudi. Zoonoze (p)ostajajo nenehno rastoča, nerešena uganka, ki predstavlja senčnik, pod katerim se skrivajo številne nalezljive bolezni. Pojavnost in epidemiologija zoonoz sta kompleksni in aktivni, saj sta odvisni od raznolikih dejavnikov, ki jih lahko opredelimo kot antropogene, podnebno-okoljske in dejavnike, povezane z lastnostmi mikroorganizmov. Med njimi obstaja pomembna medsebojna povezava. V prispevku opisujemo nekatere dejavnike, ki vplivajo na vedno večjo pojavnost zoonoz.

ABSTRACT

KEY WORDS: zoonoses, zoonotic pathogens, emerging infections, anthropogenic factors, climatic and environmental factors, surveillance and control of zoonoses

Zoonoses are infectious diseases that are transmitted by infected animals to humans. Zoonotic infections remain an ever-growing unsolved puzzle. They typically serve as an umbrella under which numerous infectious diseases are shelved. The emergence and epidemiology of zoonoses are complex and dynamic, being influenced by varying parameters that can roughly be categorized as human-related, pathogen-related, and climate/environment-related; however, there is significant interplay between these factors. The present paper discusses some factors that influence the emergence of zoonoses.

¹ Prof. dr. Tatjana Avšič - Županc, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; tatjana.avsic@mf.uni-lj.si

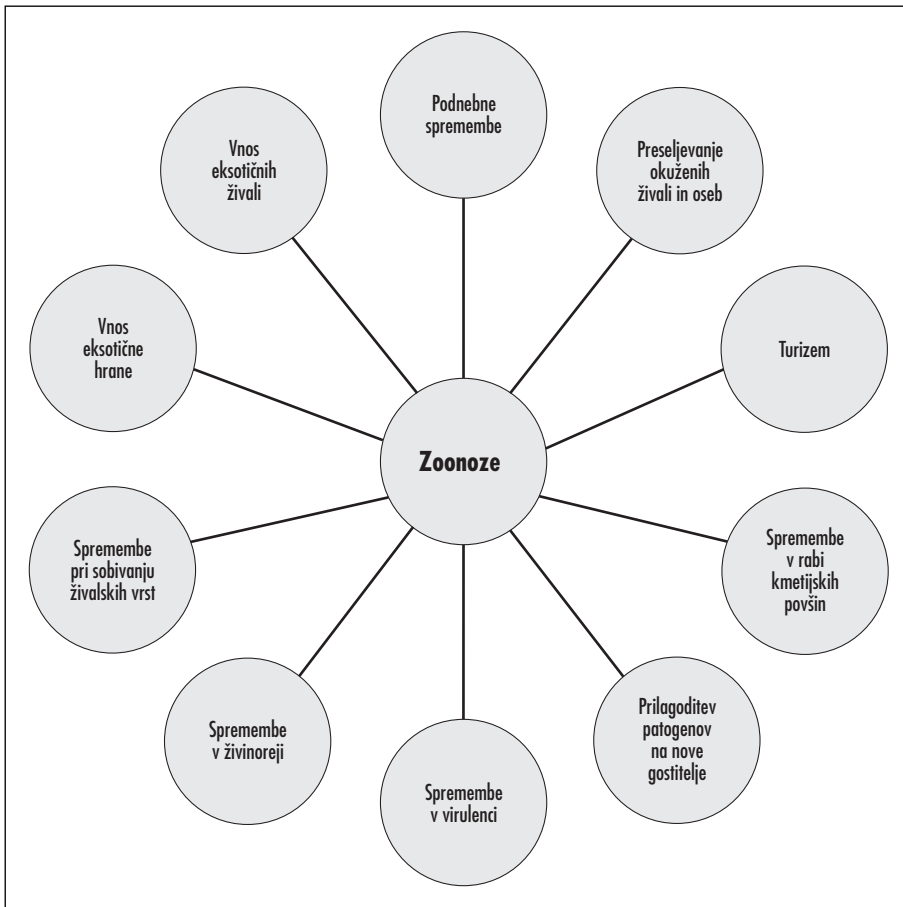
UVOD

Zoonoze so nalezljive bolezni in okužbe, katerih povzročitelji se prenašajo iz okuženih ali bolnih domačih in divjih živali na ljudi. Povzročitelji zoonoz so patogeni mikroorganizmi, ki pri večini okuženih živali ne povzročajo bolezni in bivajo v njih zvečine le kot komenzali. Številni vretenčarji, običajno so to divje živali, služijo mikroorganizmu kot naravni gostitelji ali rezervoarji. Toda preneseni na drugo žival ali človeka lahko povzročijo hudo, dolgotrajno bolezen ali celo smrt. Človek je po okužbi običajno končni gostitelj ali pa mikroorganizem prenaša naprej na druge ljudi (antropozoonoza) ali celo na živali (zooantropozoonoza). Zoonotični mikroorganizmi vstopijo v človeški organizem bodisi neposred-

no skozi poškodovano kožo bodisi posredno s piki členonožcev (komarji, klopi, bolhe, uši), vdihavanjem, zaužitjem okužene hrane ali vode ter ugrizi okuženih živali. Povzročitelji zoonoz so bakterije, virusi, glive in zajedavci (1).

PORAJAJOČE SE ZOOZOZE

Strokovnjaki ocenjujejo, da je med porajajočimi se patogenimi mikroorganizmi 60 % takih, ki povzročajo zoonoze. Med njimi jih več kot tri četrtine izvira iz naravnega okolja (2). Kaj pa so porajajoči se patogeni mikroorganizmi? Po definiciji Svetovne zdravstvene organizacije so porajajoči se patogeni mikroorganizmi na novo odkriti povzročitelji ali že znani patogeni, ki se pojavijo na



Slika 1. Dejavniki, ki vplivajo na pojav novih in ponovno porajajočih se zoonoz.

popolnoma novih področjih ali v novih vrstah. Ponovno porajajoči se patogeni mikroorganizmi pa so znani povzročitelji, ki se včasih po dolgih letih odsotnosti lahko zopet pojavijo na že znanih področjih v obliki izbruhov ali epidemij (3). Čeravno so zoonoze stare bolezni, predstavljajo ali postajajo nekatere med njimi javnozdravstveni problem (4). Zakaj? Odgovor najdemo v nizu prepletajočih se številnih dejavnikov, ki so odvisni od spreminjajočih se stanj (slika 1) (2). Te dejavnike lahko v grobem razdelimo v naslednje skupine: antropogeni (človeški) dejavniki, dejavniki, povezani z mikroorganizmi, in podnebno-okoljski dejavniki.

ANTROPOGENI (ČLOVEŠKI) DEJAVNIKI

V zadnjih desetletjih se soočamo s povečano globalizacijo ljudi, živali in njihovih proizvodov. Tovrstni premiki omogočajo izredno hitro širjenje okužb, kar zahteva najstrožja merila nadzora. Človek nenehno posega v naravne habitate, najpogosteje s povečevanjem populacije ali turizma (5, 6). Takšno obnašanje postavlja ljudi v popolnoma nova ekološka okolja in s tem dovoljuje možnost izpostavitve novim zoonotičnim mikroorganizmom. Značilen primer je širjenje t. i. ekoturizma: turisti iz mestnih okolij množično obiskujejo podeželja, predvsem v deželah v razvoju, kjer na primer taborijo, se ukvarjajo z vodnimi športi ali obiskujejo podzemne jame. Tako so izpostavljeni določenim vektorsko prenosljivim zoonotičnim agensom, kot so rikecije, leptospire in različni virusi, ki povzročajo hemoragične mrzlice (7).

V novejšem času so postale modne posebne prehrabne navade uživanja surovih (nepasteriziranih) mlečnih izdelkov, rib in mesa, ki pogosto vodijo v neobičajne bakterijske (bruceloza) ali parazitarne okužbe (8). Na prevalenco zoonoz imajo znaten vpliv tudi socialno-ekonomske spremembe, ki se odražajo na različne načine. Da bi nahranili vedno bolj rastočo populacijo ljudi, imamo povečano potrebo po pridelavi hrane. To pogosto vodi v temeljite spremembe kmetijskih postopkov, ki nemalokrat vključujejo ogromne količine živali ali celo različne vrste živali, ki sobivajo na istem, omejenem prostoru

pogostokrat skupaj z ljudmi. Takšen način kmetovanja in tudi življenja omogoča mikroorganizmom preskok z ene živalske vrste na drugo in ne nazadnje na človeka. Omenjeni dejavniki so bili pred leti povod za izbruh pandemije sindroma akutne respiratorne stiske (angl. *severe acute respiratory syndrome*, SARS), influence H5N1, H1N1 in epidemije virusa Nipah v Maleziji (7, 9, 10).

Prav tako imajo velik neposredni vpliv na pojavnost zoonoz lokalne kakor tudi globalne politične spremembe. Značilen primer je pojav tranzicije v številnih nekdanjih komunističnih državah, kjer je od države strogo nadzorovana ekonomija prešla v odprto, prosto trgovanje. V teh deželah so se ponovno pojavili številni zoonotični mikroorganizmi, saj je postal tako veterinarski kakor tudi javnozdravstveni nadzor okrnjen ali je celo popolnoma izzvenel. Ko se je taki politični tranziciji pridružila še vojna, na primer na Balkanu v 90-ih letih, se je oblikovala še močnejša socialna podlaga za izbruhe zoonoz, saj so se ji pridružili še lakota, neprostoovoljno preseljevanje obsežne populacije in predvsem zlom javnozdravstvenega in medicinskega sistema. Taki primeri so izbruhi tularemije, krimsko-kongoške hemoragične mrzlice in bruceloze na Kosovu (11–14). Prav tako je pomembno omeniti tudi konec »hladne vojne«, ki je izbrisal meddržavne meje ter sočasno ponudil skoraj nedovoljeno trgovino z živalmi, tudi okuženimi. Zanimiv je primer trihineloze, katere incidenca se je v Evropi po tem, ko je Romunija postala članica Evropske unije, potrojila (15). Ne nazadnje predstavljajo problem tudi priseljenci, zvečine begunci, ki pomenijo za državo gostiteljico vnos nove populacije s svojstveno epidemiološko osnovo in tako tudi vir novih izbruhov nalezljivih bolezni, tudi zoonoz, kot sta npr. tripanosomioza in bruceloza (16, 17).

Ne smemo pozabiti tudi na dejstvo, da je medicinska znanost uspela v boju z nekaterimi drugimi boleznimi, zato se je povečala življenjska doba ljudi. Tako so se oblikovale nove rizične skupine, kot so starostniki in osebe z imunsko pomanjkljivostjo (npr. bolniki z aidsom, bolniki s presajenimi organi), ki so mnogo bolj dovzetne za določene zoonotične okužbe (2).

PODNEBNO-OKOLJSKI DEJAVNIKI

Izjemno pomemben dejavnik so podnebne spremembe, saj nekaterim prenašalcem kakor tudi naravnim rezervoarjem zoonotičnih mikroorganizmov omogočajo širitev ugodnih življenjskih pogojev. Značilen primer lokalnega vpliva podnebnih sprememb je izbruh hantavirusnega pljučnega sindroma (angl. *hantavirus pulmonary syndrome*, HPS) leta 1993 v Združenih državah Amerike (ZDA). Zaradi pojava *El Niño* – južne oscilacije, ki tvori nihanja temperature na vodni gladini, se na obalnih območjih pojavijo poplave, suša in druge vremenske motnje. Tako je pojavu *El Niño* sledilo ogromno deževje na jugozahodni obali ZDA, kar je botrovalo nesorazmerno bujni rasti vegetacije, ki je osnovna hrana določeni populaciji glodavcev – naravnih gostiteljev hantavirusov (18). Pojav *El Niño* odraža svoj vpliv tudi na obali vzhodne Afrike, vključno s Kenijo, Tanzanijo in porečjem Nila. Zato strokovnjaki zadnje veliko epidemijo mrzlice v dolini Rift povezujejo ravno z močnim deževjem v teh sicer suhih stepskih predelih (19).

Podnebne spremembe, kot je na primer splošno segrevanje Zemlje, vodijo v spremenjene ekološke pogoje, ki olajšajo uporabo površin in gibanje okuženih gostiteljev, dovzetnih živali ali prenašalcev patogenih mikroorganizmov (20). Strokovnjaki menijo, da globalno segrevanje vpliva tudi na preseljevanje ptic in na spremembo njihovih ustaljenih selitvenih poti ter posledično na možnost vnosa zoonotičnih agensov na neendemska področja. Tako povezujejo nedavne izbruhe virusa zahodnega Nila v Grčiji in Romuniji ravno s spremembami temperatur zračnih tokov (21). Vemo tudi, da je življenjski krog komarjev odvisen od temperature in da poleg drugih dejavnikov že minimalni dvig povprečne poletne temperature le za nekaj stopinj lahko sicer tropskim vrstam komarjev omogoči naselitev v zmerno toplem podnebnem pasu. Eden vidnejših primerov je vnos, ohranitev in obsežna razširitev invazivne tropske vrste komarja *Aedes albopictus* (tigrasti komar) v zadnjih dveh desetletjih v Italiji, od koder se je znatno razširil v sosednje države, vključno s Slovenijo. Prisotnost obsežne, stalne popu-

lacije tigrastega komarja na tem področju je bila tudi biološko pogojena podlaga za množični izbruh virusa chikungunya v Italiji leta 2007, zaradi katerega je zbolelo več kot 250 ljudi (22).

Mnogi strokovnjaki so mnenja, da bodo ravno podnebne spremembe vodilni dejavnik za pojavljanje in širjenje predvsem z vektorji prenosljivih mikroorganizmov. Podnebne spremembe imajo namreč tudi velik učinek na razvoj patogenov in njihovih prenašalcev (23).

DEJAVNIKI, POVEZANI Z LASTNOSTMI MIKROORGANIZMOV

Pogoste mutacije in genetske rekombinacije mnogokrat vodijo v take oblike patogenih mikroorganizmov, ki imajo spremenjeno, najpogosteje povečano raven sposobnosti ohranitve in širjenja v naravnem okolju (24). Mutacije so osnovni izvor genetskih variacij, ki oblikujejo naravno selekcijo, genetski odmik (angl. *drift*) in rekombinacije. Ti dejavniki so še posebej opazni pri virusih, ki imajo v primerjavi z drugimi mikroorganizmi relativno majhen genom in kratek generacijski čas, predvsem pri virusih z molekulo RNA v genomu (25). Najlepši primeri so mutacije v glikoproteinih virusne ovojnice (hemaglutinini in nevraminidaze) ali rekombinacije med virusnimi segmenti pri virusih influence, ki so vzrok za vsakoletne epidemije in občasne pandemije gripe (26).

Zanimiv je tudi primer ponovnega pojava virusa chikungunya z obsežnimi izbruhi na otočjih v Indijskem oceanu v letih 2005–2006. Dokazali so namreč, da je zaradi ene same mutacije v glikoproteinu virusne ovojnice (E1-A226V) virus spremenil dovzetnost za specifičnega prenašalca. Tako se je dobro prilagodil za razmnoževanje tudi v tigrastem komarju, kar je dodatno prispevalo k širitvi in obsežnosti epidemije (27).

Spremembe v ekologiji in pestrosti patogenih mikroorganizmov nedvomno vodijo do nastanka novih genetskih različic, ki imajo spremenjen patogenetski potencial. Le-ta se kaže v povečani invazivnosti, zmožnosti hitrega širjenja v ogroženi populaciji, izdelovanju toksinov in pridobivanju protimikrobne odpornosti (28).

SPREMLJANJE IN OBVLADOVANJE ZOOZ

Kljub temu da veljajo številne zoonoze za oportunistične okužbe, nekateri strokovnjaki menijo, da bodo v bodoče ponovno porajajoče se zoonoze glavni izvor nalezljivih bolezni pri ljudeh. Zato so javnozdravstvene ustanove pripravile različne pristope, ki temeljijo predvsem na sistemu epidemiološkega spremljanja in obvladovanja na področjih, kjer obstaja velika verjetnost pojava porajajočih se bolezni (29). Ti pristopi vključujejo izboljšano odkrivanje patogenih povzročiteljev v naravnih rezervoarjih in morebitnih prenašalcih, zgodnje zaznavanje izbruhov bolezni, široko zastavljene raziskovalne projekte za preučevanje dejavnikov, ki vplivajo na pojavljanje bolezni, ter učinkovito obvladovanje (npr. karantena in ustrezna higiena) (30). Nadzor nad pojavom bolezni pri ljudeh mora biti v tesni povezavi z veterinarskimi ustanovami, ki

skrbijo za nadzor bolezni pri domačih in divjih živalih. Učinkovito preprečevanje zoonoz temelji na dobrem medsebojnem sodelovanju zdravstvenih ustanov z veterinarsko službo, kmetijstvom in tistimi ustanovami, ki skrbijo za zdravstveno varstvo živali in/ali pridelavo ter predelavo živil živalskega izvora (31, 32).

ZAKLJUČEK

Zaradi neprestanih sprememb v demografiji ljudi in živali ter zaradi sprememb v okolju in povzročiteljih lahko pričakujemo vedno nove in ponovno pojavnosti znane zoonoze. Nemogoče je napovedati, katera zoonoza bo naslednja preteča grožnja. Pa vendar bomo s povečevanjem in povezovanjem skupnih moči za izboljšanje sposobnosti odkrivanja novih izbruhov povečali tudi verjetnost za uspešen in učinkovit odziv na nove, ponovno porajajoče se in prezrte zoonoze.

LITERATURA

- Logar J, Petrovec M. Zoonoze. In: Gubina M, Ihan A, eds. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2002. p. 395–403.
- Cutler SJ, Fooks AR, van der Poel WH. Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16 (1): 1–7.
- Report of the WHO/FAO/OIE joint consultation on emerging zoonotic diseases; 3–5 May 2004; Geneva. Geneva: WHO, FAO, OIE; 2004.
- Daszak P, Epstein JH, Kilpatrick AM, et al. Collaborative research approaches to the role of wildlife in zoonotic disease emergence. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2007; 315: 463–75.
- Gibbs EP. Emerging zoonotic epidemics in the interconnected global community. *Vet Rec.* 2005; 157 (22): 673–9.
- Greger M. The human/animal interface: emergence and resurgence of zoonotic infectious diseases. *Crit Rev Microbiol.* 2007; 33 (4): 243–99.
- Cascio A, Bosilkovski M, Rodriguez-Morales AJ, et al. The socio-ecology of zoonotic infections. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17 (3): 336–42.
- Chomel BB, Belotto A, Meslin FX. Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13 (1): 6–11.
- Chomel BB. Control and prevention of emerging zoonoses. *J Vet Med Educ.* 2003; 30 (2): 145–7.
- Jones KE, Patel NG, Levy MA, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature.* 2008; 451 (7181): 990–3.
- Reintjes R, Dedushaj I, Gjini A, et al. Tularemia outbreak investigation in Kosovo: case control and environmental studies. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8 (1): 69–73.
- Avsic - Zupanc T. Epidemiology of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in the Balkans. In: Ergonul O, Whitehouse CA, eds. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. Dordrecht: Springer; 2007. p. 75–88.
- Jackson R, Pite L, Kennard R, et al. Survey of the seroprevalence of brucellosis in ruminants in Kosovo. *Vet Rec.* 2004; 154 (24): 747–51.
- Pappas G. Of mice and men: defining, categorizing and understanding the significance of zoonotic infections. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17 (3): 321–5.
- Blaga R, Durand B, Antoniu S, et al. A dramatic increase in the incidence of human trichinellosis in Romania over the past 25 years: impact of political changes and regional food habits. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 76 (5): 983–6.

16. Rodriguez-Morales AJ, Benitez JA, Tellez I, et al. Chagas disease screening among Latin American immigrants in non-endemic settings. *Travel Med Infect Dis.* 2008; 6 (3): 162-3.
17. Dahouk SA, Neubauer H, Hensel A, et al. Changing epidemiology of human brucellosis, Germany, 1962-2005. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13 (12): 1895-900.
18. Yates T, Mills J, Parmenter C. The ecology and evolutionary history of an emergent disease: hantavirus pulmonary syndrome. *BioScience.* 2002; 52 (11): 989-98.
19. Anyamba A, Linthicum KJ, Small JL, et al. Climate teleconnections and recent patterns of human and animal disease outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6 (1): e1465.
20. Forman S, Hungerford N, Yamakawa M, et al. Climate change impacts and risks for animal health in Asia. *Rev Sci Tech.* 2008; 27 (2): 581-97.
21. Mills JN, Gage KL, Khan AS. Potential influence of climate change on vector-borne and zoonotic diseases: a review and proposed research plan. *Environ Health Perspect.* 2010; 118 (11): 1507-14.
22. 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.
23. Gould EA, Higgs S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009; 103 (2): 109-21.
24. Mahy BW, Brown CC. Emerging zoonoses: crossing the species barrier. *Rev Sci Tech.* 2000; 19 (1): 33-40.
25. Holmes EC, Drummond AJ. The evolutionary genetics of viral emergence. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2007; 315: 51-66.
26. Wilks S, de Graaf M, Smith DJ, et al. A review of influenza haemagglutinin receptor binding as it relates to pandemic properties. *Vaccine.* 2012; 30 (29): 4369-76.
27. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, et al. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* 2007; 3 (12): e201.
28. Maillard JC, Gonzalez JP. Biodiversity and emerging diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1081: 1-16.
29. Hadorn DC, Stark KD. Evaluation and optimization of surveillance systems for rare and emerging infectious diseases. *Vet Res.* 2008; 39 (6): 57.
30. Jost CC, Mariner JC, Roeder PL, et al. Participatory epidemiology in disease surveillance and research. *Rev Sci Tech.* 2007; 26 (3): 537-49.
31. Kahn LH. Confronting zoonoses, linking human and veterinary medicine. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12 (4): 556-61.
32. Madoff L. Cooperation between animal and human health sectors is key to the detection, surveillance, and control of emerging disease: IMED 2007 meeting in Vienna, February 2007. *Euro Surveill.* 2006; 11 (12): E061221.4.

Vida Čadonič Špelič¹, Katja Hladnik Trček²

Državni program spremljanja zoonoz

National Programme of Zoonoses Monitoring

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: spremljanje zoonoz, javno veterinarsko zdravje, živila

Spremljanje zoonoz na nacionalnem nivoju poteka v Sloveniji že vsaj od leta 1985. Državni program spremljanja zoonoz se izvaja z namenom sistematičnega zbiranja, spremljanja, analiziranja in posredovanja podatkov o pojavu zoonoz, njihovih povzročiteljev in s tem povezane odpornosti proti protimikrobnim zdravilom. Program spremljanja vključuje spremljanje znanih povzročiteljev zoonoz, je pa tudi dovolj fleksibilen, da se v program vključi nove porajajoče se povzročitelje zoonoz. Samo spremljanje zoonoz, brez analize zbranih podatkov, ima omejeno vrednost. Končni namen je zbrati dovolj kakovostnih informacij glede pojavljanja zoonoz, ki bi omogočili podlago za ustrezne ukrepe, s katerimi bi zmanjšali tveganje za javno zdravje na sprejemljivo raven.

ABSTRACT

KEY WORDS: monitoring of zoonoses, veterinary public health, foodstuffs

In Slovenia, zoonoses monitoring at the national level has been conducted since 1985. National Zoonoses Monitoring Programme is underway for the purposes of systematic collection, monitoring, analysis and communication of data on the emergence of zoonoses, zoonotic agents, and pertaining antimicrobial resistance. Known zoonotic agents are monitored within the National Zoonoses Monitoring Programme, which is flexible enough so as to comprise the recently emerging zoonotic agents as well. As the monitoring of zoonoses per se, without analysing the collected data, would be of limited value only, the ultimate purpose is to collect high-quality information on the emergence of zoonoses, which shall provide a sound basis for any relevant measures of reducing the risks to public health to an admissible level.

¹ Dr. Vida Čadonič Špelič, dr. vet. med., Veterinarska uprava Republike Slovenije, Dunajska cesta 22, 1000 Ljubljana; vida.cadonic@gov.si

² Katja Hladnik Trček, MSc, dr. vet. med., Veterinarska uprava Republike Slovenije, Dunajska cesta 22, 1000 Ljubljana

ZGODOVINA DRŽAVNEGA PROGRAMA SPREMLJANJA ZOOZOV

Zgodovina spremljanja zoonoz na Slovenskem sega v 18. stoletje, kjer se pojavljajo zapisi o vraničnem prisadu in smrkavosti, ki sta terjali veliko smrtnih žrtev. Zanimljivo tudi ni dejstvo, da je zaradi izbruha kužnih bolezni živali prebivalstvo posledično trpelo pomanjkanje mesa in mleka, kar se je odražalo tudi na njihovem zdravju (1).

V preteklem stoletju je bila steklina stalno prisotna na slovenskih tleh, o čemer pričajo razne okrožnice in celo zakon o odvracanju in zatiranju kužnih bolezni pri živalih (2). Med epizootijami stekline med psi na Slovenskem so bili njene žrtve nemalokrat tudi ljudje.

Eden izmed zapisov omenja izbruh stekline v Škofji Loki leta 1880 (2). Kot eno izmed prvih dejavnosti varstva prebivalstva pred zoonozami so uvedli ukrepe izročanja psov in mačk, ki so bili v stiku s steklo živaljo, konjederu. Oblast je zaukazala privezovanje psov in odstrel potepuških psov kot tudi pasjo zaporo, t. i. pasji kontumac. Za kršitelje omenjenih ukrepov in v primeru poškodbe ali smrti človeka je bila zagrožena zaporna kazen (2).

Kot zelo pomembna dejavnost varstva prebivalstva pred zoonozami je bila mesogledna služba, ki so jo veterinarji v Ljubljani opravljali od leta 1851 (1). Prvi sodobni program spremljanja zoonoz, ki zajema aktivnosti in ukrepe nad sedemnajstimi povzročitelji zoonoz, pa je bil izdan v Programu varstva prebivalstva pred zoonozami v obdobju 1985–1990 (3).

PRAVNA PODLAGA

Evropska zakonodaja določa pogoje za izvajanje programa spremljanja zoonoz v naslednjih predpisih:

- Uredba (ES) št. 178/2002 Evropskega parlamenta in sveta z dne 28. januarja 2002 o določitvi splošnih načel in zahtevah živilske zakonodaje, ustanovitvi Evropske agencije za varnost hrane in postopkih, ki zadevajo varnost hrane (Uradni list Evropske unije (EU) št. 31, 1. 2. 2002, str. 1–24),

- Uredba (ES) št. 2160/2003 Evropskega parlamenta in sveta z dne 17. novembra 2003 o nadzoru salmonele in drugih opredeljenih povzročiteljev zoonoz, ki se prenašajo z živali (Uradni list Evropske unije št. 325, 12. 12. 2003, str. 1–15),
- Uredba Komisije (ES) št. 2073/2005 z dne 15. novembra 2005 o mikrobioloških merilih za živila (Uradni list Evropske unije št. 338, 22. 12. 2005, str. 1–26),
- Direktiva 2003/99/ES Evropskega parlamenta in sveta z dne 17. novembra 2003 o spremljanju zoonoz in povzročiteljev zoonoz, ki spreminja Odločbo sveta 90/424/EGS in razveljavlja Direktivo sveta 92/117/EGS, ki je povzeta v Pravilniku o monitoringu zoonoz in povzročiteljev zoonoz (Uradni list Republike Slovenije (RS), št. 67/04) in
- druge.

Nacionalna zakonodaja, ki natančneje določa pravno podlago za program spremljanja zoonoz, je določena v sedmih aktih:

- Zakon o veterinarstvu (Uradni list RS, št. 33/01, 45/04),
- Zakon o veterinarskih merilih skladnosti (Uradni list RS, št. 93/2005),
- Zakon o nalezljivih boleznih (Uradni list RS, št. 33/2006),
- Pravilnik o monitoringu zoonoz in povzročiteljev zoonoz (Uradni list RS, št. 67/04),
- Pravilnik o boleznih živali (Uradni list RS, št. 81/07 in 24/10),
- Pravilnik o ukrepih za ugotavljanje, preprečevanje širjenja in zatiranje stekline – Rabies (Uradni list RS, št. 139/06, 67/07) in
- Pravilnik o informacijskem sistemu za spremljanje, nadzor in poročanje o določenih boleznih živali (Uradni list RS, št. 50/2010).

ZNAČILNOSTI DRŽAVNEGA PROGRAMA SPREMLJANJA ZOOZOV

Poleg državnega programa spremljanja zoonoz se spremlja tudi pojav morskih biotoksinov, mikrobiološke onesnaženosti školjk in protimikrobne odpornosti bakterij. Monitoring odpornosti proti protimikrobnim zdravilom se izvaja na izolatih bakterij (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., verotoksigena *Esch-*

erichia coli (VTEC) in indikatorskih bakterijah *E. coli*) pridobljenih iz živali, živil živalskega izvora, drugih živil in na izolatih bakterij, pridobljenih iz vzorcev bolnikov (4).

Bistven del državnega programa spremljanja zoonoz je tudi monitoring. Gre za sistem zbiranja, spremljanja, analiziranja in posredovanja podatkov o pojavu zoonoz, njihovih povzročiteljev in s tem povezane protimikrobne odpornosti (5). Kot država članica Evropske skupnosti nosimo odgovornost za vzpostavitev in vzdrževanje programa spremljanja zoonoz, ki poteka na nivoju primarne proizvodnje živil živalskega izvora in drugih nivojih prehranske verige (5). Prednostno program spremljanja zajema naslednje zoonoze oziroma povzročitelje zoonoz: bruceloza, kampilobakterioza, ehinokokoza, listerioza, salmoneloza, trihineloza, tuberkuloza (*Mycobacterium bovis*) in VTEC (6).

Pojavi zoonoz v živalskih in človeških populacijah, krmi in živilih vplivajo na javno zdravje, lahko pa imajo tudi gospodarske posledice, ki vplivajo na trgovanje z živali in s krmo. Takšen primer se je zgodil pri lanskoletnih izbruhih okužb ljudi z *E. coli* po Evropi. Epidemiološki trendi v človeških in živalskih populacijah, živilih in krmi ter porajajoča se tveganja narekujejo posodabljanje seznama bolezni, zajetih v državnem programu spremljanja zoonoz. Državni program spremljanja zoonoz je prožen in se glede na epidemiološko stanje v državi prilagaja situaciji z vključitvijo drugih zoonoz (npr. kalicivirus, virus hepatitisa A, virus influence, steklina, virusi, ki se prenašajo s klopi, borelijoza, botulizem, leptospiroza, psitakoza, tuberkuloza drugih povzročiteljev od zgoraj naštetih, vibrioza, jersinioza, anisakioza, kriptosporidioza, cisticerkoza in toksoplazmoza ter druge) (6, 7).

Omenjena prožnost programa se kaže v tem, da smo glede na stanje okužb pri ljudeh državnim program spremljanja zoonoz s pričetkom leta 2012 nadgradili s spremljanjem dveh dodatnih zoonoz, in sicer trakuljavosti in dermatofitoze (4). Podatki gibanja nalezljivih bolezni uvrščajo dermatofitoze med deset najpogostejše prijavljenih nalezljivih bolezni v RS leta 2010, kjer ima pojav mikrosporije bistveno vlogo (8). Cisticerkoza je bila vključena v program spremljanja na podlagi endemično povečane okužbe pri gove-

du, ki je vmesni gostitelj trakulje. Tako je trenutno v programu zajeto spremljanje štirinajst povzročiteljev zoonoz in spremljanje odpornosti proti protimikrobnim zdravilom (4).

NAMEN

Za zaznavanje tveganja, ki bi ga povzročitelji zoonoz lahko predstavljali za človeka, je sistem sestavljen iz stalnega in prožnega dela, sama mreža spremljanja pa je sestavljena iz lokalnega in centralnega nivoja. Spremljanje zoonoz v Evropi poteka skozi obstoječe sisteme, kjer države članice zbirajo podatke in nato o njih poročajo na centralni evropski nivo – Evropski agenciji za varnost hrane (angl. *European food safety authority*, EFSA). EFSA zbira, analizira in posreduje podatke o trendih gibanja zoonoz in njihovih povzročiteljev za področje EU, tudi s pomočjo Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. *European centre for disease prevention and control*, ECDC), in jih nato objavi v letnem poročilu o gibanju zoonoz (7, 9, 10). Ti podatki nam omogočajo vpogled v stanje glede pojava zoonoz po Evropi.

Za namen odkrivanja in opredelitve tveganj, povezanih z izpostavljanjem določenim zoonozam, EFSA pripravi znanstvena mnenja, ki pripomorejo pri odločitvah glede tveganja, ki ga zoonoze lahko predstavljajo za javno zdravje (11). Namen teh znanstvenih mnenj je harmonizacija pri odločanju glede upravljanja s tveganjem v posamezni državi članici. Država članica lahko ne glede na znanstveno mnenje EFSA uporabi previdnostno načelo ali neharmoniziran princip, v kolikor se tveganje pojavi na nacionalnem nivoju.

Previdnostno načelo se uvede, kadar je po oceni razpoložljivih informacij ugotovljena možnost neželenih učinkov na zdravje in obstaja znanstvena negotovost. Takrat se lahko sprejmejo začasni ukrepi za obvladovanje tveganja za zagotovitev visoke ravni varovanja zdravja, dokler niso na voljo nadaljnje znanstvene informacije za izčrpnjšo oceno tveganja (11).

METODE

V programu spremljanja zoonoz sodelujeta Ministrstvo za zdravje in Ministrstvo za kmetijstvo in okolje, kjer so izvajalci vzorčenja in

zbiranja podatkov Veterinarska uprava RS, Nacionalni veterinarski inštitut, Inšpektorat RS za kmetijstvo, gozdarstvo, hrano in okolje, Zdravstveni inšpektorat RS in Inštitut za varovanje zdravja.

Spremljanje poteka na aktiven in pasiven način. Prvi je usmerjen in natančno določen za specifično kategorijo živil, kjer so določeni mesto, način vzorčenja ter število odvzetih vzorcev kot tudi finančni okvir. Vzorčenje živil se izvaja v različnih fazah živilske verige (maloprodaja, klavnice, razsekovalnice, kmetijska gospodarstva itd.). Podatki o prijavljenih okužbah ljudi, ki jih posreduje Inštitut za varovanje zdravja, pa so zbrani na pasivni način.

TRENDI GIBANJ OKUŽB Z ZOOZOZAMI PRI LJUDEH IN PRIMERJAVA S TRENDI PRISOTNOSTI POVZROČITELJEV ZOOZOV V ŽIVILIH V SLOVENIJI V OBDOBJU 2008–2010

Slika 1 prikazuje trend okužbe z zoonozami, ki imajo med vsemi spremljanimi zoonozami relativno visoko incidenco okužbe pri ljudeh: salmoneloza in kampilobakterioza. Največ okužb s povzročitelji zoonoz v RS predstavljajo kampilobakterioze, kjer je opazen trend naraščanja, medtem ko se število salmoneloz pri ljudeh vsako leto manjša.

Kot primerjava s stanjem pri živalih in v živilih so podani trendi prisotnosti povzročiteljev zoonoz (slika 2, tabela 1, tabela 2, tabela 3, tabela 4, tabela 5). Podatki o živilih so iz usmerjenega (aktivnega) spremljanja, medtem ko so pri določenih boleznih živali podatki iz pasivnega spremljanja (tabela 5).

Slika 3 prikazuje trend gibanja ostalih zoonoz v RS, ki dosegajo nižjo incidenco od zgo-

raj omenjenih. Tabela 2 številčno prikazuje incidenco okužb ljudi, okuženih z zoonozami v obdobju 2008–2010, iz katere je razvidno, da so trihinelozna, bruceloza (*Brucella* spp.) in mrzlica Q obolenja z zelo nizko incidenčno stopnjo, medtem ko je bil zadnji primer okužbe s steklino ugotovljen leta 1950 (11). Incidenca okužbe z jersinijo pada, medtem pa incidenca okužb z VTEC in listeriozo kaže trend naraščanja (slika 3, tabela 2). Incidenca ehinokokoze kaže nespremenljivo stanje.

Iz spodnjih tabel je razvidno, da kažeta kampilobakterioza in listerioza tako pri okužbah ljudi kot pojavnosti v živilih rahel trend naraščanja (slika 1, slika 2, slika 3). VTEC prav tako kaže rahel trend naraščanja, vendar rezultati kažejo, da je prevalenca večja pri živalih kot v mesu in ostalih živilih (slika 3, tabela 4) (12).

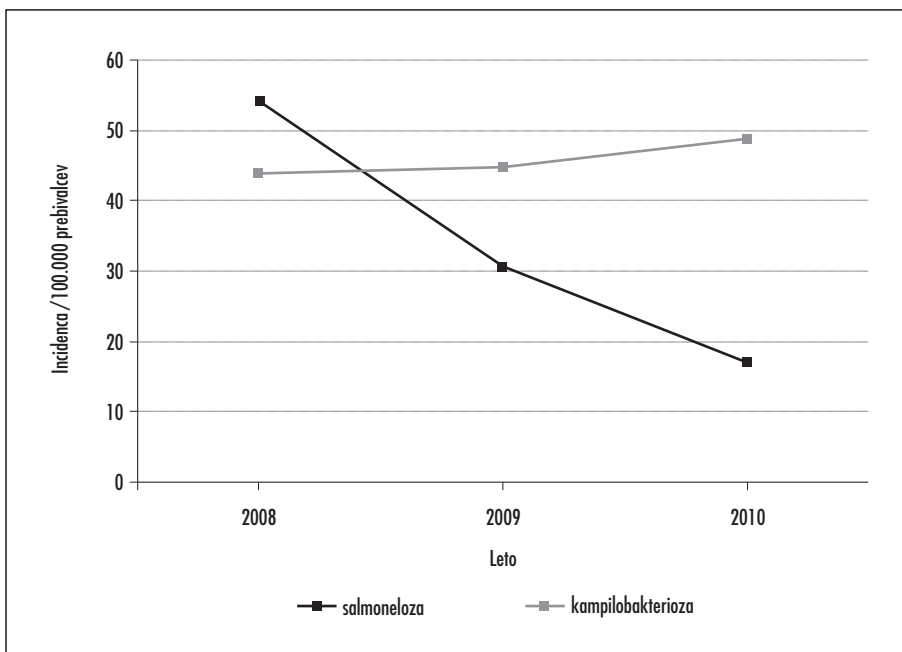
Iz zgornjih rezultatov spremljanja zoonoz v živilih in pri živalih je tudi razvidna dodana vrednost, ki jo imajo podatki iz aktivnega spremljanja, v primerjavi s pasivnim, ki ne podaja dovolj kvalitetnih podatkov za izpeljavo končnih zaključkov glede gibanja določenih zoonoz (tabela 5).

Spremljanje odpornosti proti protimikrobnim zdravilom

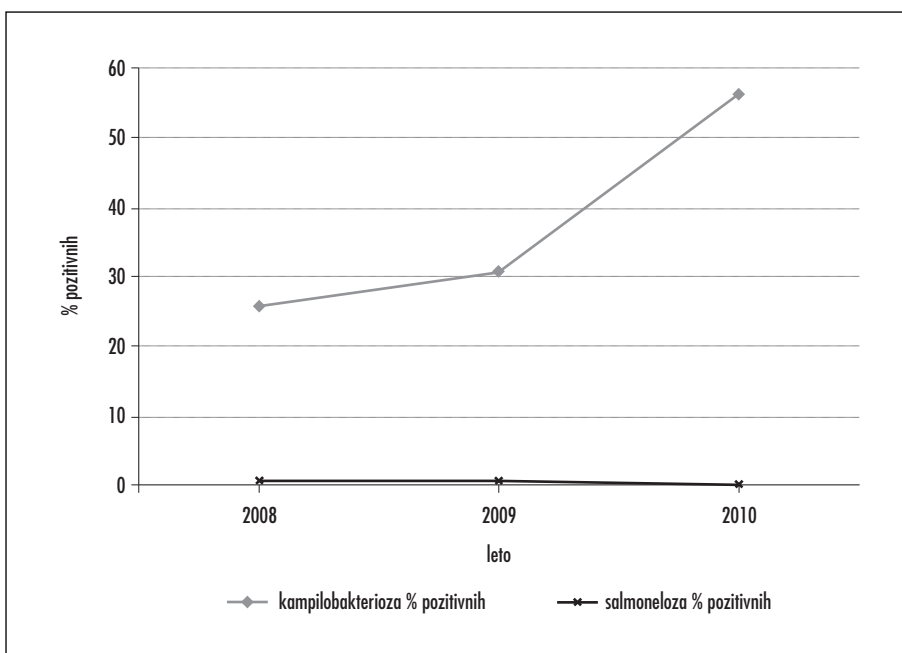
Večkratno odporni izolati so tisti, ki so odporni na štiri ali več antibiotikov (12). Vzorčenje je potekalo v različnih matriksih, in sicer: fecesu, mesu, slepih črevesih in koži živali. Slika 4 prikazuje trend gibanja deleža večkratno odpornih sevov salmonelle, kampilobaktra in *E. coli* v obdobju 2008–2010. Opazen je relativno visok odstotek večkratno odpornih izolatov *E. coli*, na drugem mestu sledijo večkratno odporni sevi salmonelle (slika 4). Stanje v Sloveniji je

Tabela 1. Število odvzetih vzorcev živil za preiskavo na prisotnost kampilobaktra in salmonelle v obdobju 2008–2010 (12, 16, 17).

Število vzorcev glede na posamezno leto	2008	2009	2010
Kampilobakter – št. odvzetih vzorcev	1.000	609	149
število pozitivnih vzorcev	258	186	84
kampilobakterioza % pozitivnih	25,8	30,5	56,4
Salmoneloza – št. odvzetih vzorcev	2.618	2.773	1.799
število pozitivnih vzorcev	18	14	2
salmoneloza % pozitivnih	0,7	0,5	0,1



Slika 1. Trendi gibanja incidence okužb ljudi s salmonelozo in kampilobakteriozo v obdobju 2008–2010 (12, 14, 15).



Slika 2. Trendi gibanja deleža živil, pozitivnih na prisotnost kampilobaktra in salmonele v obdobju 2008–2010 (12, 16, 17).

Tabela 2. Incidenca okužb ljudi na 100.000 prebivalcev glede na posamezno leto (12, 14, 15). VTEC – verotoksigena *Escherichia coli*.

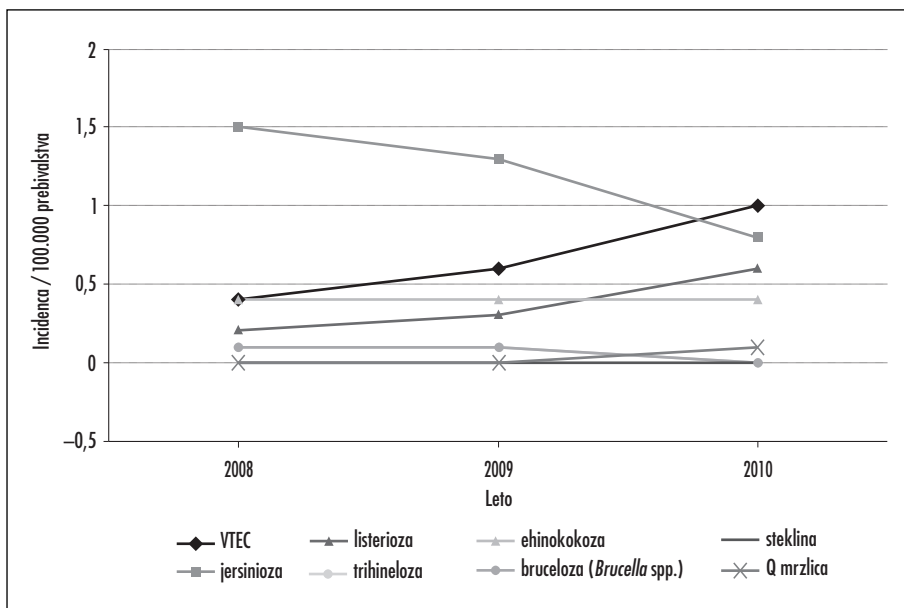
Incidenca okužb na 100.000 prebivalcev glede na posamezno leto	2008	2009	2010
kampilobakterioza	43,9	45	48,9
salmoneloza	54,3	30,7	16,9
steklina	0	0	0
Q-mrzlica	0	0	0,05
trihineloza	0,05	0,05	0
bruceloza (<i>Brucella</i> spp.)	0,1	0,1	0
VTEC	0,4	0,6	1
jersinioza (<i>Yersinia enterocolitica</i>)	1,5	1,3	0,8
listerioza	0,2	0,3	0,6
ehinokokoza	0,35	0,44	0,39

Tabela 3. Delež vzorcev živil, pozitivnih na posameznega povzročitelja zoonoz v Sloveniji v obdobju 2008–2010 (12, 16, 17). VTEC – verotoksigena *Escherichia coli*.

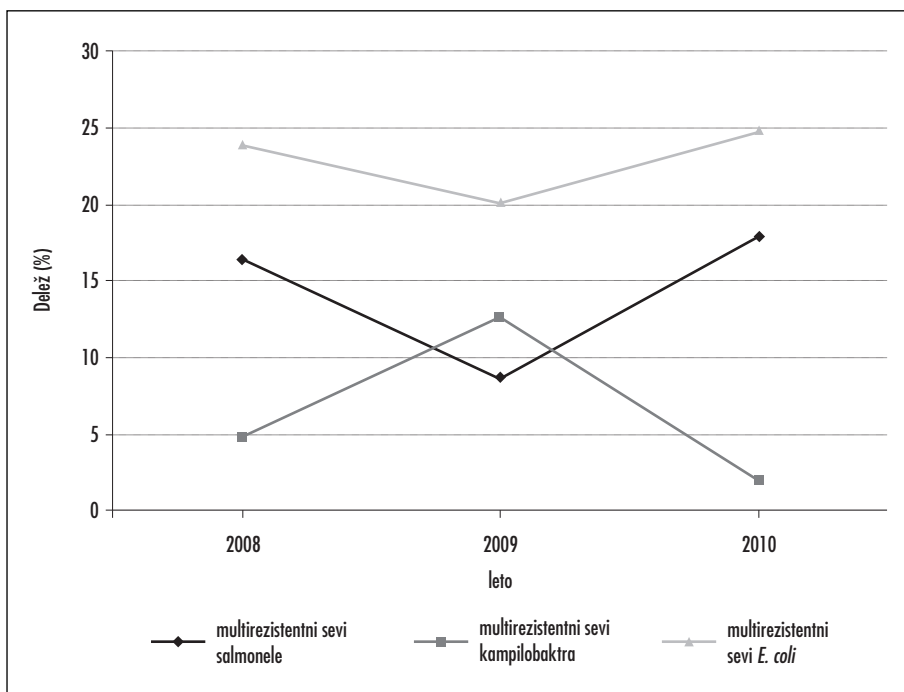
Spremljanje povzročiteljev zoonoz v živilih (aktivno spremljanje)	2008	2009	2010
<i>Listeria monocytogenes</i> – število vzorcev	1.128	1.100	917
število pozitivnih vzorcev	26	65	46
<i>Listeria monocytogenes</i> % pozitivnih	2,3	5,9	5
Trihineloza – število vzorcev	388.217	298.275	293.838
število pozitivnih vzorcev	1	1	2
trihineloza % pozitivnih	0	0	0
Ehinokokoza – število vzorcev	529.483	431.421	428.473
število pozitivnih vzorcev	22	10	10
ehinokokoza % pozitivnih	0	0	0
VTEC – število vzorcev	265	100	0
število pozitivnih vzorcev	1	0	0
VTEC % pozitivnih	0,4	0	0

Tabela 4. Delež pozitivnih vzorcev (serologija, drugi matriksi) pri živalih v Sloveniji v obdobju 2008–2010 (12, 16, 17). VTEC – verotoksigena *Escherichia coli*.

Spremljanje povzročiteljev zoonoz pri živalih (aktivno spremljanje)	2008	2009	2010
VTEC pri živalih (aktivno spremljanje) – število vzorcev	358	106	229
število pozitivnih vzorcev	7	1	3
VTEC % pozitivnih	1,8	0,9	2,3
jersinija (<i>Y. enterocolitica</i>) pri živalih (aktivno spremljanje) – število vzorcev	384	131	0
število pozitivnih vzorcev	74	26	0
% pozitivnih	19	19,8	0
Q-mrzlica (<i>Coxiella burnetii</i>) pri govedu (aktivno spremljanje) – število vzorcev	1.305	415	0
število pozitivnih vzorcev	59	17	0
% pozitivnih	4,5	4,1	0
Q-mrzlica (<i>Coxiella burnetii</i>) pri drobnici (aktivno spremljanje) – število vzorcev	4.817	4.669	0
število pozitivnih vzorcev	53	151	0
% pozitivnih	1,1	3,3	0



Slika 3. Trendi gibanja incidence okužb ljudi z drugimi povzročitelji zoonoz v obdobju 2008–2010 (12, 14, 15). VTEC – verotoksigena *Escherichia coli*.



Slika 4. Trendi gibanja deleža večkratno odpornih (multirezistentnih) sevov bakterij, zajetih v spremljanje zoonoz in njihovih povzročiteljev v obdobju 2008–2010 (12).

Tabela 5. Število primerov listerioze pri govedu in drobnici v obdobju 2008–2010 (12, 16, 17).

Število prijavljenih primerov listerioze živali (pasivno spremljanje)	2008	2009	2010
govedo	6	6	3
drobnica	14	6	3

primerljivo stanju na nivoju EU, kjer se kaže trend povečevanja števila večkratno odpor-
nih izolatov salmonelle (12).

RAZPRAVA

Tuberkuloza

Podatki o gibanju okužb pri ljudeh kažejo raz-
meroma ugodno stanje. Za *M. bovis* in *M. ca-
prae* zbolevalo ljudje, govedo, ovce ter občasno
koze in srnjad (12). Slovenija ima status
države, uradno proste bruceloze in tuberku-
loze goveda, ki pomeni osnovo za trgovanje.
Prvega je pridobila leta 2007, slednjega pa
2009. V izkoreninjenje je bilo vložena veli-
ko dela in sredstev. Za vzdrževanje statusa
države, uradno proste tuberkuloze, je bilo tre-
ba v treh letih po pridobitvi statusa pregle-
dati vse živali, starejše od 6 tednov. Zadnji
primer, ko je bila izolirana *M. bovis*, je bil potr-
jen leta 1990, en primer pozitivne reakcije
živali v tuberkulinizaciji je bil leta 2001 (12).

Tuberkuloza zaradi *M. bovis* ali *M. caprae*
je zelo redko prijavljena zoonoza v Sloveniji
(3 primeri od 2000). Za *M. tuberculosis* smo
edini rezervoar ljudje, zato okužba z *M. tuber-
culosis* ni zoonoza. V letu 2010 je bilo 56 % pri-
merov okužbe s *M. tuberculosis* avtohtonih,
preostanek pa uvoženih (12).

Salmonela

V živilih je stanje glede salmonelle ugodno, saj
je bilo v letu 2010 od 1.799 vzorcev živil ne-
skladje ugotovljeno le pri 0,1 % vzorcev (*Salmo-
nella infantis*). V odraslih jatah kokoši nesnic
se prisotnost serovara Enteritidis znižuje in
znaša v letu 2010 le 0,5 %, medtem ko prisot-
nosti serovara Typhimurium pri nesnicah
v zadnjih šestih letih ne beležimo.

Prevalenca salmonelle pri perutnini se je
v letu 2010 gibala med 1 % (pitovni piščanci)
in 4 % (odrasle nesnice). Rezultati so ugod-
ni predvsem zaradi izvajanja Nacionalnega
programa za zmanjšanje razširjenosti salmo-

nel pri kokoših nesnicah, pitovnih piščancih
in puranih.

Kampilobakter

Okužba s kampilobaktrom ostaja v RS najpo-
gosteje prijavljena zoonoza, istočasno pa je
opazen upad incidence salmoneloze (8, 12).
Stanje v Sloveniji je primerljivo s stanjem po
Evropi, kjer je kampilobakterioza med najpo-
gosteje sporočenimi okužbami prebavil in pri-
sotna v vseh državah članicah (7). Podatki za
letu 2010 kažejo, da je 79 % mesa pitovnih
piščancev pozitivnih na prisotnost kampilo-
baktra (večinoma *C. jejuni*) (12). Kar v 93 %
vzorcev kože in 88 % vzorcev fecesa pitovnih
piščancev je bil dokazan kampilobakter. To
dejstvo kaže na to, da je perutninska prebav-
na cev rezervoar okužbe in da je tehnologija
klanja teh živali bistven dejavnik prisotnosti
kampilobaktra v mesu. Po drugi strani pa hiter
način življenja, z uživanjem več hitro ali na
pol pripravljene hrane, ki ni zadosti pečena,
tudi poveča tveganje za okužbo. Ne nazadnje
je pri načinu priprave hrane nadvse pomemb-
na higiena in preprečevanje križanja čistih in
nečistih postopkov (navzkrižna kontaminacija).

Verotoksigena *Escherichia coli*

Rezultati štiriletne presečne študije v sklopu
nacionalnega spremljanja VTEC kažejo na to,
da je statistično značilno večje število obole-
lih ljudi jeseni, in kljub nizki izračunani inci-
denčni stopnji okužbe v Sloveniji so najpogo-
stejša starostna skupina obolelih otroci (13).
Rezultati 1.720 vzorcev fecesa goveda in ovac
ter mesa goveda kažejo relativno nizko preva-
lenco VTEC, 1,7 % (95 % interval zaupanja od
1,2 % do 2,4 %). Glede na rezultate te študi-
je je bilo tudi ugotovljeno, da je vzorčenje živil
na prisotnost VTEC treba razširiti na seroti-
pe VTEC, ki so pri okužbah ljudi v Sloveniji
najpogostejši. V ta namen je bilo v letu 2010
testiranje pri živalih razširjeno z ene na pet

seroskupin (poleg O157, še O26, O103, O145 in O111).

Listerioza

Listerioza je pri okužbah ljudi v porastu, vendar je največkrat nemogoče določiti vir okužbe. Podobno je v porastu tudi prisotnost *L. monocytogenes* v živilih, sploh tistih, ki so daljši čas skladiščena v hladilnikih oziroma so izpostavljena naknadni kontaminaciji (mesni izdelki in solate za neposredno uživanje, prekajane ribe itd.), medtem pa rezultati pasivnega spremljanja boleznih pri živalih kažejo, da je listerioza zelo redka. Za boljše raziskavo stanja pri okužbah ljudi bi bilo smiselno vključiti aktivno spremljanje (sistematično diagnostiko) rizičnih skupin ljudi.

Bruceloza

Slovenija ima status države, proste bruceloze ovac (*B. melitensis*), od leta 2005, status države, proste goveje bruceloze, pa ima od leta 2007. Pri živalih se je v letih 2008–2010 izvajal aktiven program spremljanja za vzdrževanje teh statusov, neskladnih rezultatov ni bilo (12).

Protimikrobna odpornost

Zaskrbljujoč je delež večkratno odpornih bakterij, predvsem *E. coli*, saj rezultati spremljanja protimikrobne odpornosti kažejo, da največji delež (več kot petina) večkratno odpornih sevov predstavlja *E. coli*. Pravilna in preudarna uporaba antibiotikov v rejah živali je bistvenega pomena pri preprečevanju pojava odpornosti proti protimikrobnim zdravilom pri živalih in posledično za preprečevanje prenosa odpornih genov na patogene bakterije, ki predstavljajo nevarnost za javno zdravje (12).

POMANJKLJIVOSTI IN PREDNOSTI DRŽAVNEGA PROGRAMA SPREMLJANJA ZOONOZ

Slabosti

Največjo slabost sistema predstavlja način zbiranja podatkov. Zbiranje podatkov v humani medicini bi moralo potekati v čim večji meri

na aktiven način (z vidika populacije in ne z individualnega vidika), kjer bi bila potrebna usmerjena diagnostika tarčnih skupin ljudi. Nadalje predstavlja težavo dejstvo, da nimamo enotnega informacijskega programa spremljanja zoonoz, ki bi podal kvalitetne podatke, potrebne pri odločanju glede morebitnih ukrepov. In ne nazadnje se tudi pri državnem programu spremljanja zoonoz srečujemo s težavami kadrovske in finančne narave.

Prednosti

Trenutno vzpostavljeni sistem nam omogoča celovit pregled nad stanjem na področju zoonoz, saj so pri spremljanju v uporabi različne tehnike. Te zajemajo vizualni pregled zaklane ali uplenjene živali in vzorčenje različnih tkiv oziroma živil z laboratorijsko diagnostiko. Način vzorčenja v živilih je prilagodljiv, in kadar določen tip živil kot npr. živila za neposredno uživanje predstavlja neraziskano tveganje, se vzorčenje usmeri v ta del. V ta namen smo na področju vzorčenja VTEC najprej večletno spremljali povzročitelja v mesu in fecesu dovzetnih živali, nato pa smo se preusmerili bližje potrošniku in zajeli večletno spremljanje v maloprodaji, delikatesah, trgovnicah in mlekomatih.

Državni sistem spremljanja je fleksibilen in v pričetku leta – ob pripravi programa za tekoče leto – sposoben hitre vključitve spremljanja novih zoonoz na državnem nivoju. Omogoča tudi večletno spremljanje določenih pomembnejših povzročiteljev in ob zadostnem zbiranju podatkov ponovno oceno stanja in določitev strateških ciljev spremljanja zoonoz na državnem nivoju.

ZAKLJUČEK

Kot kažejo rezultati, je v prihodnje pričakovati, da bo na področju zoonoz največje delo za strokovnjake humane in veterinarske medicine predstavljal boj za obvladovanje protimikrobne odpornosti in okužb s kampilobakterom. Za učinkovito upravljanje s tveganji, ki jih zoonoze lahko predstavljajo za zdravje človeka, je nujna dobra komunikacija med humano in veterinarsko stroko. Sprejemanje odločitev mora potekati po načelu z dokazi podprte medicine (angl. *evidence based medicine*),

katerega osnova je dober zajem kakovostnih podatkov iz državnega programa spremljanja zoonoz. Tako lahko na neodvisen, objektivni in pregleden način obdelamo in posredujemo podatke ter upravljamo s tveganji, ki jih

živali in hrana lahko predstavljajo za javno zdravje, katerega končni namen je zmanjševanje tveganja za javno zdravje do sprejemljive ravni.

LITERATURA

1. Stefančič A. Začetek in razvoj veterinarstva na Slovenskem do prve svetovne vojne. Ljubljana: Slovenska Akademija Znanosti in Umetnosti; 1966.
2. Šega J. Pasja steklina v Škofji Loki leta 1892. Loški razgledi [internet]. 1990 [citirano 2012 Jun 18]; 37: 79–85. Dosegljivo na: <http://www.dlib.si/details/URN:NBN:SI:DOC-G8FHDTI0?query=%27keywords%3d%C5%A1ega+steklina%27&pageSize=25>
3. Program varstva prebivalstva pred zoonozami v obdobju 1985–1990. Pravna ureditev veterinarstva. Zbirka predpisov. Ljubljana: Republiška veterinarska uprava; 1989.
4. Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2012 [internet]. Ljubljana; 2012 [citirano 2012 Apr 16]. Dosegljivo na: http://www.vurs.gov.si/fileadmin/vurs.gov.si/pageuploads/PDF/EPI/Nova_6/Program_monitoringa_zoonoz_2012.pdf
5. Direktiva 2003/99/ES Evropskega parlamenta in sveta z dne 17. novembra 2003 o spremljanju zoonoz in povzročiteljev zoonoz, ki spreminja odločbo sveta 90/424/EGS in razveljavlja Direktivo Sveta 92/117/EGS [internet]. [citirano 2012 Jun 18]. Dosegljivo na: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2003L0099:20070101:SL:PDF>
6. Pravilnik o monitoringu zoonoz in povzročiteljev zoonoz 2004. Uradni list RS št. 67/2004.
7. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2009. EFSA Journal. 2011; 9 (3): 2090.
8. Kraigher A, Sočan M, Klavs I, et al., eds. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezní v Sloveniji v letu 2010 [internet]. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja; 2011 [citirano 2012 Jun 18]. Dosegljivo na: http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5&_5_Filename=4112.pdf&_5_MediaId=4112&_5_AutoResize=false&p=105-5.3
9. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report. Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data [internet]. Stockholm: ECDC; 2011 [citirano 2012 Jun 18]. Dosegljivo na: http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111_SUR_Annual_Epidemiological_Report_on_Communicable_Diseases_in_Europe.pdf
10. Ammon A, Makela P. Integrated data collection on zoonoses in the European Union, from animals to humans, and the analyses of the data. Int J Food Microbiol. 2010; 139 Suppl 1: S43–7.
11. Uredba (ES) št. 178/2002 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 28. januarja 2002 o določitvi splošnih načel in zahtevah živilske zakonodaje, ustanovitvi evropske agencije za varnost hrane in postopkih, ki zadevajo varnost hrane [internet]. [citirano 2012 Jun 18]. Dosegljivo na: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002R0178:20080325:SL:PDF>
12. Veterinarska uprava Republike Slovenije. Letno poročilo o zoonozah in povzročiteljih zoonoz v Sloveniji v letu 2010 [internet]. Ljubljana: VURS; 2010 [citirano 2012 Jun 18]. Dosegljivo na: <http://www.vurs.gov.si/fileadmin/vurs.gov.si/pageuploads/PDF/zoonoze/LPzoonoze2010.pdf>
13. Hladnik Trček K. Impact of verotoxigenic E. coli from animals on health of population in Slovenia [magistrsko delo]. Edinburgh: University of Edinburgh; 2010.
14. Statistični urad Republike Slovenije. Statistične informacije, Prebivalstvo Slovenije 30. 6. 2008 [internet]. Ljubljana: SURS; 2008 [citirano 2012 Jun 19]. Dosegljivo na: <http://www.stat.si/doc/statinf/05-si-007-0803.pdf>
15. Statistični urad Republike Slovenije. Statistične informacije, Prebivalstvo Slovenije 30. 6. 2009 [internet]. Ljubljana: SURS; 2009 [citirano 2012 Jun 18]. Dosegljivo na: <http://www.stat.si/doc/statinf/05-si-007-0902.pdf>
16. Veterinarska uprava Republike Slovenije. Letno poročilo o zoonozah in povzročiteljih zoonoz v Sloveniji v letu 2009 [internet]. Ljubljana: VURS; 2009 [citirano 2012 Jun 18]. Dosegljivo na: http://www.vurs.gov.si/fileadmin/vurs.gov.si/pageuploads/PDF/MANCP/Letno_porocilo_Slovenija-2009.pdf
17. Veterinarska uprava Republike Slovenije. Letno poročilo o zoonozah in povzročiteljih zoonoz v Sloveniji v letu 2008 [internet]. Ljubljana: VURS; 2008 [citirano 2012 Jun 18]. Dosegljivo na: http://www.vurs.gov.si/fileadmin/vurs.gov.si/pageuploads/PDF/zoonoze/Letno_porocilo_o_zoonozah_2008.pdf

Alenka Kraigher¹

Pomen spremljanja in obvladovanja zoonoz

The Importance of Monitoring and Controlling Zoonoses

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: zoonoze, monitoring, epidemiološko spremljanje, obvladovanje

Ni mogoče prezreti, da imajo zoonoze z vidika bremena bolezni za prebivalstvo in tudi državo velik pomen. Zoonoze povzročajo več kot polovica vseh znanih povzročiteljev nalezljivih bolezni in kar tri četrtine povzročiteljev porajajočih se bolezni. Na pojav porajajočih se zoonoz vplivajo številni dejavniki, od mikrobiološke značilnosti povzročiteljev in lastnosti gostiteljev do ekoloških in podnebnih dejavnikov. Dobri nacionalni opazovalni sistemi na področju javnega zdravja pripomorejo k delovanju globalne mreže za epidemiološko spremljanje in obvladovanje zoonoz po vsem svetu in k pravočasnemu zaznavanju nevarnosti za zdravje. Sistem epidemiološkega spremljanja in obvladovanja zoonoz naj bi zadostil zahtevi po zgodnjem zaznavanju, oceni tveganja za javno zdravje in usklajenem odzivanju s protiepidemijskimi ukrepi. Veterinarska in zdravstvena stroka v Sloveniji zagotavlja zbiranje podatkov, na podlagi katerih se opredeli izpostavljenost in nevarnost za zdravje zaradi zoonoz ter izdelava oceno stanja, na podlagi te pa so sprejeti preventivni programi in načrt monitoringa zoonoz. V prihodnje bo treba še izboljšati jedrne kapacitete v veterinarstvu in javnem zdravju, zagotoviti standardizacijo ocenjevanja tveganja ter izboljšati večšine komuniciranja. Nujno bo treba sistem podpreti z informacijskimi rešitvami in zadostnim ter stabilnim financiranjem. Spoznanja, da so zoonoze velikega pomena za javno zdravje, narekujejo izboljšanje interdisciplinarnega pristopa z učinkovitim mreženjem pri zaznavanju obstoječih in porajajočih se zoonoz. Pomemben je monitoring in z dokazi podprto ocenjevanje tveganja ter krepitev usposobljenosti za obvladovanje groženj, ki jih zoonoze predstavljajo.

ABSTRACT

KEY WORDS: zoonoses, monitoring, epidemiological surveillance, control

Zoonotic diseases have a great impact on the population and the economy of each country. More than half of all known infectious agents are zoonoses and three quarters of known agents cause the emergence of infectious diseases. The emerging zoonosis occurrence is affected by many factors – from microbial agents' characteristics and properties of the host to environmental and climatic factors. Good national surveillance systems in the field of public health contribute to the functioning of the global network for epidemiological surveillance and zoonosis control worldwide as well as early detection of health threats. The system of epidemiological surveillance and control of zoonoses should satisfy the requirement for early detection, risk assessment for public health and coordinated response. Veterinary and medical professions in Slovenia provide data collection to define the exposure and health risks and provide risk assessments in order to implement preventive programs and monitoring of zoonoses. In the future it will be necessary to further improve core capacity in the veterinary and public health, ensure risk assessment standardization and improve risk management and com-

¹ Prim. doc. dr. Alenka Kraigher, dr. med., Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Trubarjeva ulica 2, 1000 Ljubljana; alenka.kraigher@ivz-rs.si

munication skills. Information technology is as necessary as adequate and stable financing. Zoonoses are of great importance in the field of public health and require an interdisciplinary approach with effective networking to access information on evidence-based risk assessment and the strengthening of capacities to manage the threats they pose.

UVOD

Zoonoze so nalezljive bolezni, ki se širijo med ljudmi in živalmi ter se neposredno s stikom z živalmi ali posredno z vektorji, zlasti klopi in komarji, prenašajo z živali na ljudi ali z ljudi na živali. Posreden je zlasti prenos z zaužitjem kontaminirane hrane ali vode ter stik s kontaminiranimi živalskimi predmeti (koža, ščetine). Beseda zoonoza (*zoonosis*) je grškega izvora, sestavljena iz besed *zoon* – 'žival' in *nosos* – 'bolezen' in končnice *-is*, kar pomeni značilen, tipičen. Antroponoze imenujemo bolezni, ki se prenašajo samo med ljudmi. Številne zoonoze resno ogrožajo zdravje prebivalstva. Med njimi ima velik pomen gripa s svojim pandemskim potencialom ter antraks, bruceloza, tularemija, vročica Q, dodatno zaradi grožnje z bioterorizmom, in druge zoonoze, ki so povezane z načinom dela, življenja, bivanja ali prehranjevanja (1). Med pomembne zoonoze, ki jih je treba obvezno prijavljati, spadajo antraks, bruceloza, cisticerkoza, ehinokokoza, hemoragična mrzlica z renalnim sindromom, kampilobakterioza, kuga, leptospiroza, listerioza, mikrosporija, psitakoza, salmoneloza, steklina, toksoplazmoza, trihineloza, tuberkuloza, tularemija in vročica Q.

Dejavniki, ki dodatno povečujejo tveganje zaradi poznanih zoonoz in porajajočih se zoonoz, so prost pretok ljudi in blaga, naraščajoča potovanja, mednarodna trgovina z živalmi, podnebne spremembe, gosta naseljenost in poseganje človeške in živalske populacije na prej divje habitate ter tesen vsakodnevni stik ljudi in živali po vsem svetu. Najbolj ogroženi so ljudje, ki preživijo več časa na prostem zaradi dela ali rekreacije (2–4). Nevarnost okužbe je mogoče zmanjšati z ustrezno uporabo osebne varovalne opreme, cepljenja in ukrepi za preprečevanje ugrizov živali in pikov žuželk.

EPIDEMIOLOŠKO SPREMLJANJE

Sistem epidemiološkega spremljanja in obvladovanja zoonoz mora zagotoviti podatke o boleznih in njihovih povzročiteljih, omogočiti zaznavanje kopičenja primerov, izbruhov in epidemij ter omogočiti opazovanje trendov in ocenjevanje učinkovitosti programov njihovega preprečevanja in obvladovanja. Zagotoviti mora prepoznavanje povzročiteljev, poti širjenja, vektorjev in rezervoarjev ter zaznavanje spreminjanja epidemioloških vzorcev pojavljanja in širjenja. Delujoč sistem spremljanja in obvladovanja zoonoz je nujno potreben za pravočasno zaznavanje in naglo ukrepanje, obenem pa je ključnega pomena za postavitev prednostnih nalog, načrtovanje in zagotavljanje potrebnih kadrovskih in finančnih virov (5).

Omenjene naloge so možne, če sistem vključuje vse deležnike in ga podpirajo ključne funkcije, kot so standardne definicije, izobraževanje/izpopolnjevanje, kontrola kakovosti z izboljšavami, vzpostavljena usmerjena mikrobiološka diagnostika, vzpostavljene komunikacije, upravljanje z viri in nenehno komuniciranje z javnostmi z namenom ozaveščanja prebivalstva. Pred več desetletji vzpostavljeno epidemiološko spremljanje in obvladovanje nekaterih zoonoz v Sloveniji omogoča zbiranje podatkov, obenem pa tudi opazovanje epidemioloških značilnosti bolezni na celotnem območju države za sprejemanje odločitev o potrebnih ukrepih in oblikovanje strategije obvladovanja oziroma odpravljanja teh bolezni.

Zelo pomembna komponenta nacionalnega sistema spremljanja in obvladovanja zoonoz je interdisciplinirana in medresorska postavitev ciljev in prioritet glede na kriterije, kot so možnosti za nastanek izbruhov, vpliv na morbiditeto, mortaliteto, težke posledice, okvare/invalidnost, možnost vzpostavitve

programov za njihovo obvladovanje, eliminacijo ali eradikacijo (6).

Sistem monitoringa in zbiranja podatkov o zoonozah v Evropski uniji (EU) sloni na direktivi, ki nalaga državam članicam zbiranje podatkov o zoonozah, njihovih povzročiteljih, protimikrobni rezistenci in izbruhih, povezanih s hrano (7, 8). Odločba o vzpostavitvi epidemiološkega spremljanja in obvladovanja nalezljivih bolezni v EU pa narekuje zbiranje podatkov o zoonozah pri ljudeh (9).

V Sloveniji je po Zakonu o nalezljivih boleznih za zoonoze, vključno z okužbami s hrano, predpisana obvezna prijava in medsebojno obveščanje med zdravstveno in veterinarsko službo (10). Prijava bolnikov poteka na osnovi Pravilnika o prijavi nalezljivih bolezni, kjer so zoonoze razvrščene v dve skupini glede na nujnost pravočasnega ukrepanja (11). Zdravnik mora bolezen prijaviti območnemu zavodu za zdravstveno varstvo, ta pa mora obvestiti Center za nalezljive bolezni in okoljska tveganja Inštituta za varovanje zdravja. Mikrobiološki laboratorij mora v 24 urah ugotovitve laboratorijskih preiskav sporočiti območnemu zavodu za zdravstveno varstvo. V sistem obveščanja sta vključena tudi Zdravstveni inšpektorat Republike Slovenije (RS) in Veterinarska uprava RS, ki po prejemu ugotovljenega pozitivnega rezultata analize živila živalskega izvora ustrezno ukrepata in obvestita tudi druge države preko evropskega hitrega sistema obveščanja o hrani in krmi (angl. *rapid alert system for food and feed*, RASFF).

POJAVNOST ZOOZ

Pojavnost mnogih zoonoz in še zlasti črevesnih nalezljivih bolezni je najverjetneje podcenjena (12). Klinične slike zoonoz so raznolike, verjetnost, da bolnik poišče zdravniško pomoč in da je bolezen nato uradno prijavljena, pa narašča s težo klinične slike. V poročilih Evropske agencije za varnost hrane (angl. *European food safety authority*, EFSA) so zbrani podatki o spremljanju najpogostejših zoonoz v državah članicah EU. Število zbolelih za jersiniozo, listeriozo in vročico Q v EU v zadnjih letih upada. V večini držav EU je tudi incidenca humanih salmoneloz po letu 2009 začela upadati. Za salmonele, ki pov-

zročajo sporadične okužbe, izbruhe in epidemije, so rezervoar številne domače in divje živali, pa tudi človek. Pomemben dejavnik tveganja za okužbo s salmonelo je uživanje kontaminiranih živil, zlasti perutnine in jajc (13). Število prijav salmoneloz v Sloveniji je bilo med najvišjimi v letih 2002–2004 (12).

Po letu 2009 je v EU najbolj pogosta črevesna zoonoza kampilobakterioza. Pri nas po večini za kampilobakteriozo zbolijo otroci. Izbruhov gastroenterokolitov, povzročenih s kampilobaktrom, v zadnjih letih pri nas nismo zaznali. Med najpomembnejšimi vzroki za okužbo je uživanje toplotno slabo obdelanega piščančjega mesa (12).

Število zbolelih za verotoksigeno *Escherichia coli*, zlasti sero skupine O157 v povezavi z uživanjem teletine in govedine, je v EU v porastu od leta 2008. Od leta 2010 je opazen rahel trend povečanja primerov stekline pri domačih in prostoživečih živalih v baltških državah in nekaterih drugih državah članicah v vzhodni in južni Evropi.

Izbruhe zoonoz v EU v največji meri povzročijo salmonele, kampilobakter in bakterijski toksini. Najpomembnejši viri okužbe v izbruhih so jajca, jajčni izdelki, termično neobdelana zelenjava in druga hrana (13).

Med prijavljivimi zoonozami v Sloveniji so tudi: leptospiroza s povprečno letno incidenčno stopnjo 0,39/100.000 prebivalcev v zadnjih 10 letih, ehinokokoza s povprečno letno incidenčno stopnjo 0,20/100.000 prebivalcev v zadnjih 10 letih, tularemija s povprečno letno incidenčno stopnjo 0,04/100.000 prebivalcev v zadnjih 10 letih ter vročica Q s posameznimi primeri vsako leto.

Med porajajočimi se zoonozami največ pozornosti namenjajo aviarni influenci, bovine spongiformni encefalopatiji (BSE), virusu Nipah in virusu zahodnega Nila. Nekaterim zoonozam (bruceloza, pasja steklina in trakuļjavost), ki se pojavljajo le na posameznih predelih Evrope, se namenja precej manj pozornosti (14).

ZAKLJUČEK

Sistem spremljanja in obvladovanja zoonoz zaenkrat niti pri nas niti v EU ni povsem zadovoljiv. Da bi ocenili učinkovitost sistema in njegove pomanjkljivosti, bo potrebna evalvacija,

ki bo dala odgovore o pokritosti, fleksibilnosti, sprejemljivosti, pravočasnosti in popolnosti.

Zaradi prostega pretoka ljudi, storitev in blaga v EU pomenijo zlasti zoonoze, ki se prenašajo s hrano največjo nevarnost za zdravje ljudi, še posebej zaradi novih povzročiteljev bolezni. Zaradi tega se jih ne more obravnavati le kot nacionalni problem, ampak širše. Zato se pojavljajo pozivi, naj se sprejmejo učinkoviti ukrepi na nacionalni ravni in izvede njihovo usklajevanje na evropski ravni. Potrebna je integracija javnega zdravja in politike zdravstvenega varstva živali na področju spremljanja bolezni, zgodnjega zaznavanja in opozarjanja ter naglega odzivanja in sistematičnega obvladovanja.

Nenehne nevarnosti za zdravje ljudi zaradi novih povzročiteljev bolezni narekujejo celovito strategijo in usklajen načrt vseh držav članic s celovitim pogledom na obseg in stopnjo nevarnosti za zdravje. Dobro okolje za zagotavljanje povezanosti pri izvajanju načrta predstavlja sinergistično delovanje agencij Evropske agencije za varnost hrane, Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni in Evropske agencije za okolje.

Za obvladovanje zoonoz je potreben integriran pristop, temelječ na oceni tveganja z medsektorskim sodelovanjem in povezovanjem laboratorijev (15). Izjemnega pomena je proaktivno obveščanje splošne javnosti.

Smotrno bi bilo usklajeno raziskovanje med državami, katerih cilj bi bilo reševanje izzivov, ki jih javnemu zdravju postavljajo vprašanja na področju ocenjevanja tveganja, spremljanja, preprečevanja in obvladovanja zoonoz. Zoonoze bi bilo treba oceniti z vidika celostnega vpliva okolja na zdravje, saj so

trenutno preslabo prepoznane ekološke in socialne determinante, na osnovi katerih bi bilo mogoče okrepiti interdisciplinarnost in pravičnost na področju javnega zdravja (16).

Okrepiti bi bilo treba sodelovanje z mednarodnimi in medvladnimi organizacijami, zlasti Svetovno zdravstveno organizacijo, Svetovno organizacijo za prehrano in kmetijstvo in Svetovno organizacijo za zdravje živali, da bi se zagotovilo učinkovito mednarodno usklajevanje na področju odkrivanja epidemioloških značilnosti povzročiteljev zoonoz in pri krepitvi zmogljivosti držav pri izkoreninjenju zoonoz pri živalih. Aktivnejše vključevanje mikrobioloških laboratorijev, tako medicinskih kot veterinarskih, ob sumu na izbruh oziroma epidemijo in tudi ob sporadičnem pojavu bolezni mora biti ena izmed prioritet, saj so javnozdravstveni laboratoriji nepogrešljiva podpora epidemiološkemu preučevanju nalezljivih bolezni in v pomoč pri odločanju ter načrtovanju ukrepov za obvladovanje ter ne nazadnje tudi objektivni pokazatelj uspešnosti veterinarske in zdravstvene službe (17).

Ni mogoče prezreti, da imajo zoonoze z vidika bremena bolezni za prebivalstvo in državo velik pomen. V prihodnje bo treba še izboljšati jedrne kapacitete v veterinarstvu in javnem zdravju in zagotoviti standardizacijo ocenjevanja tveganja ter izboljšati upravljanje in večšine komuniciranja. Nujno bo treba podpreti sistem z informacijskimi rešitvami in zadostnim ter stabilnim financiranjem. Spoznanja, da so zoonoze velikega pomena za javno zdravje, narekujejo izboljšanje monitoringa pri zaznavanju poznanih in porajajočih se zoonoz ter krepitev usposobljenosti za naglo odzivanje na tveganja, ki jih zoonoze predstavljajo.

LITERATURA

1. Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001; 356 (1411): 983-9.
2. Cleaveland S, Laurenson MK, Taylor LH. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001; 356 (1411): 991-9.
3. Epp T, Waldner C. Occupational health hazards in veterinary medicine: Zoonoses and other biological hazards. *Can Vet J.* 2012; 53 (2): 144-50.
4. Weber DJ, Rutala WA. Zoonotic infections. *Occup Med.* 1999; 14 (2): 247-84.

5. Merianos A. Surveillance and response to disease emergence. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2007; 315: 477–509.
6. Childs JE. Pre-spillover prevention of emerging zoonotic diseases: what are the targets and what are the tools? *Curr Top Microbiol Immunol.* 2007; 315: 389–443.
7. Direktiva 2003/99/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 17. novembra 2003 o spremljanju zoonoz in povzročiteljev zoonoz.
8. Uredba 2160/2003 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 17. novembra 2003 o nadzoru salmonele in drugih opredeljenih povzročiteljih zoonoz, ki se prenašajo z živili.
9. Odločba 2119/98/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 24. septembra 1998 o vzpostavitvi mreže za epidemiološko spremljanje in obvladovanje nalezljivih bolezni v Skupnosti.
10. Zakon o nalezljivih boleznih. Uradni list RS št. 69/95.
11. Pravilnik o prijavi nalezljivih bolezni. Uradni list RS št. 16/99.
12. Grilc E, Praprotnik M, Trkov M. Črevesne nalezljive bolezni in zoonoze [internet]. In: Kraigher A, Sočan M, Klavs I, et al., eds. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v letu 2010. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja; 2011 [citirano 2012 Aug 7]. Dosegljivo na: http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5&_5_Filename=4112.pdf&_5_MediaId=4112&_5_AutoResize=false&pl=105-5.3
13. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal* [internet]. 2012 [citirano 2012 Aug 7]; 10 (3): 2597. Dosegljivo na: www.efsa.europa.eu/efsajournal
14. Kahn LH. Confronting zoonoses, linking human and veterinary medicine. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12 (4): 556–61.
15. Zinsstag J, Schelling E, Wyss K, et al. Potential of cooperation between human and animal health to strengthen health systems. *Lancet.* 2005; 336 (9503): 1242–5.
16. Grace D, Gilbert J, Lapor ML, et al. Zoonotic emerging infectious disease in selected countries in Southeast Asia: insights from ecohealth. *Ecohealth.* 2011; 8 (1): 55–62.
17. Hoblet KM, McCabe AT, Heider L. Veterinarians in population health and public practice: meeting critical national needs. *J Vet Med Educ.* 2003; 30 (3): 287–94.

Peter Raspor¹, Mojca Jevšnik², Andrej Kirbiš³, Petra Raspor Lainšček⁴, Mateja Ambrožič⁵

Varnost živil med Scilo in Karibdo – med Evropsko agencijo za varnost hrane in potrošnikom

Food Safety between Scylla and Charybdis – between the European Food Safety Authority and the Consumer

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: varnost živil, kakovost živil, Evropska agencija za varnost hrane, izobraževanje, potrošnik

Varna hrana in živila ter varovanje interesov potrošnika je čedalje večja skrb javnosti, vladnih in nevladnih organizacij, strokovnih združenj in trgovskih organizacij. Za zakonodajo Evropske unije je značilen nov integriran pristop k urejanju varnosti hrane. Evropska agencija za varnost hrane je bila oblikovana kot del celovitega programa za izboljšanje varnosti živil v Uniji, zagotavljanje visoke ravni varstva potrošnikov ter ponovno vzpostavitev in ohranitev zaupanja v oskrbo s hrano. Vse dejavnosti agencije temeljijo na vrednotah, ki so osnovno vodilo njenega delovanja (znanstvena odličnost, neodvisnost, odprtost in preglednost, odzivnost, sodelovanje s članicami Evropske unije). Z delovanjem visoko kompetentnega kadra agencija zagotavlja oblikovanje strokovnih mnenj, podprtih z najsodobnejšimi znanstvenimi spoznanji in pristopi, čeprav je še kar nekaj prostora za izboljšanje. Standardi varnosti živil v Uniji so med najvišjimi v svetu, skrb za potrošnika je jasno izkazana in vključena v dejansko prakso v živilskoprehranski oskrbovalni verigi. Vendar potrošniki še vedno niso dovolj ozaveščeni in ne kažejo dovolj praktičnega interesa za obvladovanje varnosti živil v zadnjem delu živilskoprehranske oskrbovalne verige, zato jim tudi primanjkuje znanja in praktičnih veščin, kar bi moral rešiti izobraževalni sistem z novimi prijemi, primernimi za sedanjo stopnjo razvoja oskrbovalnih poti s hrano.

ABSTRACT

KEY WORDS: food safety, food quality, European Food Safety Authority, education, consumer

Safe food and consumer protection is a dominant concern of the public, governmental and non-governmental organizations, expert groups and trade organizations. European union (EU) food legislation is characterized by a new integrated approach to food safety. The European Food Safety Authority was established as part of a comprehensive programme for improving

¹ Prof. dr. Peter Raspor, ddr, H. c., Katedra za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana; peter.raspor@bf.uni-lj.si

² Doc. dr. Mojca Jevšnik, dipl. sanit. inž., Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana

³ Doc. dr. Andrej Kirbiš, dr. vet. med., Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, 1000 Ljubljana

⁴ Petra Raspor Lainšček, dr. vet. med., Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, 1000 Ljubljana

⁵ Asist. dr. Mateja Ambrožič, uni. dipl. inž. živil. teh., Katedra za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana

food safety in the Union, ensuring a high level of consumer protection and reviving consumer trust of European food supply systems. All activities of the Authority are based on values of excellence in science, independence, openness and transparency, responsiveness and cooperation with all EU members. The Authority's highly competent professionals ensure expert advice, based on most recent scientific findings and approaches. Nevertheless, there is still some room for improvement and strengthening the quality of their scientific work. The European food safety standards are among the highest in the world and consumer-oriented care is part of actual practice within the food supply chain. Unfortunately, consumer awareness is still underdeveloped. Consumers lack theoretical and practical knowledge as well as interest in food safety in the last segment of the food supply chain. This is an open challenge to be tackled through governmental activities and education practices in the current education system of both the European Union and Slovenia.

UVOD

Zagotavljanje varnih živil/hrane potrošniku je v obdobju globalizacije, spremenjenega načina življenja in prehranjevanja odgovornost in stalna naloga tako razvitih kot nerazvitih držav. Razumevanje pojmovanja varnosti živil je pojem, ki se razteza od tehnologije do zakonodaje in od prehranbenika do potrošnika živil (1). Prehranjevanje zunaj doma in uporaba (pol)pripravljene ali že pripravljene hrane narašča, kar ni posledica njene naraščajoče priljubljenosti med ljudmi, ampak je odziv na posebno konfiguracijo problemov pri časovni organizaciji vsakdanjega življenja (2-4). Zdravstveno ustrežna, varna hrana je temeljna pravica potrošnikov. Zagotavljanje le-te je najbolj problematično v enotah njene priprave in distribucije, še posebej v malih in srednje velikih podjetjih (3, 5, 6).

Varna hrana/živila in varovanje interesov potrošnika je čedalje večja skrb javnosti, (ne)vladnih organizacij, strokovnih združenj in trgovinskih organizacij ob primarni skrbi državnih organov. Zagotoviti je treba zaupanje potrošnikov do proizvajalcev in trgovcev z javnim in preglednim razvojem živilske zakonodaje in z zagotavljanjem obveščanja javnosti na primeren način s strani javnih oblasti, kadar obstaja utemeljen sum, da neko živilo lahko predstavlja tveganje za zdravje človeka. Evropska skupnost kot močan svetovni gospodarski subjekt v sektorju živil in krme je pristopila k mednarodnim trgovinskim sporazumom in s tem prispeva k razvo-

ju mednarodnih standardov, ki so temelj živilske zakonodaje. Evropska unija (EU) podpira načela proste trgovine z varno krmo in varnimi, kakovostnimi živili brez diskriminacije, po dobrih in etično neoporečnih trgovskih običajih. Cilj živilske zakonodaje je varovati interese potrošnikov in zagotoviti potrošnikom podlago za obveščeno izbiro v zvezi z živili, ki jih uživajo.

Vladne organizacije se ukvarjajo z ustvarjanjem pogojev, pravil, priporočil, imajo vlogo foruma in nudijo podporo vzdolž živilskoprehranske oskrbovalne verige. Na mednarodnem nivoju je njihova poglobljena funkcija iskanje minimalnih/optimalnih standardov, ki so še sprejemljivi za države članice, in s tem tudi neposredno vplivajo na EU in na Slovenijo. Razvoj varnosti hrane na območju EU je tesno povezan z normativno dejavnostjo Evropske komisije, Evropskega parlamenta in Evropskega sveta. Temeljni pravni akt na tem področju predstavlja Uredba ES 178/2002, ki podrobneje razčlenjuje in opredeljuje način izvajanja politike varne hrane s pomočjo Evropske agencije za varnost hrane (angl. *European food safety authority*, EFSA) in hitrega sistema obveščanja o nevarnih živilskih izdelkih (angl. *rapid alert system for food and feed*, RASFF). Nadaljnji razvoj je potekal v smeri številnih uredb in pravnih aktov, npr. uredba ES 882/2004, ki med drugim predstavlja normativno podlago za Urad za prehrano in veterinarstvo (angl. *Food and veterinary office*, FVO). Slovenija se je pridružila EU 1. maja leta 2004 in se s priključitvijo zavezala k har-

monizaciji evropskega prava na tem področju, kar je udeležila z implementacijo in neposredno uporabo teh predpisov v praksi. Pri izvrševanju so vključene naslednje vladne organizacije Republike Slovenije (RS), ki pa na žalost še vedno niso uredile slovenske agencije za varnost živil, čeprav so zgledi drugih držav Unije zelo jasni in vzpodbudni:

- Ministrstvo za kmetijstvo in okolje, pod katerim so sistematizirani Veterinarska uprava Republike Slovenije, Inštitut Republike Slovenije za kmetijstvo, gozdarstvo, hrano in okolje ter Fitosanitarna uprava Republike Slovenije, in
- Ministrstvo za zdravje, pod katerim je sistematiziran Zdravstveni inšpektorat Republike Slovenije.

Medtem ko imajo nacionalne »živilske« zakonodaje razmeroma dolgo tradicijo, je trenutna evropska živilska zakonodaja nastala kot posledica razvoja v zadnjih štiridesetih letih in odraža mešanico znanstvenih, družbenih, geografskih, političnih in gospodarskih vplivov. V obdobju nastajanja evropske živilske zakonodaje so nacionalne živilske zakonodaje imele različne politične poglede in cilje v zvezi s skupno kmetijsko politiko ali z razvojem notranjega trga. Zato so bile v preteklosti za živilsko zakonodajo na evropski ravni značilne razlike v pristopu, nekatere nedoslednosti in celo nekatere praznine (7).

V času zблиževanja so kot glavno vodilo upošteevane direktive EU, ki pa so za vsako državo članico EU, na katero so naslovljene, zavezujoče glede rezultata, ki ga je treba doseči, vendar prepuščajo državnim organom izbiro oblike in metode (249. člen Pogodbe o ustanovitvi Evropske skupnosti (ES)). V nasprotju z direktivami, namenjenimi državam članicam, in odločbami, ki imajo točno določene prejemnike, so uredbe namenjene vsem. Uredba dobi ob izdaji neposredno pravno veljavo v nacionalnih pravnih redih ter se uporabi v vseh državah članicah enako kot nacionalni zakon, in to brez vsakršnega posredovanja nacionalnih oblasti. Vsak nacionalni zakon, ki morebiti nasprotuje določbam uredbe, izgubi svojo pravno veljavo oziroma uredba nad njimi prevlada (8).

Pomembnost Uredbe ES 178/2002 je predvsem v uniformiranosti zakonodaje na celot-

nem območju ES, saj le na ta način zagotavljamo prost pretok varnih in kakovostnih živil ter visoko raven varovanja življenja in zdravja ljudi. Eden od ključnih ciljev Uredbe ES 178/2002 je vzpostavitev skupnih opredelitev, vključno z opredelitvijo živil, in določitev glavnih vodilnih načel in legitimnih ciljev živilske zakonodaje. Uredba ES 178/2002 usklajuje na ravni ES obstoječe nacionalne zahteve ter jih postavlja v skupni evropski okvir.

Z Uredbo ES 178/2002 je omogočen nastanek EFSA, ki zagotavlja neodvisne znanstvene nasvete glede vseh zadev, ki imajo posreden ali neposreden vpliv na varnost hrane – vključno z zdravjem in dobrobitjo živali ter varstvom rastlin. Agencija svetuje tudi na prehranskem področju v povezavi z zakonodajo ES. Javnost je obveščena na odprt in pregleden način o vseh zadevah v okviru svojih pristojnosti (7).

Za živilsko zakonodajo EU lahko trdimo, da predstavlja enega od obsežnejših sklopov pravnih pravil pravnega reda EU. Za zakonodajo EU je značilen nov »integriran« in celovit pristop k urejanju varnosti hrane.

Kot temeljna uredba splošnega živilske prava EU Uredba ES 178/2002 določa (9):

- splošna načela živilske zakonodaje (prost pretok živil, varstvo življenja in zdravja ljudi, varstvo interesov potrošnika, analiza tveganja, previdnostno načelo, načela preglednosti),
- zahteve živilske zakonodaje ES (prepoved dajanja v promet nevarnih živil, sledljivost živil v vseh fazah pridelave, predelave in distribucije, pristojnosti nosilcev živilske dejavnosti in nadzornih državnih organov, odgovornosti nosilca živilske dejavnosti),
- ustanovitev EFSA (cilje in naloge agencije, delovanje organov agencije, npr. neodvisnega znanstvenega odbora in svetov, postopke za prepoznavanje nepričakovanih tveganj in način podpore sistemu hitrega obveščanja) in
- postopke za vprašanja, ki neposredno ali posredno vplivajo na varnost živil in krme (npr. sistem hitrega obveščanja, način ukrepanja v nujnih primerih ter način obvladovanja kriznih razmer).

EVROPSKA AGENCIJA ZA VARNOST HRANE

Evropska agencija za varnost hrane je bila ustanovljena januarja 2002 po številnih krizah v živilskem sektorju konec devetdesetih let prejšnjega stoletja kot neodvisen znanstveni vir svetovanja in obvestil o tveganjih, povezanih z živilsko prehransko oskrbovalno verigo. Agencija je bila oblikovana kot del celovitega programa za izboljšanje varnosti živil v EU, zagotavljanje visoke ravni varstva potrošnikov ter ponovno vzpostavitev in ohranitev zaupanja v oskrbo s hrano (10).

V evropskem sistemu za varnost živil se ocena tveganja izvaja neodvisno od obvladovanja tveganja. Agencija kot organ, odgovoren za oceno tveganja, pripravlja znanstvena mnenja in nasvete, ki zagotavljajo trdno podlago za evropsko politiko in zakonodajo in ki podpirajo Evropsko komisijo, Evropski parlament in države članice EU pri sprejemanju učinkovitih in pravočasnih odločitev v zvezi z obvladovanjem tveganj. Področje delovanja EFSA je vezano na celotno Evropo in posredno na vse države, iz katerih se uvaža hrana v EU. Njena pristojnost je tako na področju varnosti krme, zdravja in zaščite živali, kakor tudi na področju zdravja in zaščite rastlin ter vseh živil. Vse dejavnosti agencije temeljijo na podlagi znanstvenih nasvetov in informacij. Agencija ne deluje v okvirih nobene vlade niti političnih sektorjev. Njen namen je delovati v korist javnega interesa in s tem zagotoviti zaščito in obveščenost evropskega potrošnika.

Intelektualno središče agencije sestavljajo visoko usposobljeni strokovnjaki iz vse Evrope, izbrani na podlagi dokazane znanstvene odličnosti. Znanstveni odbor pripravlja znanstvene nasvete, kakor tudi usklajene pristope pri oceni tveganja za živila in krmo. Njegova pomembna naloga je tudi priprava nasvetov o znanstvenem sodelovanju in povezovanju z znanstveniki in raziskovalnimi organizacijami, tako na nacionalni kot na mednarodni ravni. Znanstveni svet agencije mora po potrebi pri svojem delu vključevati zunanje sodelavce z ustreznim strokovnim znanjem in izkušnjami.

Medsebojno znanstveno sodelovanje podpira direktorat, ki upravlja projekte med drža-

vami članicami, zbira podatke o nastajajočih tveganjih in metodologiji ocenjevanja le-teh. Pri svojem delu vključuje strokovnjake iz držav članic in obravnava področja:

- zbiranja podatkov o boleznih živali, ki se lahko prenašajo na ljudi – zoonozah,
- zbiranja podatkov o ostankih pesticidov v živilih,
- pregledovanja ocen tveganja pri uporabi aktivnih sestavin pesticidov itd.

EFSA si prizadeva vsem strankam in potrošnikom zagotoviti pravočasna obvestila o varnosti živil in krme. V ta namen agencija:

- analizira odziv javnosti glede tveganj, ki so povezana s hrano,
- navaja okoliščine tveganja in jih pojasnjuje,
- sodeluje z nacionalnimi organi, interesnimi skupinami in sredstvi javnega obveščanja in
- Evropski komisiji in državam članicam EU zagotavlja doslednost in transparentnost z usklajevanjem obvestil.

Koncept in način dela v Evropski agenciji za varnost hrane

Znanstveni sveti EFSA ocenjujejo tveganja na naslednjih področjih (11):

- zdravje in zaščita živali,
- aditivi za živila in hranilni viri, dodani živilom,
- biološki dejavniki tveganja,
- snovi v stiku z živilom, encimi, arome in pomožna tehnološka sredstva,
- onesnaževala v živilski verigi,
- dodatki in izdelki ali snovi, ki se uporabljajo v živalski krmi,
- gensko spremenjeni organizmi,
- dietični izdelki, prehrana in alergije,
- izdelki za varstvo rastlin ter njihovi ostanki in
- zdravje rastlin.

Osnovno poslanstvo EFSA je ocenjevanje in opozarjanje na kakršnokoli tveganje, ki je povezano z živilom ali njihovo verigo. V ozadju mora agencija pogosto sodelovati na političnem področju, kjer poteka sprejemanje ali revidiranje določenih zakonov ali celo razvijanje novih politik glede prehrane. Kot neodvisna organizacija sicer ni vključena v proces upravljanja, igra pa pomembno vlogo z neod-

visnimi nasveti, ki so znanstveno podkrepile. Na ta način neodvisno sodeluje pri preoblikovanju politike. Aktivnosti agencije potekajo tudi na lastno pobudo.

Metode dela

Agencija se pri svojem delu javno posvetuje s številnimi interesnimi skupinami in od zainteresiranih strank dejavno pridobiva povratne informacije o svojem delu in dejavnostih. Tesno sodeluje tudi z nacionalnimi organi za varnost hrane po vsej EU ter z Evropsko komisijo, Evropskim parlamentom in drugimi organi EU in mednarodnimi organizacijami, ki delujejo na področju varnosti živil in krme. Analizira, kako javnost zaznava tveganja, povezana s hrano; pojasnjuje in naveda okoliščine tveganja. Sodeluje s ključnimi akterji, vključno z nacionalnimi organi, interesnimi skupinami in sredstvi javnega obveščanja, da bi sporočila prilagodila potrebam različnih ciljnih skupin. Zagotavlja doslednost z usklajevanjem obvestil z drugimi organi za oceno tveganja in s pristojnimi za obvladovanje tveganja, kot so Evropska komisija in države članice EU. Agencija prek delovne skupine posvetovalnega foruma za obveščanja svoja obvestila usklajuje z osebami, odgovornimi za obveščanje v nacionalnih organih za varnost hrane in upošteva njihove nasvete.

Vse dejavnosti EFSA temeljijo na vrednotah, ki so osnovno vodilo njenega delovanja:

- Znanstvena odličnost – ki jo dosega z vključevanjem strokovnjakov in upoštevanjem najsodobnejših znanstvenih pristopov ter posledično odličnimi znanstvenimi dosežki, ki so osnovani na visokih znanstvenih standardih pri oceni tveganja.
- Neodvisnost – predvsem znanstveno delo varuje z notranjimi mehanizmi, kot je zaveza znanstvenikov in strokovnjakov o neodvisnosti. Znanstvena mnenja so sprejeta s kolektivnim odločanjem, kar omogoča čim večjo nepristranskost in uravnoteženost sklepov agencije.
- Odprtost in preglednost – aktivnosti agencije so sproti objavljene na spletu, v medije so posredovani celo pomembni sestanki in dogodki. Prizadeva si za sodelovanje s skupinami, kot so recimo okoljevarstveniki in potrošniki, ter izmenjavo stališč.
- Odzivnost – zavzemajo se za hiter in zanesljiv odziv – znanstvene informacije morajo biti pravočasne, najnovejše in celovite, kar omogoča sprejetje ustreznih odločitev.
- Sodelovanje s članicami EU – z agencijo so povezani posvetovalni forumi vseh 27 držav članic EU. Forum predstavlja osnovno gibalno EFSA, osnova je seveda medsebojno sodelovanje na področju ocen tveganja v EU. Forum je pomemben element v smislu posvetovanja o znanstvenih vprašanjih, osredotočen je na sodelovanje in mrežno povezovanje. Na področju varnosti živil želi agencija potrošniku posredovati ustrezna, točna in pravočasna opozorila. Zato želi imeti podatke, kako javnost zaznava tveganja, ki so povezana s prehrano. Za čim učinkovitejše obveščanje je bila ustanovljena interdisciplinarna svetovalna skupina, ki svetuje izvršnemu direktorju.

Potreba za današnji čas

S svojo objektivno, neodvisno in znanstveno dejavnostjo je EFSA ključna za ohranjanje zdravja ljudi in živali na območju EU. Ukrepanje v primerih tveganja za javno zdravje mora biti hitro in agencija je svoje hitro in učinkovito ukrepanje že večkrat dokazala. S tem se počasi vrača zaupanje v zdravo hrano, sama kakovost hrane pa posledično narašča. Agencija deluje javno in pregledno ter s pravočasnimi in nepristranskimi znanstvenimi nasveti podpira evropske organe pri sprejemanju politik in odločitev.

Upravni odbor je leta 2008 sprejel strateški načrt za obdobje 2009–2013. V načrtu je določeno, kako bo agencija čim bolj povečala koristi strokovnega znanja, ki ga ima na voljo po vsej Evropi, in okrepila celovit pristop k oceni tveganja, da bo evropskim oblikovalcem odločanja zagotovila ustrezno in pravočasno znanstveno svetovanje. Opredeljenih je bilo šest ključnih strateških področij:

- zagotavljanje celovitega pristopa k izvajanju znanstvenega svetovanja v zvezi z načelom »od vil do vilic«,
- zagotavljanje pravočasne in visokokakovostne ocene izdelkov, snovi in zahtevkov na podlagi zakonodajnega postopka odobritve,
- pregledovanje, razširjanje in analiza podatkov na področjih v pristojnosti Agencije,

- uveljavitev vodilnega položaja agencije pri ocenjevanju tveganja v Evropi in na mednarodni ravni,
- okrepitev zaupanja v agencijo in sistem EU za varnost hrane in
- zagotavljanje odzivnosti, učinkovitosti in uspešnosti agencije.

V današnjem času tudi sami potrošniki vse bolj težijo k zdravemu načinu pridelave hrane (organska), k vse večji kakovosti in varnosti živilskih proizvodov. Vse več je novih živil in živilskih sestavin, ki prihajajo na evropski trg s pomočjo tehnoloških postopkov (npr. gensko spremenjeni organizmi, GSO), ki morajo biti taka, da ne predstavljajo tveganja za varnost in zdravje ljudi. V zvezi s tem so znanstvena in strokovna vprašanja vse pomembnejša in vse bolj zapletena. Zato je odločilnega pomena, da inštitucije EU in širša javnost zaupajo v strokovno delo EFSA.

Analiza prednosti

Z delovanjem visoko kompetentnega kadra EFSA zagotavlja oblikovanje strokovnih mnenj, podprtih z najsodobnejšimi znanstvenimi spoznanji in pristopi:

- EFSA na transparenten način nudi znanstvene nasvete, česar pred njeno ustanovitvijo ni bilo.
- Z vsemi zbranimi, iskanimi, analiziranimi informacijami in podatki lahko agencija prepozna nepričakovano tveganje. Zaveza agencije zagotavlja objektivne, pregledne in neodvisne znanstvene nasvete, ki temeljijo na znanstvenih metodologijah, informacijah in podatkih.
- V strategiji EFSA je pomembno, da dobro sodeluje z državami članicami EU, ker bo le na ta način področje varnosti živil in krme delovalo učinkovito.
- Integriran pristop na področju varne hrane celotne prehranske verige omogoča sledljivost, ne glede na to, ali se hrana prideluje v EU ali se uvozi iz nekega drugega kraja na svetu.
- Z EFSA je proces znanstvene ocene tveganja postal dostopen za javnost z namenom preprečevanja tveganja za zdravje ljudi.
- Na javen in pregleden način usklajuje sodelovanje v raziskovalnih programih držav članic in s tem preprečuje podvajanje znanstvenih študij.

- Pri razhajanju med znanstvenimi mnenji agencije in drugih služb takoj zagotovi izmenjavo vseh pomembnih znanstvenih informacij in na podlagi teh ugotovi možna sporna znanstvena vprašanja ter njihovo razrešitev, ki jo objavi.
- Zaradi vseh sporočil, ki jih prejme preko sistema hitrega obveščanja, zagotavlja državam članicam vse potrebne podatke za analize tveganja.
- Na vseh področjih, za katere je kompetentna, predlaga kratkoročne in dolgoročne izboljšave.
- Prednost EFSA je tudi v elektronskem sistemu poročanja, saj so podatkovne zbirke popolnoma dostopne vsem državam članicam in Evropski komisiji. EFSA tako skupnosti nudi kakovostno, neodvisno in učinkovito znanstveno in strokovno podporo, kar je zelo pomembno v današnjem času, ko imajo razni veliki prehranski koncerni velik vpliv na potrošnika.
- Pri vsem zgoraj naštetem sodeluje nekaj sto strokovnjakov, ki so zaposleni na agenciji, in tudi nešteto strokovnjakov, ki izdelujejo številne študije, analize, mnenja za potrebe agencije. Slovenija in druge majhne države, ki so premajhne tako glede na število prebivalstva kakor tudi glede na število strokovnjakov, lahko ta obvestila, mnenja o varnosti hrane in krme koristno uporabljajo, saj si takšnega mnenja same ne bi zmoгле izdelati.

Analiza slabosti

Zaradi naraščajočih pristojnosti, ki so bile podeljene EFSA, je treba izboljšati postopke ter zaradi tega povečati človeške in finančne vire in omogočiti še boljše delovanje:

- Nekatere raziskave EFSA opravlja v sami industriji, zato obstaja možnost, da bi na nekatere njene odločitve lahko vplivala industrija (npr. fitofarmaceutska, genska industrija).
- Poleg tega ostaja odprto vprašanje usklajenega ocenjevanja tveganja v Evropi, predpisi še vedno niso enotni za vse države članice, kar pomeni ovire pri trgovanju s hrano in krmo.

- Zaradi hitro rastočega evropskega trga in s tem v zvezi pojavov novih izdelkov se v agenciji večja potreba po človeških in finančnih virih, saj lahko le na tak način za vsa področja zagotavljajo visoko kakovostne preglede in neodvisne ocene.
- Ocene tveganj o dolgoročnih vplivih novih živil in dodatkov hrani na zdravje še niso dovolj znanstveno raziskane in se bodo morda pokazale šele pri naslednjih generacijah.
- Obstaja možnost, da na mnenje EFSA vplivajo multinacionalke oziroma lobiranja omenjenih, zato se ji včasih očita, da zaključki niso vedno v korist potrošniku. Zgodi se, da se pod vplivom interesa kapitala (multinacionalke) zakoni ne izvajajo dosledno.
- Sistem je nedosegljiv, skoraj neuporaben za proizvajalce, saj je treba izpolnjevati kupe dokumentov za pridobitev mnenja EFSA. Pri izpolnjevanju potrebne dokumentacije bi uporabniki potrebovali pomoč, ki pa je v takem smislu sistem EFSA ne omogoča.
- Med ljudmi ni dovolj ozaveščenosti o delovanju EFSA in njeni uradni spletni strani.
- Slabost sistema EFSA je, da nima svojih laboratorijev, kar bi ji omogočilo dejansko neodvisnost od zunanjih laboratorijev, v katerih se opravljajo vse laboratorijske analize, na katerih temeljijo mnenja in ocene tveganja s strani EFSA.
- Prav tako so podatki v poročilih neusklajeni in premalo konsistentni ter jasni. S tem se izgubi natančnost poročanja posamezne države članice. Razbrati podrobnosti iz tako zapisanih podatkov je včasih težko ali pa tudi nemogoče (npr. informacija o specifičnih zoonozah – kot primer navajamo okužbo s kampilobaktri v *The EFSA Journal* 2011). Poročilo je obširno in tudi pomanjkljivo, za veliko držav ni podatkov oz. so pomanjkljivi, odstopanja so prevelika, komentariji nejasni.

Varnost in potrošnik

Razmišljajmo, da bi moral biti povprečni evropski potrošnik sposoben razumeti in analizirati ter sklepati, kaj je prav in kaj narobe, ko teče beseda o varnosti živil, za kar obsta-

jajo številni razlogi, ki so pogosto vezani na izobraževanje in usposabljanje (12–14). Pokazalo se je, da je potrošnik pogosto žrtev nerazumevanja strokovnega besednjaka in da je vedno bolj nevešč potrebnih postopkov od nakupa do priprave varnega obroka (15–20). Postavljen je med proizvajalce in EFSA. Sistem analize tveganja in ugotavljanja kritičnih kontrolnih točk (angl. *hazard analysis and critical control point*, HACCP) obvladuje varnost živil od njive do trgovine, ne pa tudi doma (21–27). Varno živilo je bistveno za uporabnika, živilsko industrijo in ekonomijo (25–31). Kljub ogromnim investicijam obolenja zaradi zastrupitev s hrano naraščajo, kar je lahko posledica boljše statistike ali dejanske rasti okužb, o čemer so mnenja deljena (14, 30–32). Tako so obolenja zaradi kontaminirane hrane še vedno javnozdravstveni problem v Evropi in svetu. Natančnejši pogled na živilsko področje, ki je razpeto med tehničnimi in družbenimi vedami, nam odpira širši spekter možnosti, kako zagotoviti popolno varnost živil do uporabnika na koncu proizvodno oskrbovalne verige (14–20).

Ali bo sistem zagotavljanja varne hrane učinkovit ali ne, je odvisno od usposobljenosti zaposlenih, njihove osebne odgovornosti za delo v skladu z načeli dobrih praks in sistema HACCP, motivacije in zadovoljstva z delom (21, 22). Prav tako so poleg zaposlenih v podjetju na vseh ravneh pomembni tudi vsi akterji izven podjetja, predvsem na nivoju presojanja kakovosti izvajanja zahtev sistema zagotavljanja varnosti živil od polja do mize (23, 24, 27). Usposabljanje predstavnikov vodstva in vseh zaposlenih v podjetju je bistveno za zagotavljanje varnosti živil. Izbor, urjenje in izobraževanje presojevalcev, ki presojajo učinkovitost implementiranega sistema, in preverjanje njihovih sposobnosti in znanja predstavljajo kritičen dejavnik za doseganje zadostne kontrole nad varnostjo hrane v procesu (25, 33).

Tako smo vzpostavili zaključen krog, ki izključuje potrošnika in mu dopoveduje, da mora tudi sam kaj storiti za svojo varnost. Če pa imamo potrošnika/porabnika zunaj kroga systemskega obvladovanja varnosti živil, pa objektivno ne moremo govoriti o zagotavljanju varnih živil od njive do mize. Tako obstaja ugotovitev, da je treba systemski pristop raz-

širiti in mu dodati dobro gospodinjsko prakso ali pa razviti celovito prakso, npr. dobro prehransko prakso (angl. *good nutritional practice*, GNP) (1). Gre za platformo varnosti živil, ki vključuje potrošnika in združuje vse aktualne dobre prakse in sistem HACCP ter jasno opredeljuje novo dimenzijo tveganj pri zagotavljanju varnih živil, t. i. človeški faktor (14). Tak ambiciozni cilj je lahko dosežen samo z globalnim sodelovanjem vseh udeležencev s področja živil: vladnih organov, učiteljev in profesorjev, nadzornikov, zaposlenih v priraji/predelavi, transportu, trgovini, gostinstvu in nas – porabnikov, ki stojimo na koncu živilskoprehransko oskrbovalne verige. Dejavniki tveganj in korektivni ukrepi niso nič novega (13, 21). Nov je način pristopa, kjer so aktivnosti in postopki logično razvrščeni. Pristop je multidisciplinaren. Skladno z EU-regulativo 178/2002 zahteva za vse živilske operaterje in za vse sestavine v živilih popolno sledljivost, kar je celovit izziv za EU. Kaj takega namreč ni enostavno doseči v realnem življenju, saj zahteva osebno odgovornost vključenih, ažurirano dokumentacijo in sledljivost skozi zapise sistema nadzora, takojšnje ukrepanje v primeru ugotovljene neustreznosti ter sledljivost (29). Prinaša spremembe v mišljenju, organiziranju, vodenju, izobraževanju in usposabljanju na vseh nivojih od »vil do vilic«, kot je danes navada ilustrirati živilskoprehransko oskrbovalno verigo, ki ima mnogo pasti, ki jih prinaša razvoj in odtujevanje človeka od narave.

ZAKLJUČEK

Evropski sistem za varnost hrane temelji na predpostavki, da je treba za varovanje zdravja potrošnikov varnost zagotavljati vzdolž celotne živilskoprehransko oskrbovalne verige. V sklo-

pu tega sistema je tudi EFSA, pridelovalci, proizvajalci, predelovalci, distributerji in potrošniki, katerih glavni cilj bi moral omogočiti evropskim državljanom varno hrano, s tem pa tudi zavarovati njihovo zdravje. Verjamemo, da so potrošniki vedno bolj ozaveščeni, saj je varnost živil v ospredju javnega zanimanja in večina potrošnikov misli, da ve, v čem je bistvo problema varnosti. Zakonodajca EU je relativno dobra, saj zagotavlja, da so živila in krma varni. Standardi varnosti živil v EU so med najvišjimi v svetu. Prav gotovo zelo veliko k temu pripomoreta EFSA pa tudi RASFF. Prav RASFF je tisti, ki nas obvaruje pred nevarnostmi v zvezi z živili in krmo s sistemom hitrega obveščanja. Glede EFSA velja omeniti, da je ta sistem pravzaprav namenjen strokovni javnosti, verjetno velika večina potrošnikov niti ne ve za njen obstoj. Zato je evropski potrošnik še vedno tam, kjer ga je zatekel razvoj. Naša stopnja razvoja v novih načinih komunikacije s potrošnikom se spreminja in ne dosega vse populacije od mladostnikov do starostnikov. Tako je problematično, kakšno informacijo lahko dobi potrošnik takrat, ko se sooči s problemom, vezanim na varnost živil in varnost prehranjevanja, ki mu ni kos in ga ne razume. Šele takrat se začnemo spraševati in iskati odgovore, ki pa so včasih zelo nejasni, kljub sodobnim tehnologijam oskrbe z informacijami.

Če povzamemo, smo evropski potrošniki lahko zadovoljni, da nam vsi postavljeni sistemi zagotavljajo varno hrano. Na nas pa je, kako bomo te sisteme koristno uporabili. Izobraževanje bi lahko na tem področju naredilo več na vseh nivojih, seveda ob upoštevanju dejstva, da je motivacija izhodiščna točka. To je takrat, ko res hočemo več vedeti in znati o živilu/hrani in prehranjevanju. Šele nato lahko sledi udejanjanje.

LITERATURA

1. Raspor P. Sedanji pogled na varnost živil. In: Gašperlin L, Žlender B, eds. Varnost živil/22. Bitenčevi živilski dnevi; 2004 Mar 18–19; Radenci, Slovenija. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo; 2004. p. 1–14.
2. Soriano JM, Rico H, Moltó JC, et al. Effect of introduction of HACCP on the microbiological quality of some restaurants meals. *Food Control*. 2002; 13 (4): 253–61.
3. Walker E, Pritchard C, Forsythe S. Hazard analysis critical control point and prerequisite programme implementation in small and medium size food businesses. *Food Control*. 2003; 14 (3): 169–74.

4. Tivadar B. Prihraniš čas, zapraviš ljubezen: ambivalentni odnos do kupljene (pol)pripravljene hrane. *Annales. Series historia et sociologia*. 2003; 13 (1): 87–102.
5. Walker E, Jones N. An assessment of the value of documenting food safety in small and less developed catering businesses. *Food Control*. 2002; 13 (4): 307–14.
6. Walczak D, Reuter M. Putting restaurant customers at risk: unsafe food handling as corporate violence. *Hospitality Management*. 2004; 23 (1): 3–13.
7. Pan-European conference on food safety and quality; 2002 Feb 25–28; Budapest, Hungary. Rome: Food and agriculture organization of the United Nations; 2002.
8. Borchart DK. Osnove prava Evropske unije [internet]. Luxembourg: Urad za publikacije Evropske unije; 2011 [citirano 2012 Jul 2]. Dosegljivo na: <http://eur-lex.europa.eu/sl/editorial/abc.pdf>
9. Uredba (ES) št. 178/2002 evropskega parlamenta in sveta z dne 28. januarja 2002 o določitvi splošnih načel in zahtevah živilske zakonodaje, ustanovitvi Evropske agencije za varnost hrane in postopkih, ki zadevajo varnost hrane 2002R0178 – SL – 28.04.2006 – 002.001 – 1–37.
10. European Food Safety Authority. About EFSA [internet]. Parma: EFSA; 2012 [citirano 2012 Jul 1]. Dosegljivo na: <http://www.efsa.europa.eu/en/aboutefsa.htm>
11. Evropska agencija za varnost hrane. Kratka predstavitev [internet]. Parma: EFSA; 2012 [citirano 2012 Jul 1]. Dosegljivo na: http://www.arhiv.mkgp.gov.si/fileadmin/mkgp.gov.si/pageuploads/EFSA/sept09/EFSA_corp_broch_SL.PDF
12. Raspor P. Faces of foods on the world of food systems. *Acta aliment. (Bp.)*. 2006; 35 (3): 247–9.
13. Plahuta P, Raspor P. Comparative analysis of GMO plant foods current state and trends. *Int J Food Sci Technol Nutr*. 2009; 2 (2): 29–47.
14. Raspor P, Jevšnik M. Good nutritional practice from producer to consumer inclusive. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2008; 48 (3): 276–92.
15. Jevšnik M, Hlebec V, Raspor P. Consumer interpretation of the term food safety. *Acta aliment. (Bp.)*. 2008; 37 (4): 437–48.
16. Jevšnik M, Hlebec V, Raspor P. Consumers' awareness of food safety from shopping to eating. *Food Control*. 2008; 19 (8): 737–45.
17. Jevšnik M, Hoyer S, Raspor P. Food safety knowledge and practices among pregnant and non-pregnant women in Slovenia. *Food control*. 2008; 19 (5): 526–34.
18. Jevšnik M, Ovca A, Likar K, et al. Food safety at home: the last step of food supply chain. In: Walsch M, ed. *Food supplies and food safety: production, conservation and population impact (food and beverage consumption and health)*. New York: Nova Science; 2011. p. 73–95.
19. Likar K, Jevšnik M. Cold chain maintaining in the food trade. *Food Control*. 2006; 17 (2): 108–13.
20. Untermann F. Food safety management and misinterpretation of HACCP. *Food Control*. 1999; 10 (3): 161–7.
21. Jevšnik M, Bauer M, Zore A, et al. Hygienic status of small and medium sized food enterprises during adoption of HACCP system. *International Journal of Food Science, Technology & Nutrition*. 2007; 1 (1): 95–113.
22. Jevšnik M, Hlebec V, Raspor P. Meta – analysis as a tool for barriers identification during HACCP implementation to improve food safety. *Acta Aliment*. 2006; 35 (3): 319–53.
23. Jevšnik M, Hlebec V, Raspor P. Food safety knowledge and practices among food handlers in Slovenia. *Food Control*. 2008; 19 (12): 1107–18.
24. Jevšnik M, Hlebec V, Raspor P. Survey of safe and hygienic practices among Slovenian sauerkraut growers. *Food Control*. 2009; 20 (7): 677–85.
25. Raspor P. Priročnik za postavljanje in vodenje sistema HACCP. 2002. Ljubljana: Slovenski inštitut za kakovost in meroslovje: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo; 2002.
26. Raspor P. The European declaration on food, technology and nutrition: editorial. *Acta Aliment*. 2009; 38 (1): 3–7.
27. Raspor P. Total food chain safety: how good practices can contribute? *Trends Food Sci Technol*. 2008; 19 (8): 405–12.
28. Raspor P, Ambrožič M. ISO 22000 food safety. In: Sun DW, ed. *Handbook of food safety engineering*. Oxford: Wiley-Blackwell; 2012. p. 786–816.
29. Raspor P. Bio-markers: traceability in food safety issues. *Acta Biochim Pol*. 2005; 52 (3): 659–64.
30. Raspor P. The role of food microbiology in food safety and quality. In: XVII Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos; 2012 Sep 19–22; Valladolid, Spain. Madrid: Sociedad Española de Microbiología (SEM); 2010. p. 15–7.
31. Smole Možina S, Hočevar Grom A. 2004. Mikrobiološka varnost živil. In: Gašperlin L, Žlender B, eds. *Varnost živil/22. Bitenčevi živilski dnevi; 2004 Mar 18–19; Radenci, Slovenija*. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo; 2004. p. 29–43.
32. Ropkins K, Beck AJ. Evaluation of worldwide approaches to the use of HACCP to control food safety. *Trends Food Sci Technol*. 2000; 11 (1): 10–21.
33. Ambrožič M, Jevšnik M, Raspor P. Inconsistent terminology in food safety field: a permanent risk factor? *J Food Nutr Res*. 2010; 49 (4): 186–94.

Tjaša Žohar Čretnik¹, Alenka Štorman², Nadja Orešič³, Marija Trkov⁴, Ingrid Berce⁵,
Mateja Ravnik⁶, Bojan Drinovec⁷, Iztok Štrumbelj⁸, Alenka Andlovic⁹, Tatjana Harlander¹⁰

Pojavljanje in občutljivost izolatov salmonel v Sloveniji

Prevalence and Susceptibility of Salmonella Isolates in Slovenia

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, pojavljanje, odpornost

Salmonele spadajo pri nas in po svetu med najpogostejše povzročitelje črevesnih okužb. V Sloveniji od leta 2001 spremljamo pojavljanje različnih serotipov salmonel in njihovo odpornost. V prispevku prikazujemo pogostost pojavljanja dveh najpogostejših serotipov salmonel v Sloveniji – *Salmonella* Enteritidis in *Salmonella* Typhimurium ter njuno odpornost proti antibiotikom v letih 2001–2011. Med salmonelami z 49,9–96,1 % izolatov prevladuje *S. Enteritidis*, na drugem mestu ji sledi *S. Typhimurium* z 1,2–13,9 % izolati. Odpornost pri *S. Enteritidis* z leti narašča proti ampicilinu, kanamicinu in nalidiksični kislini, vendar deleži odpornih izolatov znašajo od 1 do največ 8 %. Pri *S. Typhimurium* deleži odpornih izolatov padajo pri večini antibiotikov, vendar ti pri posameznih antibiotikih še vedno presegajo 35 %. Skupno število izolatov je od leta 2003 upadlo za skoraj desetkrat. Trendi, ki jih opazujemo v Sloveniji, so podobni tistim v Evropi. Da bi povečali koristnost zbranih podatkov, bi morali v Sloveniji na podlagi laboratorijskih podatkov vzpostaviti pravi sistem sledenja in izdelati kvantitativno oceno prispevka posameznih vrst hrane k skupnemu bremenu salmoneloz.

ABSTRACT

KEY WORDS: *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, occurrence, resistance

Salmonellosis is one of the most frequent gastrointestinal infections all over the world. Since 2001, the occurrence of different salmonella serotypes and their antibiotic resistance have been followed. In this article, we present data from 2001 to 2011 regarding the occurrence of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium and antibiotic resistance of the isolates

¹ Mag. Tjaša Žohar Čretnik, dr. med., Zavod za zdravstveno varstvo Celje, Ipavčeva ulica 18, 3000 Celje; tjasa.cretnik@zzv-ce.si

² Alenka Štorman, dr. med., Zavod za zdravstveno varstvo Celje, Ipavčeva ulica 18, 3000 Celje

³ Nadja Orešič, univ. dipl. biol., Zavod za zdravstveno varstvo Maribor, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

⁴ Dr. Marija Trkov, univ. dipl. inž. živil. tehnol., Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Trubarjeva ulica 2, 1000 Ljubljana

⁵ Ingrid Berce, dr. vet. med., Zavod za zdravstveno varstvo Nova Gorica, Vipavska cesta 13, 5000 Nova Gorica

⁶ Mag. Mateja Ravnik, univ. dipl. kem., Zavod za zdravstveno varstvo Kranj, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj

⁷ Bojan Drinovec, univ. dipl. biol., Zavod za zdravstveno varstvo Koper, Verdijeva ulica 11, 6000 Koper

⁸ Mag. Iztok Štrumbelj, dr. med., Zavod za zdravstveno varstvo Murska Sobota, Ulica arhitekta Novaka 2b, 9000 Murska Sobota

⁹ Alenka Andlovic, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

¹⁰ Tatjana Harlander, dr. med., Zavod za zdravstveno varstvo Novo Mesto, Mej vrti 5, 8000 Novo mesto

belonging to these two serotypes, which are the most prevalent in Slovenia. During the above-mentioned years, the proportion of isolates of *S. Enteritidis* ranged from 49.9 to 96.1% and the proportion of isolates of *S. Typhimurium* from 1.2 to 13.9%. The resistance of *S. Enteritidis* isolates against ampicillin, kanamycin and nalidixic acid was increasing, but never exceeded 8%. Although the proportions of resistant *S. Typhimurium* isolates were decreasing almost against all antibiotics, resistance against several antibiotics exceeded 35%. Since 2003, the number of all salmonella isolates has dropped almost ten times. The observed trends in Slovenia are comparable with trends describing the same parameters in Europe. To increase the usefulness of collected data, complete laboratory-based surveillance should be implemented. We should also quantitatively assess the contribution of different types of food to the burden of salmonellosis in Slovenia.

UVOD

Salmonele spadajo pri nas in po svetu med najpogostejše povzročitelje črevesnih okužb. Breme bolezni po posameznih povzročiteljih je mogoče natančno opredeliti in med drugim določiti razmerje med laboratorijsko potrjenimi primeri in vsemi obolelimi v populaciji. Sistem nadzora nad pojavljanjem določene povzročitelja temelji bodisi na podatkih, zbranih skozi prijavljanje kliničnih primerov, ali pa na laboratorijskih podatkih (angl. *laboratory based surveillance*, LBS). Slednji način pogosto ponuja popolnejše podatke. V Sloveniji v laboratorijih od leta 2001 spremljamo pojavljanje različnih serotipov salmonel in njihovo odpornost. V prispevku prikazujemo pogostost pojavljanja dveh najpogostejših serotipov salmonel v Sloveniji – *Salmonelle* Enteritidis in *S. Typhimurium* ter njuno odpornost proti antibiotikom. Ta dva serotipa sta tudi v Evropi že vsaj desetletje prevladujoča serotipa tako pri človeku kot pri perutnini in prašičih (1–7).

ZBIRANJE PODATKOV

Na pobudo Oddelka za mikrobiologijo Zavoda za zdravstveno varstvo Celje (ZZV CE) smo se v letu 2001 v laboratorijskih Zavodov za zdravstveno varstvo in Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije dogovorili, da vzpostavimo sistem laboratorijskega sledenja pojavljanja različnih serotipov salmonel in njihove odpornosti za antibiotike. V letu 2002 se je skupini priključil tudi Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Sodelujoči laboratoriju ZZV CE štirikrat letno posredujejo podatke o serotipu, vrsti vzorca, iz katerega je bil izolat osamljen, datumu sprejema vzorca v laboratorij, starosti bolnika in podatke o občutljivosti izolatov za antibiotike (metoda difuzije v agarju z diski). Podatki so anonimizirani, poročamo le prvi izolat pri bolniku, prav tako pa laboratorij ZZV CE ne razpolaga z drugimi koristnimi podatki, kot so: datum morebitne hospitalizacije, podatki o potovanjih in o klinični sliki. Poleg serotipizacije in določanja občutljivosti za antibiotike pri vseh izolatih v Sloveniji izvajamo tudi molekularno tipizacijo izolatov, za katere epidemiolog oceni, da pripadajo izbruhu. Žal ne tipiziramo vseh izolatov, kar pomeni, da ne moremo izkoristiti dodane vrednosti LBS, ki je predvsem v odkrivanju epidemij, ki potekajo na večjem geografskem področju in v daljšem časovnem obdobju. Poudariti je potrebno, da je bil primarni namen skupine slediti trendom odpornosti izolatov salmonel.

REZULTATI

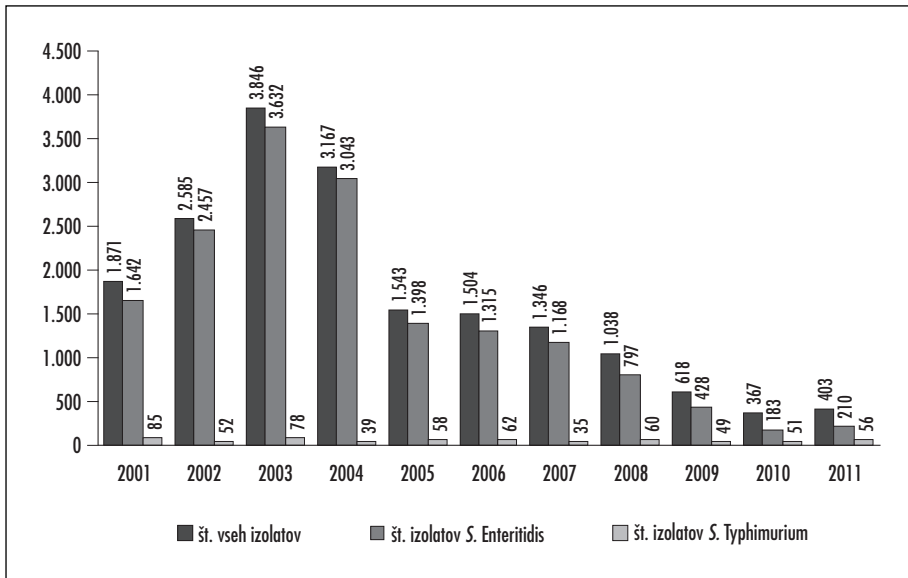
V letih 2001–2011 se je skupno število izolatov najprej povečevalo, nato pa zmanjševalo, kar prikazujemo na sliki 1.

Vidimo, da je v Sloveniji med letoma 2001 in 2011 potekala obsežna in dolgotrajna epidemija salmoneloz. Največje število humanih izolatov smo zabeležili v letu 2003, in sicer 3.846. Število je nato upadalo do leta 2010 (367 izolatov), v letu 2011 pa se je blago povzpelo na 403 izolate. Vsa leta sta med izolati močno prevladovala serotipa *S. Enteritidis* in

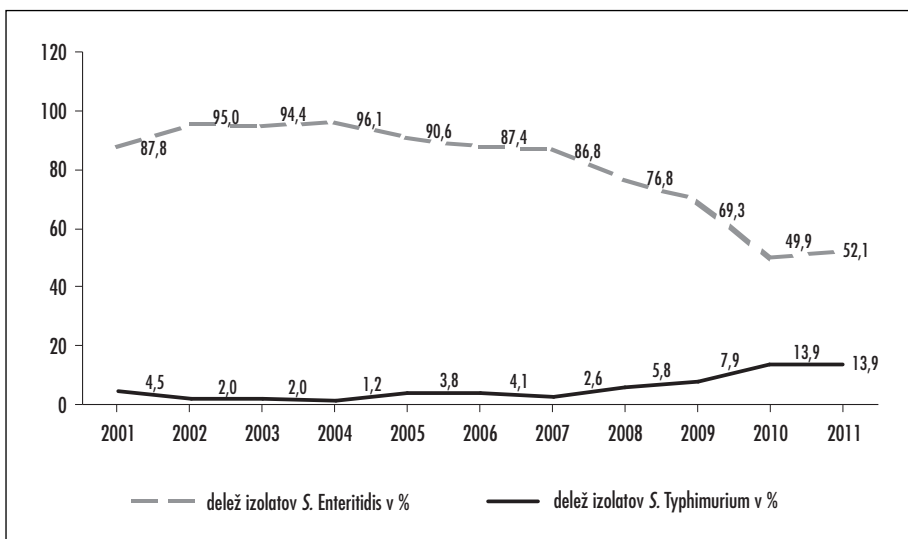
S. Typhimurium. Delež izolotov obeh serotipov med vsemi izolati prikazujemo na sliki 2.

Delež izolotov *S. Enteritidis* počasi upada, a je vsa leta visok, med 49,9 in 96,1 %. Delež izolotov *S. Typhimurium* kaže obratni trend in počasi narašča. Znaša od 1,2 % v letu 2004

do 13,9 % v letih 2010 in 2011. Delež izolotov *S. Enteritidis* v vsem opazovanem obdobju nikoli ni bil nižji od evropskega povprečja, ki je bilo s 45,0 % najnižje v letu 2010 (7). V letu 2004, ko je Slovenija beležila najvišji delež izolotov *S. Enteritidis*, je evropsko povprečje znašalo 76 % (1).



Slika 1. Število vseh izolotov salmonel v Sloveniji v letih 2001–2011.



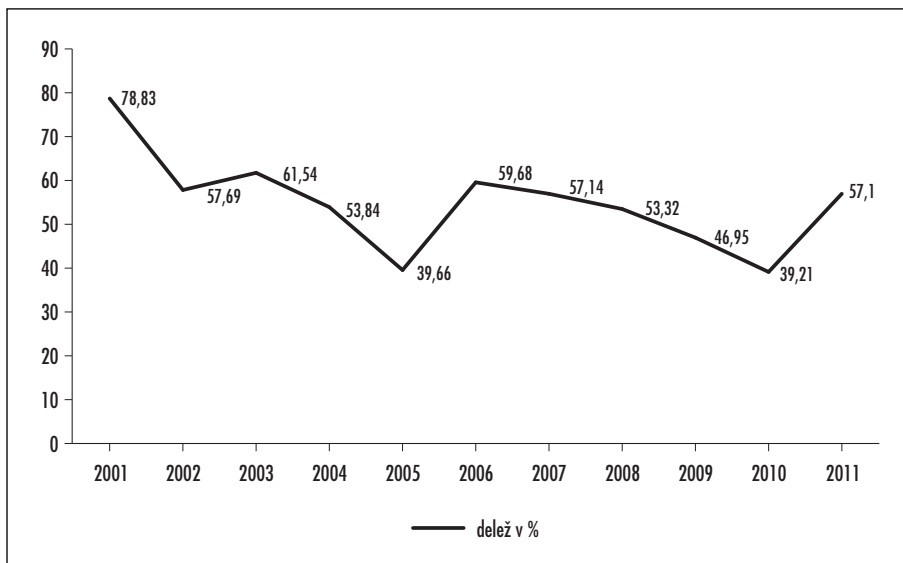
Slika 2. Deleži izolotov *S. Enteritidis* in *S. Typhimurium* med vsemi izolati salmonel v letih 2001–2011.

Tabela 1. Delež odpornih izolatov *S. Enteritidis* proti izbranim antibiotikom v letih 2001–2011.

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
ampicilin	0,6	0,6	2,8	2,1	0,9	1,3	1,4	0,6	1,9	2,7	3,3
cefotaksim	0,0	0,0	0,1	0,0	0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
klaritramfenkol	0,1	0,8	0,3	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ciprofloksacin	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
gentamicin	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
kanamicin	1,6	2,2	2,2	3,4	3,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0
nalaktična kislina	1,2	0,6	0,7	0,4	1,8	1,1	0,4	3,0	6,1	7,7	6,7
streptomycin	0,1	0,2	0,1	0,0	0,1	0,1	0,5	0,0	0,2	1,1	1,9
sulfonamidi	0,4	0,1	0,2	0,2	0,1	0,9	4,1	2,1	0,5	3,3	4,3
tetraciklin	0,4	1,1	0,5	0,2	0,6	0,2	0,3	0,3	0,7	1,6	0,0
trimetoprim- sulfametoksazol	ni podatka	3,6	4,1	3,3	3,6	0,2	0,3	0,3	0,2	0,0	0,0

Tabela 2. Delež odpornih izolatov *S. Typhimurium* proti izbranim antibiotikom v letih 2001–2011.

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
ampicilin	72,8	55,6	62,9	59,5	44,8	62,9	57,1	56,7	49,0	37,3	51,8
cefotaksim	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7	2,0	0,0	0,0
klaritramfenkol	42,4	46,3	34,8	26,2	20,7	35,5	20,0	26,7	12,2	24,0	26,8
ciprofloksacin	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
gentamicin	7,6	7,4	16,9	7,1	6,9	4,8	2,9	0,0	2,0	0,0	3,6
kanamicin	2,3	9,3	2,2	2,4	3,4	3,2	2,9	0,0	4,1	0,0	1,8
nalaktična kislina	57,6	44,4	37,1	26,2	17,2	21,0	20,0	11,3	14,3	12,0	19,6
streptomycin	63,6	59,3	41,6	61,9	32,8	54,8	48,6	53,3	44,9	34,0	53,6
sulfonamidi	82,8	66,7	66,3	57,1	39,7	61,3	55,9	58,3	52,1	40,0	48,2
tetraciklin	50,5	55,6	61,8	50	41,4	56,5	60,0	55,0	53,1	38,0	46,4
trimetoprim- sulfametoksazol	4,3	1,9	1,1	11,9	5,2	13,8	11,4	6,7	8,2	7,8	3,6



Slika 3. Deleži izolatov *S. Typhimurium*, odpornih proti trem ali več antibiotikom v letih 2001–2011.

Glede občutljivosti za antibiotike se oba serotipa pomembno razlikujeta. Občutljivost izolatov *S. Enteritidis* za ampicilin, cefotaksim, gentamicin, ciprofloksacin, nalidiksično kislino, tetracikline, kanamicin, trimetoprim-sulfametoksazol, sulfonamide in streptomycin prikazujemo v tabeli 1, občutljivost izolatov *S. Typhimurium* pa v tabeli 2. Nabor navedenih antibiotikov ustreza epidemiološkim namenom, le nekateri od navedenih antibiotikov so uporabni za zdravljenje okužb pri ljudeh, če je zdravljenje potrebno.

Vidimo, da so izolati *S. Enteritidis* dobro občutljivi za antibiotike. Odpornost proti cefotaksimu, ciprofloksacinu in gentamicinu v nobenem letu ni preseгла 0,1% izolatov. Zelo nizka je odpornost proti kloramfenikolu z vrhom 0,8% v letu 2002 in tetraciklinom z vrhom 1,1% v letu 2002. Z leti narašča odpornost proti ampicilinu (3,3% v letu 2011), nalidiksični kislini (6,7% leta 2011), sulfonamidom (4,3% leta 2011) in streptomycinu (1,9% leta 2011). Vseskozi se je zmanjševal le delež izolatov, odpornih proti trimetoprim-sulfametoksazolu, in sicer s 3,6% leta 2001 na 0% leta 2011.

Rezultati kažejo, da so izolati *S. Typhimurium* mnogo bolj odporni proti antibiotikom kot izolati *S. Enteritidis* in je njihov največji delež (odpornih izolatov) dosegel celo 82,8%

(sulfonamidi v letu 2001). Le odpornost proti cefotaksimu, ciprofloksacinu in gentamicinu je nizka in v nobenem letu ni preseгла 2% izolatov. Pri drugih antibiotikih smo večinoma beležili trend padanja deležev odpornih izolatov do leta 2010, v letu 2011 pa se je stanje znova poslabšalo. Manjši delež odpornih izolatov kot v letu 2010 smo v letu 2011 beležili le pri trimetoprim-sulfametoksazolu, in sicer 3,6% manjši.

Na deleže odpornih izolatov najbolj vplivajo večkratno odporni sevi. Deleže izolatov *S. Typhimurium*, ki so odporni proti trem ali več antibiotikom, prikazujemo na sliki 3.

Največji delež večkratno odpornih izolatov smo zabeležili v letu 2001, in sicer 78,83%, najnižjega pa v letu 2010, in sicer 39,21%. V letu 2011 smo se ponovno vrnili na raven okrog 55%, ki v opazovanih letih prevladuje.

RAZPRAVA

Ko analiziramo podatke o pogostosti salmoneloz, ne smemo pozabiti, da salmoneloza ni le zoonoza, temveč so pomembni tudi drugi načini prenosa: s človeka na človeka, stik s kontaminiranim okoljem in stik z živalmi. Rezultate spremljanja pojavljanja serotipov salmonel in njihove odpornosti smo doslej za različna časovna obdobja večkrat prikazali na sestankih,

delavnici in srečanjih Sekcije za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe (8, 9).

Ključna vprašanja, ki se porajajo iz prikazanih podatkov, so:

- zakaj je delež izolatov *S. Enteritidis* vsa leta višji od povprečja v Evropi,
- čemu pripisati padanje deleža izolatov *S. Enteritidis*,
- čemu pripisati porast deleža *S. Typhimurium* in
- zakaj se deleži odpornih izolatov ne spreminjajo z enako dinamiko kot deleži izolatov.

Vpogled v epidemiološko sliko drugih evropskih držav dobimo med drugim tudi v poročilih Evropske agencije za varnost hrane (angl. *European food safety authority*, EFSA) in Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. *European centre for disease prevention and control*, ECDC), ki so v celoti objavljena na spletnih straneh organizacij. Pri interpretaciji teh podatkov in primerjanju Slovenije z njimi moramo upoštevati, da ECDC za večino držav nima podatkov o tem, kolikšen delež laboratorijev sodeluje v mreži, če gre za LBS in poročanje o primerih, ki so laboratorijsko potrjeni, oziroma če gre za prijave epidemiološki službi, koliko primerov se le-tej dejansko prijavi. Španija na primer ocenjuje, da zajame le 25 % primerov. Zaradi tega v poročilu ECDC ne najdemo podatka o absolutni incidenci, pač pa o incidenci prijavljenih primerov na 100.000 prebivalcev (angl. *notification rate*). Povprečna vrednost tega kazalca za 31 evropskih držav v letu 2010 je 21,5. O najvišji vrednosti so poročali s Slovaške, in sicer 91,1, o najnižji pa s Portugalske – 1,9 na 100.000 prebivalcev. Slovenija se s 17,7 prijavljenimi primeri na 100.000 prebivalcev uvršča na 18. mesto, če države razporedimo po merilu od najvišje do najnižje incidence prijavljenih primerov (7). Kot pri nas sta tudi v Evropi najpogostejša serotipa *S. Enteritidis* (45 % primerov v letu 2010) in *S. Typhimurium* (25,3 % primerov leta 2010), pri čemer je število primerov okužbe s *S. Enteritidis* padlo (od leta 2007 do 2008 za 23 % in od leta 2008 do 2009 za 24 %), s *S. Typhimurium* pa je po porastu za 18 % od leta 2007 do 2008 padlo za 12 % od leta 2008 do 2009 (7, 10). V poročilu za leto 2010 podatki po serotipih niso več pri-

kazani – menimo, da je to korak nazaj v poročanju (7).

Poročila kažejo, da je incidenca prijavljenih primerov od leta 2007 do 2008 narasla v 15 od 30 držav, Slovenija pa je med 10 državami, ki so v letu 2008 beležile manjšo incidenco prijavljenih salmoneloz kot v letu 2007 (5). Incidenca prijavljenih primerov je od leta 2008 do 2009 narasla le v 3 od 30 držav, Slovenija pa je med 24 državami, ki so v letu 2009 beležile manjšo incidenco prijavljenih primerov salmoneloz kot v letu 2008 (6). V letu 2010 je manjšo incidenco prijavljenih primerov zabeležilo 11 držav, med njimi Slovenija. Kljub padanju incidence prijavljenih primerov ostaja salmonela ena najpogostejših povzročiteljic črevesnih okužb v Evropi (1–7).

Če privzamemo, da so jajca in perutnina najpomembnejši vir salmonel za človeka v Evropi, je visok delež izolatov *S. Enteritidis* v Sloveniji pričakovani (11–13). Podatki, ki jih je EFSA posredovala slovenska veterinarska stroka v letih 2004 do 2010, kažejo, da se (1–7):

- deleži vseh pozitivnih jat med jatami kokoši nesnic gibljejo med 0,3 (leto 2006) in 10,5 % (leto 2008),
- deleži vseh pozitivnih jat med jatami brojlerjev gibljejo med 0,3 % (leto 2008) in 1,8 % (leto 2007),
- deleži vseh pozitivnih vzorcev, odvzetih v fazi procesiranja po zakolu gibljejo med 0 in 3,3 % (leto 2004) in
- deleži vseh pozitivnih vzorcev mesa brojlerjev v prodaji gibljejo med 0,6 % (leto 2008) in 7,4 % (leto 2004).

Dejstvo, da je večina deležev v opazovanem obdobju nižja od evropskega povprečja, podpira domnevo, da k številu salmoneloz in visokemu deležu *S. Enteritidis* v Sloveniji prispevajo tudi jajca in meso iz uvoza. V Evropi strokovnjaki ugodne trende na področju salmoneloz pripisujejo ukrepom, izvedenim v veterini, zlasti cepljenju vseh vrst jat kokoši nesnic in piščancev za rejo. EFSA je vzpostavila sistem postavljanja in preverjanja doseganja ciljev v državah članicah glede deležev jat, ki so pozitivne na salmonele. Slovenija je v letu 2010 cilje preseгла (7).

Porast deležev *S. Typhimurium* je v Sloveniji posledica upadanja deleža izolatov *S. Enteritidis* in padanja skupnega števila izolatov,

saj se skupno število primerov z leti ni pomembno spreminjalo. Najnižje število (49) smo zabeležili v letu 2009, najvišje (85) pa v letu 2001. Podatki o pogostosti *S. Typhimurium* med prašiči, ki veljajo za najpomembnejši, ne pa edini vir te salmonеле v Evropi, se za Slovenijo kontinuirano poročajo le za vzorce, vzete v fazi procesiranja po zakolu. Podatek o deležu pozitivnih vzorcev v prodaji je na voljo le za leto 2007, ko je znašal 0,3% pozitivnih vzorcev (4). Delež vseh pozitivnih vzorcev v fazi procesiranja po zakolu je v letu 2009 znašal 0,3%, v vseh ostalih letih 2004–2010 pa 0% (1–7). Tudi pri prašičjem mesu podatki nakazujejo, da bi bilo potrebno raziskati, kolikšen delež primerov okužb je posledica uživanja mesa iz uvoza in kolikšen delež primerov lahko pripišemo razmeram v domači vzreji.

Na splošno se v Evropi povečujejo prizadevanja, da bi kvantitativno ocenili prispevek posamezne vrste mesa oziroma kategorije izdelkov k skupnemu številu salmoneloz. V letu 2006 je Evropska komisija strokovnjakom EFSA dala nalogo, da podajo kvantitativno oceno prispevka posameznih kategorij hrane k skupnemu bremenu salmoneloz v Evropi. V svojem odgovoru, ki je izšel leta 2008, so ocenili, da zbrani podatki tega ne omogočajo, pač pa so nakazali metode, s katerimi bi to bilo mogoče opredeliti: analiza podatkov o izbruhih, uporaba analitičnih epidemioloških podatkov o sporadičnih primerih salmoneloz, uporaba podatkov, dobljenih z obsežnimi subtipizacijami izolatov, primerjav kvantitativnih ocen tveganja in strukturirana izvedenska mnenja (11).

Kasneje sta bili objavljeni dve kvantitativni oceni na evropskem nivoju. Prvo je bilo kot zunanje znanstveno poročilo predloženo EFSA, v njem pa so strokovnjaki ocenili, da 43,8% salmoneloz v Evropi botrujejo jajca, 26,9% prašičje meso, 4% puranje meso, 3,4% pa meso brojlerjev (12). Strokovnjaki EFSA so v letu 2011 ocenili, da 65% primerom botrujejo jajca, 28% prašičje meso, 4,5% puranje meso, 2,4% pa meso brojlerjev (13). Glede na to, da je epidemiološka slika v vsaki državi drugačna, bi bilo potrebno takšno oceno izdelati za vsako državo posebej. Porazdelitev serotipov se med državami razlikuje zaradi različne porazdelitve serotipov med živalmi, razlik v pogojih, ki vladajo v vzreji živali, zaradi raz-

ličnih higienskih praks med predelavo in pripravo hrane ter zaradi razlik v prehranjevalnih navadah. Avtorjem ni znano, če je bila takšna ocena izdelana za Slovenijo.

Tudi o občutljivosti povzročiteljev zoonoz sta EFSA in ECDC izdelala podrobno poročilo, v katerem najdemo podatke o občutljivosti humanih izolatov vseh ne-tifoidnih serotipov skupaj, humanih izolatov *S. Enteritidis*, humanih izolatov *S. Typhimurium* in trende odpornosti po antibiotikih do leta 2010. Predstavljani so tudi podatki o občutljivosti živalskih izolatov, iz različnih vrst mesa (piščančje, svinjina, goveje meso, puranje meso) za vse salmonele skupaj in posebej za *S. Enteritidis* in *S. Typhimurium* ter trendi po antibiotikih za enako časovno obdobje. V veterinarskem delu so podatki zelo heterogeni, saj po posameznih – skupaj osmih – kategorijah poroča od 1 do 18 držav. Slovenija je podatke prispevala za humane izolate in za 3 od 8 veterinarskih skupin (7, 14).

Ključne ugotovitve strokovnjakov, ki so pripravljali skupno poročilo glede odpornosti izolatov salmonel, so (1, 7):

- Določanje občutljivosti za antibiotike za salmonele v večini medicinskih mikrobioloških laboratorijev, ki so prispevali podatke, poteka s pomočjo metode difuzije v agarju z diski, za interpretacijo rezultatov pa se uporabljajo klinične mejne vrednosti.
- Določanje občutljivosti za antibiotike za salmonele v večini veterinarskih mikrobioloških laboratorijev, ki so prispevali podatke, poteka s pomočjo določanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) z dilucijsko metodo, za interpretacijo rezultatov pa se uporabljajo epidemiološke mejne vrednosti.
- Ker se uporabljajo različni interpretacijski kriteriji, je ob uporabi epidemioloških interpretacijskih kriterijev več izolatov opredeljenih kot odpornih.
- Med humanimi izolati so deleži izolatov, odpornih proti ciprofloksacinu in nalidiksični kislini večji med izolati *S. Enteritidis* (0–19% in 5,5–71,9%) kot *S. Typhimurium* (0–20,1% in 3,7–24,0%).
- Odpornost obeh prevladujočih serotipov proti cefotaksimu je nizka tako med humanimi izolati (0–4% pri *S. Enteritidis* in 0–6,3% pri *S. Typhimurium*) kot med izolati pri živalih in iz mesa (0–6%).

Za Slovenijo ne velja četrta ugotovitev, saj so deleži izolatov, odpornih proti kinolonam, večji med izolati *S. Typhimurium* kot med izolati *S. Enteritidis*. Od množice podatkov, ki so jih posredovali veterinarski laboratoriji, lahko za primerjavo slovenskih humanih in veterinarskih podatkov uporabimo le podatke o občutljivosti 11 izolatov *S. Typhimurium*, izoliranih pri prašičih. V vseh drugih kategorijah, v katerih je Slovenija prispevala podatke, so namreč podani deleži za vse salmonele skupaj, kar pa ni smiselno, če vemo, da visoka odpornost izolatov *S. Typhimurium* povsem popači skupne podatke. Primerjave deležev niso primerne tudi zaradi nizkega števila testiranih veterinarskih izolatov. Kljub temu lahko rečemo, da je rezistenčni profil humanih izolatov in izolatov pri prašičih z izjemo odpornosti proti ciprofloksacinu podoben.

Ker se nabor zbranih podatkov v slovenski laboratorijski mreži z leti ni spreminjal in v državi ni interesa, da bi vzpostavili pravi LBS (zbiranje celovitih podatkov, tipizacija vseh izolatov, javljanje suma na epidemijo glede na rezultate analiz laboratorijskih podatkov in drugo) za določene povzročitelje, med njimi salmonele, pomembnih novih spoznanj iz podatkov ni mogoče razbrati. Najpomembnejša je ugotovitev, da se kljub drastičnemu spreminjanju števila izolatov razmerja med deleži prevladujočih serotipov in deleži odpor-

nih izolatov ne spreminjajo z enako dinamiko. Iz tega bi lahko sklepali, da so sevi povzročitelji pri nas endemski, da pa je njihovo širjenje vse bolj obvladano. Skoraj desetletno prisotnost prevladujočih tipov *S. Enteritidis*, določenih z gelsko pulzno elektroforezo (angl. *pulse-field gel electrophoresis*, PFGE), je pokazala slovenska raziskava, ki smo jo izvedli na humanih in živalskih izolatih in so bili podatki, ki smo jih v raziskavi pridobili, doslej le delno objavljeni (15). Da širjenje salmonel v Sloveniji bolje obvladujemo, podpira tudi podatek, da se število prijavljenih epidemij s tem povzročiteljem nenehno zmanjšuje in v letu 2010 nismo zabeležili nobene prijave (neobjavljeni podatki).

ZAKLJUČEK

Kljub upadanju števila bolnikov s salmonelo le-ta ostaja ena najpogostejših črevesnih okužb, ne le v Sloveniji, temveč povsod v Evropi. Trenda pojavljanja prevladujočih dveh serotipov sta podobna trendom v Evropi. Podatki o odpornosti izolatov kažejo, da največji del odpornosti prispevajo večkratno odporni sevi *S. Typhimurium*, zato bi bilo smiselno raziskati pota širjenja določenih sevov. Da bi izboljšali koristnost zbranih podatkov, bi v Sloveniji morali izboljšati LBS.

LITERATURA

1. European Food Safety Authority. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European union in 2004. Parma: EFSA; 2006. p. 2-320.
2. European Food Safety Authority. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European union in 2005. The EFSA Journal [internet]. 2006 [citirano 2012 Jul 9]; 94: 2-288. Dosegljivo na: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/94r.pdf>
3. European Food Safety Authority. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European union in 2006. The EFSA Journal [internet]. 2007 [citirano 2012 Jul 9]; 130: 2-352. Dosegljivo na: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/130r.pdf>
4. European Food Safety Authority. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European union in 2007. The EFSA Journal [internet]. 2009 [citirano 2012 Jul 9]; 223: 3-320. Dosegljivo na: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/223.pdf>
5. European Food Safety Authority. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European union in 2008. The EFSA Journal [internet]. 2010 [citirano 2012 Jul 9]; 1438: 2-368. Dosegljivo na: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1438.pdf>

6. European Food Safety Authority. The European union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. The EFSA Journal [internet]. 2011 [citirano 2012 Jul 9]; 2090 2–378. Dosegljivo na: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2090.pdf>
7. European Food Safety Authority. The European summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. The EFSA Journal [internet]. 2012 [citirano 2012 Jul 9]; 2598: 2–233. Dosegljivo na: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2598.pdf>
8. Štorman A, Orešič N, Zrimšek R, et al. Spremljanje serotipov in občutljivosti salmonel za antibiotike v Sloveniji. In: Žohar Čretnik T, Gubina M, eds. Sanitarna mikrobiologija v javnem zdravstvu 2002. Zbornik predavanj. Ljubljana: Sekcija za klinično mikrobiologijo in hospitalne infekcije SZD; 2002. p. 121–32.
9. Štorman A, Žohar Čretnik T, Orešič N, et al. Pojavljanje in občutljivost salmonel za antibiotike v Sloveniji. Med Razgl. 2006; 45 Suppl. 2: 95–102.
10. European Food Safety Authority. The Community summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European union in 2004–2007. The EFSA Journal [internet]. 2010 [citirano 2012 Jul 9]; 1309; 2–304. Dosegljivo na: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1309.pdf>
11. European Food Safety Authority. A quantitative microbiological risk assessment on Salmonella in meat: Source attribution for human salmonellosis from meat. Scientific opinion of the panel on biological hazards. The EFSA Journal [internet]. 2008 [citirano 2012 Jul 9]; 625: 1–32. Dosegljivo na: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/625.pdf>
12. European Food Safety Authority. Scientific opinion on a quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of Salmonella in broilers. The EFSA Journal [internet]. 2011 [citirano 2012 Jul 9]; 2106: 1–94. Dosegljivo na: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2106.htm>
13. European Food Safety Authority. Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human Salmonella infections in the European Union. Scientific/technical report submitted to EFSA [internet]. 2011 [citirano 2012 Jul 9]. Dosegljivo na: <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/184e.htm>
14. European Food Safety Authority. The Community summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European union in 2010. The EFSA Journal [internet]. 2010 [citirano 2012 Jul 9]; 2598; 2–304. Dosegljivo na: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2598.pdf>
15. Pate M, Mičunovič J, Bole-Hribovšek V, et al. Investigation of two Salmonella serovar Enteritidis outbreaks using the pulsed-field gel electrophoresis: a good example of collaboration at the national level. Slov Vet Res. 2011; 48 (3/4): 99–105.

Ingrid Berce¹, Igor Gruntar²

Kampilobakterioza – pojavnost in nadzor pri ljudeh in perutnini v Sloveniji

Campylobacteriosis – Occurrence and Monitoring of Humans and Poultry in Slovenia

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: kampilobakterioza, *Campylobacter* spp., *Campylobacter jejuni*, monitoring, spremljanje, protimikrobna odpornost, Slovenija

Kampilobakterioza je vodilna bakterijska zoonoza v Evropi in drugje po svetu. Odpornost kampilobaktrov proti številnim antibiotikom, še posebej proti kinolonom, kakor tudi pomanjkanje učinkovitih metod za kontrolo širjenja takih sevov predstavlja velik javnozdravstveni problem in grožnjo za človeštvo. Namen našega prispevka je predstaviti mikrobiološke in epidemiološke podatke o pojavljanju *Campylobacter* spp. pri ljudeh v Sloveniji in Evropski skupnosti v letih od 2007 do 2011 in primerjati podatke o protimikrobni odpornosti humanih in perutninskih izolatov *C. jejuni* v Sloveniji v istem obdobju. V preiskovanem obdobju smo v Sloveniji osamili 4.998 humanih in 1.950 perutninskih izolatov *Campylobacter* spp. Pri ljudeh in perutnini je prevladoval *C. jejuni*, ki je bil najpogosteje osamljen pri otrocih, starih do 5 let (24,3 %). V Sloveniji je bila incidenca kampilobakterioz v obdobju 2007–2010 vedno višja od evropskega povprečja in je od leta 2008 stalno naraščala; leta 2010 je dosegla 49,9/100.000 prebivalcev. Odpornost humanih sevov *C. jejuni* je ostala ves omenjeni čas zelo nizka proti gentamicinu (0,2–1 %), nizka proti eritromicinu (0,4–2,5 %), srednja proti tetraciklinu (7,8–19,1 %) oz. visoka le leta 2009 (21,5 %). Prevalenca proti ciprofloksacinu odpornih humanih sevov je ostala vse obdobje zelo visoka in stabilna (58,2–67,2 %). Brojlerji so bili kolonizirani s kampilobaktromi v 73–88 %, trupi v 81–93 %, meso pa v 49–79 % vzorcev. Odpornost perutninskih izolatov *C. jejuni* je bila naslednja: nizka proti eritromicinu in gentamicinu (0–2,6 %), zelo visoka proti tetraciklinu (56–64,8 %) oz. visoka le leta 2008 (32 %) in vseskozi ekstremno visoka proti ciprofloksacinu (72,2–92,1 %). V Sloveniji izstopata visok delež s kampilobaktromi kolonizirane perutnine in zaskrbljujoča ekstremno visoka odpornost *C. jejuni* proti kinolonom pri ljudeh in perutnini.

ABSTRACT

KEY WORDS: campylobacteriosis, *Campylobacter* spp., *Campylobacter jejuni*, monitoring, surveillance, antimicrobial resistance, Slovenia

Campylobacteriosis is the leading bacterial zoonosis in Europe and worldwide. Antimicrobial resistance of campylobacters to antibiotics, especially to quinolones and a lack of adequate measures to control the spread of infections from contaminated food to humans represent a huge public health problem and threat. The aim of our article is to (i) illustrate the microbiology and epidemiology of campylobacters in humans in the European Union and in Slovenia in

¹ Ingrid Berce, dr. vet. med., Zavod za zdravstveno varstvo Nova Gorica, Vipavska cesta 13, 5000 Nova Gorica; ingrid.berce@zzv-go.si

² Znan. sod. dr. Igor Gruntar, dr. vet. med., Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, 1000 Ljubljana

the period from 2007 to 2011 and (ii) to compare antimicrobial drug resistance patterns of Slovene human *Campylobacter jejuni* isolates in the same period with those isolated from broilers, broiler carcasses and broiler meat in 2008, 2009 and 2010 obtained through the monitoring program. In the monitoring period, the total of 4,998 human and 1,950 broiler *Campylobacter* spp. were isolated in Slovenia and characterized. *Campylobacter jejuni* was the most frequently isolated species both in humans and broilers. The highest prevalence of *Campylobacter* infection was in children younger than 5 (24.3%). The incidence of human campylobacteriosis was all the time higher than the median European value. It has been increasing since 2008 and ranged 49.9/100,000 inhabitants in 2010. The resistance of human *C. jejuni* isolates in the period from 2007 to 2011 to gentamycin remained at very low levels (0.2–1%) and at low levels to erythromycin (0.4–2.5%). The resistance level of *C. jejuni* to tetracycline was moderate (7.8–19.1%) in 2007, 2008, 2010 and 2011 and high in 2009 (21.5%). The prevalence of ciprofloxacin resistant human *C. jejuni* remained very high and stable throughout this period (58.2–67.2%). The colonisation rate of campylobacters in broilers, broiler carcasses and broiler meat ranged from 73% to 88%, 81% to 93% and 49% to 79%, respectively. The resistance rate of broiler *C. jejuni* was: low to erythromycin and gentamycin (0–2.6%), very high to tetracycline (56–64.8%) and only exceptionally high in 2008 (32%), and extremely high to ciprofloxacin (72.2–92.2%) from 2008 to 2011. The high level of colonised broilers and contaminated broiler meat with campylobacters and extremely high resistance to ciprofloxacin in human and broiler *C. jejuni* isolates have become a major concern in Slovenia.

UVOD

Kampilobakterioza kot akutni enteritis je Skirrow pri človeku prvič opisal kot »novo« bolezen šele leta 1977 (1). Danes je to ena najbolj pogostih bakterijskih zoonoz v razvitih državah po celem svetu, najpogosteje osamljeni povzročitelj akutnega gastroenteritisa pa je *Campylobacter jejuni* (2, 3). Bolezen poteka v obliki akutne driske, večinoma sporadično in redkeje v izbruhih. Pojavlja se v razvitem in nerazvitem svetu pri vseh starostnih skupinah. V razvitem svetu je asimptomatsko klicečnostvo kampilobaktrov zelo redko (0,0–1,3%), v tropskih in hiperendemijskih nerazvitih delih sveta pa pogosto, predvsem pri sicer zdravih otrocih do 5 let in znaša tudi do 29% (2). Kampilobaktiri so prisotni povsod v naravi in so del normalne črevesne mikrobiote številnih živali. Njihov rezervoar so domače in divje živali, predvsem ptice, še zlasti industrijska perutnina, našli pa so jih tudi pri hišnih ljubljenceh, v nepasteriziranem mleku, v tekočih in površinskih vodah, v slani vodi, zemlji, pesku, odpadkih in pri ljudeh (4). Kot fekalne bakterije kampilobaktiri torej pogosto kontaminirajo okolje, glavni vir okužbe pa je zaradi specifične tehnologije klanja na klavni liniji

kontaminirano perutninsko meso. Prav uživanju termično nezadostno obdelanega piščančjega mesa in rokovanju z njim gre pripisati 20–30% primerov humanih kampilobakterioz (5). Ocenjeno je, da je 50–80% primerov kampilobakterioz povezanih s perutnino (brojlerji) kot rezervoarjem v celoti. Sevi iz tega rezervoarja lahko človeka dosežejo ne le preko hrane, ampak tudi preko okolja ali s posrednim kontaktom (6). Povprečna stopnja kontaminiranosti piščančjega mesa v klavnicah v Evropski uniji (EU) od leta 2006 do leta 2010 je bila stabilna in visoka ter je znašala 30%. Med članicami EU pa je prevalenca zelo nihala, in sicer 3,1–90,0% pozitivnih vzorcev. Z najvišjo prevalenco kontaminacije mesa brojlerjev (zelo visoko > 50% in ekstremno visoko > 70%) so se soočale Avstrija, Madžarska, Irska, Luksemburg, Poljska, Slovenija in Španija (3).

V zadnjem desetletju je trend odpornosti *Campylobacter* spp. proti antibiotikom, ki se uporabljajo za zdravljenje ljudi in živali, strmo naraščal. Kampilobakterioza je obolenje, ki zahteva zdravljenje z makrolidi ali s kinoloni le v redkih primerih težjih potekov. Zaskrbljujoče naraščanje odpornosti, še pose-

bej proti ciprofloksacinu, postaja velik javno-zdravstveni problem v svetu, saj se odporni sevi širijo v prehranski verigi. Ciprofloksacin je Svetovna zdravstvena organizacija uvrstila med kritično pomembne antibiotike v humani medicini (7). Odpornost proti fluorokinolonom je v glavnem posledica uporabe le-teh v proizvodnji živali za prehrano ljudi in je začela naraščati po začetku uporabe v veterinarski medicini (7–9). Države, ki so ukini-le uporabo protimikrobnih zdravil kot t.i. spodbujevalcev rasti pri živalih in so dopustile le zelo restriktivno uporabo fluorokinolonov za zdravljenje živali, so se soočile s padanjem odpornosti in z nizko ali zelo nizko prevalenco odpornosti proti kinolonom tako pri humanih kot pri živalskih izolatih *Campylobacter* spp. (8, 10, 11).

Z namenom pridobivanja čim bolj primerljivih podatkov o pojavnosti in protimikrobni odpornosti bakterij, ki so podlaga za ukrepanje, je EU izdala Evropsko direktivo 2003/99/EC kot osnovni okvir, ki članicam EU predpisuje sistem za monitoring in zbiranje relevantnih ter čim bolj primerljivih podatkov o zoonozah, povzročiteljih zoonoz, njihovi protimikrobni odpornosti in izbruhih alimentarnih toksikoinfekcij pri človeku, živalih, v hrani in krmilih. Na osnovi tega dokumenta članice EU letno poročajo Evropski komisiji, Evropska agencija za varnost hrane (angl. *European food safety authority*, EFSA) pa objavlja skupna letna poročila. Na humanem področju od leta 2005 sodeluje še Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. *European centre for disease prevention and control*, ECDC) s programom Tessa za spremljanja zoonotskih okužb pri človeku (3).

MATERIALI IN METODE

Nacionalni sistem spremljanja okužb s *Campylobacter* spp. in protimikrobne odpornosti *Campylobacter jejuni* pri ljudeh v Sloveniji med letoma 2007 in 2011

V prispevku prikazujemo podatke o pojavnosti kampilobakterioz v EU in v Sloveniji v obdobju od leta 2007 do leta 2010, ki smo jih povzeli po poročilih EFSA (3, 6, 12–14). Prikazani so tudi mikrobiološki in epidemiološki

ki podatki, pridobljeni iz nacionalnega programa (NP) spremljanja kampilobakterioz pri ljudeh, ki poteka v Sloveniji na humanem področju od leta 2007 in je nastal na pobudo Laboratorija za klinično mikrobiologijo Zavoda za zdravstveno varstvo Nova Gorica ter slovenskih kliničnih/medicinskih mikrobiologov. V mreži sodeluje vseh devet slovenskih kliničnih mikrobioloških laboratorijev, ki sistematično izvajajo laboratorijsko diagnostiko bakterijskih povzročiteljev črevesnih okužb. Uporabljeni so bili zbirni podatki o laboratorijsko potrjenih prvih primerih kampilobakterioz pri bolnikih v Sloveniji od leta 2007 do 2011, o vrsti povzročitelja iz rodu *Campylobacter* spp., starosti in spolu bolnikov, datumu sprejema vzorca v laboratorij in rezultatih testiranja odpornosti proti klinično pomembnim antibiotikom: ciprofloksacinu, eritromicinu, gentamicinu in tetraciklinu. Kampilobaktri so bili osamljeni iz iztrebkov bolnikov neposredno na selektivnih in posredno preko membranskih filtrov na neselektivnih gojiščih ter laboratorijsko potrjeni v skladu s standardnimi bakteriološkimi metodami (15). Protimikrobna občutljivost je bila testirana z metodo difuzije v agarju z diski po priporočilih Francoskega združenja za mikrobiologijo (fr. *Société Française de Microbiologie*, SFM). Podatki spremljanja so bili obdelani v programu Excel.

Nacionalni sistem spremljanja kolonizacije in kontaminacije s *Campylobacter* spp. ter protimikrobne odpornosti *Campylobacter jejuni* pri perutnini v Sloveniji med letoma 2008 in 2011

V prispevku prikazujemo tudi rezultate raziskave sevov *Campylobacter* spp. iz vzorcev iztrebkov, kože in mesa pitovnih piščancev (brojlerjev) na klavni liniji, ki so bili izolirani na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani v okviru delovanja Nacionalnega veterinarskega inštituta. Izolati so bili pridobljeni v okviru evropske Temeljne študije (TŠ) o razširjenosti in protimikrobni odpornosti bakterij *Campylobacter* spp. in *Salmonella* spp. v jatah pitovnih piščancev iz leta 2008 ter v okviru Programa monitoringa (PM) zoonoz in njihovih povzročiteljev –

spremljanje *Campylobacter* spp. pri brojlerjih v letih 2009, 2010 in 2011, vse v sodelovanju z Veterinarsko upravo Republike Slovenije.

Za osamitev kampilobaktrov so bile uporabljene bakteriološke metode in standardi ISO 10272-1:2006 in ISO/TS 10272-2:2006 ter priporočila EURL (angl. *European Union Reference Laboratory*) za izolacijo bakterij iz blata. Občutljivost sevov za protimikrobna zdravila je bila opravljena z metodo mikrodilucije in določanjem minimalne inhibitorne koncentracije za antibiotike na EUCAMP Sensititre® ploščah (TREK Diagnostics) v skladu z navodili proizvajalca in po kriterijih EUCAST (angl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Predstavljeni so rezultati odpornosti proti ciprofloksacinu, eritromicinu, gentamicinu in tetraciklinu.

REZULTATI IN RAZPRAVA

Kampilobakterioza pri človeku v Sloveniji med letoma 2007 in 2011

V Sloveniji je bila incidenca kampilobakterioz v obdobju 2007–2010 vedno višja od evropskega povprečja in je od leta 2008 stalno naraščala, leta 2010 je dosegla 49,9/100.000 prebivalcev (tabela 1).

Po podatkih EFSA je bil v obdobju 2006–2010 opazen statistično značilen in konstanten trend naraščanja humanih kampilobakterioz v EU, še najbolj od leta 2008 dalje. Izrazit porast so beležili na Cipru, v Estoniji, Franciji, Luksemburgu, na Malti, Nizozemskem in Poljskem, medtem ko je bil statistično značilen trend upadanja opazen v Belgiji (3,12–14). Slovenija sodi med države z inciden-

co nad evropskim povprečjem, vendar pod 70/100.000 prebivalcev, kamor se uvrščajo tudi Avstrija, Malta, Nizozemska, Španija in Norveška. Države z najvišjo incidenčno stopnjo/100.000 prebivalcev v letu 2010 so bile Češka (200,58), Luksemburg (119,51) in Združeno kraljestvo Velike Britanije in Severne Irske (113,37), sledijo pa Švedska, Švica in Slovaška (>80), Nemčija, Finska, Danska in Madžarska (>70) (3). Obstaja verjetnost, da je incidenca kampilobakterioz v EU močno podcenjena in je dejanska višja, saj so nizozemski raziskovalci ocenili, da je bil leta 2009 le 1/47 (95 % interval zaupanja 14–117) primerov kampilobakterioz dejansko prijavljen (16). Iz tabele 1 je razvidno, da je delež uvoženih primerov v Sloveniji bistveno nižji kot v EU, kar pa morda ne odraža dejanskega stanja, saj v sistemu NP večina podatkov o potovanjih v tujino manjka.

V letih od 2007 do 2011 smo v Sloveniji iz iztrebkov bolnikov izolirali 4.998 bakterij iz rodu *Campylobacter* spp. Med njimi je prevladoval *C. jejuni* (90 %), sledil je *C. coli* (5 %) in v 5 % so bili osamljeni t. i. ne-jejuni-ne-koli kampilobaktiri. V petih letih opazovanja ni bilo opaziti znatnega spreminjanja števila laboratorijsko potrjenih primerov humanih kampilobakterioz. Vseskozi pa je bilo zaznati izrazito sezonsko povečano pojavljanje v toplejših mesecih leta od maja do konca septembra, kar je značilno za zmerni pas (3). Najvišja prevalenca kampilobakterioz je bila opazna v starostni skupini od 0 do 4 let (24,3 %), sledila ji je starostna skupina 25 do 44 let (17,7 %), v ostalih starostnih skupinah pa smo beležili nižjo prevalenco kampilobakterioz (11,7–16,2 %).

Po naših podatkih je v Sloveniji v obdobju 2007–2011 zbolelo vsako leto več moških (56,2 %) kot žensk (43,8 %). Vsi omenjeni po-

Tabela 1. Število prijavljenih primerov, incidenca ter delež uvoženih primerov humanih kampilobakterioz v Sloveniji in v Evropski uniji v obdobju 2007–2010. N – število prijavljenih primerov, incidenca – število prijavljenih primerov/100.000 prebivalcev, SLO – Slovenija, EU – Evropska unija, uvoz – delež uvoženih.

Leto	2007		2008		2009		2010	
	N	Incidenca	N	Incidenca	N	Incidenca	N	Incidenca
SLO	1.127	56,1	898	44,3	952	46,5	1.022	49,9
Uvoz (%)	0,6%		0%		0,5%		0,2%	
EU	200.507	45,2	190.566	40,7	198.252	45,6	212.064	48,6
Uvoz (%)	6,8%		7,5%		4%		6,3%	

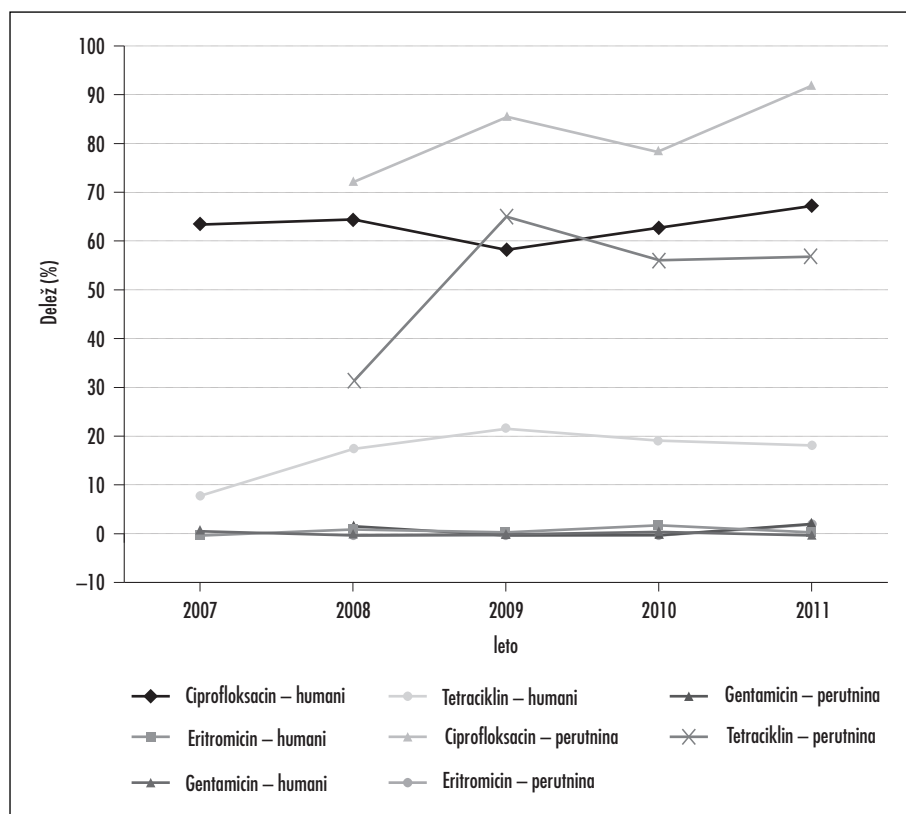
datki so primerljivi s podatki v drugih državah EU (3). Kar 40,5% *Campylobacter* spp. v Sloveniji je bilo osamljenih pri otrocih, mlajših od 15 let, kar je sicer ugodneje kot na Portugalskem (69,1%), vendar pa se je v obdobju 2008–2011 skoraj 44% otrok v tej starosti okužilo s sevi *C. jejuni*, odpornimi proti cipro-

floksacinu, kar je zaskrbljujoče, saj so otroci skupina, ki ne prejema kinolonov (17).

Tabela 2 prikazuje število in deleže odpornih humanih izolatov *C. jejuni*, ki so odporni proti ciprofloksacinu, eritromicinu, gentamicinu in tetraciklinu, na sliki 1 pa je grafična primerjava deleža takšnih sevov pri ljudeh in

Tabela 2. Število in delež odpornih humanih sevov *Campylobacter jejuni*, osamljenih v Sloveniji v letih 2007–2011. N – število testiranih sevov *C. jejuni*.

Antibiotik	Število in delež (%) odpornih humanih izolatov <i>C. jejuni</i>				
	2007	2008	2009	2010	2011
	N = 1.020	N = 817	N = 862	N = 913	N = 883
Ciprofloksacin	647 (63,4)	526 (64,4)	502 (58,2)	572 (62,7)	593 (67,2)
Eritromicin	4 (0,4)	13 (1,6)	9 (1,0)	23 (2,5)	9 (1,0)
Gentamicin	10 (1,0)	2 (0,2)	3 (0,4)	8 (0,9)	2 (0,2)
Tetraciklin	80 (7,8)	142 (17,4)	178 (21,5)	175 (19,1)	160 (18,1)



Slika 1. Delež odpornih izolatov *C. jejuni* pri ljudeh in perutnini proti ciprofloksacinu, eritromicinu, gentamicinu in tetraciklinu v Sloveniji v letih 2007–2011 oz. 2008–2011.

pri perutnini v Sloveniji, ki so bili testirani v okviru TŠ in PM.

Iz tabele 2 je razvidno, da je bilo v Sloveniji v obdobju 2007–2011 največ humanih izolatov *C. jejuni* odpornih proti ciprofloksacinu. Odpornost proti ciprofloksacinu je v opazovanem obdobju narasla v primerjavi s preteklim obdobjem (2004 – 48-odstotna odpornost na Goriškem in 2006 – 56,2-odstotna odpornost v Ljubljanski regiji) (18, 19). Po kriterijih EFSA je bila odpornost proti ciprofloksacinu vse obdobje zelo visoka, višja od EU povprečja in se ni bistveno spreminjala. Najvišjo odpornost proti ciprofloksacinu so zabeležili leta 2010 na Malti (72,4%). Odpornost, primerljivo s Slovenijo, sta imeli Italija in Litva, druge EU članice pa so leta 2010 beležile nižjo odpornost od Slovenije (od 42,5% Združeno kraljestvo Velike Britanije in Severne Irske do 53,9% Avstrija) (3). Zelo nizko odpornost proti kinolonom imajo v svetu tam, kjer so ukinili in prepovedali uporabo fluorokinolonov v živinoreji, tj. v skandinavskih državah in Avstraliji, najvišjo (80–90%) pa na Tajskem, Portugalskem in v Španiji, kar je večinoma posledica uporabe teh antibiotikov v reji živali za prehrano ljudi (7, 8, 10, 17).

Ciprofloksacin je drugo zdravilo izbora za zdravljenje humane kampilobakterioze pri odraslih. Ker je kampilobakterioza najpogostejša bakterijska zoonoza v Sloveniji in odpornost slovenskih izolatov *C. jejuni* proti ciprofloksacinu presega 60%, je ciprofloksacin verjetno že neprimeren za empirično terapijo bakterijskih drisk. Driske, ki zahtevajo zdravljenje, je zato potrebno etiološko opredeliti in zdraviti po antibiogramu.

Tetraciklin in gentamicin se lahko uporabljata za sistemsko zdravljenje kampilobakterioz, odpornih proti makrolidom ali fluorokinolonom (7, 8, 10). Odpornost pri humanih izolatih *C. jejuni* proti tetraciklinu je bila srednje stopnje (<20%) v letih 2007, 2008 in 2010 oz. visoka leta 2009 (21,5%) po kriterijih EFSA. Izkazana odpornost humanih izolatov proti tetraciklinu in zelo visoka prevalenca proti tetraciklinu odpornih sevov *C. jejuni* pri perutnini, ki je verjetno posledica široke uporabe teh zdravil v veterinarski medicini, omejujeta možnost uporabe tetraciklinov v humani medicini (slika 1, tabela 4). Nasprotno pa ostaja visoko ohranjena občutljivost humanih in perutninskih izolatov *C. jejuni* za gentamicin.

Eritromicin je zdravilo izbora za zdravljenje humane kampilobakterioze (4). Odpornost proti eritromicinu je z izjemo Malte (10,2%) in Združenega kraljestva Velike Britanije in Severne Irske (5,4%) nizka povsod v EU (povprečno 1,7% leta 2010), trend pa stabilen. Enako je v Sloveniji, saj delež odpornih izolatov *C. jejuni* ne presega 2,5%. Glede na nizko stopnjo odpornosti izolatov *C. jejuni* tudi pri perutnini v Sloveniji ostaja eritromicin še vedno učinkovito zdravilo za zdravljenje humane kampilobakterioze.

Kampilobaktri pri perutnini v Sloveniji med letoma 2008 in 2011

C. jejuni je bil tudi pri perutnini v Sloveniji vsa leta najpogostejše osamljena vrsta med 1.950 izolati kampilobaktrov (tabela 3).

Tabela 3. Število vzorcev in delež s kampilobaktri kolonizirane perutnine in s kampilobaktri kontaminiranih piščančjih trupov in mesa ter delež vzorcev po vrstah *Campylobacter* spp. v Sloveniji v obdobju 2008–2011. N – število vzorcev, poz. – pozitivni vzorci, CJ – *Campylobacter jejuni*, CC – *Campylobacter coli*, CL – *Campylobacter lari*, nt – ni testirano.

Leto	feces iz slepega črevesa					trupci – koža					meso				
	N	% poz.	% CJ	% CC	% CL	N	% poz.	% CJ	% CC	% CL	N	% poz.	% CJ	% CC	% CL
2008	420	77	49	35	0,7	420	81	53	36	0	nt	nt	nt	nt	nt
2009	157	73	54	30	0,6	149	84	59	33	0	101	67	41	29	0
2010	100	88	59	36	1,0	99	93	65	39	2	100	79	49	31	0
2011	100	77	59	24	1,0	100	92	76	26	0	204 ^a	49	37	13	0,5

^a meso 2011: perutninsko meso in perutninski pripravki

Tabela 4. Delež odpornih izolatov *Campylobacter jejuni*, osamljenih pri perutnini, v Sloveniji v letih 2008–2011. Izolati so bili osamljeni iz fecesa brojlerjev, kože piščančjih trupov med klavnim procesom in piščančjega mesa pred hlajenjem. N – število testiranih sevov.

Antibiotik	Število in delež (%) odpornih sevov <i>C. jejuni</i> pri perutnini (N = 347)			
	2008 N = 97	2009 N = 74	2010 N = 100	2011 N = 76
Ciprofloksacin	70 (72,2)	63 (85,1)	78 (78,0)	70 (92,1)
Eritromicin	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (2,6)
Gentamicin	2 (2,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (2,6)
Tetraciklin	31 (32,0)	48 (64,8)	56 (56,0)	43 (56,6)

Po podatkih iz tabele 3 se Slovenija uvršča med evropske države z ekstremno visokim deležem s kampilobaktri koloniziranih brojlerjev, leta 2010 so odkrili celo 88 % pozitivnih fecesov in 93 % kontaminiranih trupov zaklanih živali. Tako visoki deleži so bili ugotovljeni še v Španiji, na Češkem, v Franciji in na Madžarskem. Z nizko prevalenco se lahko pohvalijo le Estonija in skandinavske države (3). Znano je, da incidenca kolonizacije s *Campylobacter* spp. pri brojlerjih in incidenca kampilobakterioz pri ljudeh kažeta skladno sezonsko pojavljanje in sta povezani s pomladnim dvigom temperature ozračja v zmernem pasu. Ker so ptice v tem času bolj kontaminirane s kampilobaktri, se brojlerji pri klanju lahko močno kontaminirajo, kar poleg navzkrižne kontaminacije pri pripravi hrane prispeva k sezonskemu dvigu incidence humane kampilobakterioze. Bolj kot prevalenca kontaminiranih brojlerjev je pomembna koncentracija kampilobaktrov na mesu in na končnem preslabo termično pripravljenem živilu (20, 21). Na Danskem so leta 2002 med 712 preiskanimi našli kar 42 % piščancev, pozitivnih na kampilobakter, med katerimi so nekateri vsebovali > 4000 CFU/g (angl. *colony-forming units*) bakterij (4). Ker je infektivni odmerek za človeka 500–1000 CFU *Campylobacter* spp., je podatek, da je perutnina glavni vir okužbe za človeka, toliko bolj prepričljiv (2, 5).

Poleg kontaminiranega piščančjega mesa verjetno obstajajo še drugi pomembni viri okužb s *Campylobacter* spp. Na Norveškem je bil tako glavni dejavnik tveganja nerazkužena pitna voda, drugi ugotovljen možni dejavnik pa nizka stopnja imunosti v okuženi populaciji kot posledica manjše izpostavljenosti

splošne populacije kampilobaktrom zaradi nizke prevalence na kampilobakter pozitivnih brojlerjev. Posledica je populacija, ki je ob stiku s kampilobaktri močno občutljiva za okužbo. Tudi drugi dejavniki iz okolja (podaljšanje dneva spomladi reaktivira latentne oblike celic *Campylobacter* spp., gostota hišnih muh, ki so znani prenašalci patogenov, sezonske oscilacije imunskega odziva pri ljudeh, ki se zmanjša pod vplivom večje izpostavljenosti ultravijolični svetlobi) vplivajo na sezonske pojave povečane prevalence kampilobakterioz in s kampilobaktri kontaminirane perutnine (20, 21).

Kot je razvidno iz tabele 4 in slike 1, sta bili v Sloveniji pri perutninskih izolatih *C. jejuni* ugotovljeni ekstremno visoka odpornost proti ciprofloksacinu (2011 celo 92,1 %), kar je skoraj dvakratno povprečje EU v letu 2010, in zelo visoka odpornost proti tetraciklinu.

Odpornost proti tema dvema antibiotikoma pri perutnini je sicer najpogostejša tudi v drugih državah EU, vendar imata višjo odpornost proti ciprofloksacinu le še Španija in Madžarska, proti tetraciklinu pa le Španija in Francija. Najnižjo odpornost proti ciprofloksacinu pri brojlerjih beležijo na Danskem, Finskem in Norveškem (6). S slike 1 sta razvidna opazen trend naraščanja odpornosti proti ciprofloksacinu pri perutninskih izolatih *C. jejuni* v zadnjih dveh letih kakor tudi vseskozi nizka odpornost proti eritromicinu in gentamicinu.

ZAKLJUČEK

Slovenija se sooča z visoko stopnjo kolonizacije brojlerjev in kontaminacije klavnih trupov

s termotolerantnimi kampilobaktri. Ekstremno visoka odpornost bakterije *C. jejuni* proti ciprofloksacinu pri perutninskih in zelo visoka pri humanih izolatih ter zelo visoka odpornost proti tetraciklinu pri perutnini je realnost, ki je v Sloveniji dosegla zaskrbljujoče razsežnosti. Sposobnost bakterij *Campylobacter* spp. za pridobivanje odpornosti proti kinolonom je znana in dokumentirana, zato je v Sloveniji potrebno nadaljevati kontinuirano spremljanje kampilobakterioz in prospektivno izvajati monitoring kolonizacije in kontaminacije pri perutnini, ki je podlaga za nadaljnje ukrepanje. Dodatno je potrebno raziskati razloge za tako visok delež odpornih sevov, predvsem pa preučiti preudarnost in (ne)primernost uporabe antibiotikov v proizvodnji perutnine, da bi ohranili učinkovitost antibio-

tikov in zmanjšali javnozdravstveno škodo, ki jo odpornost nanje povzroča. Zato je potrebno ustvariti in vzdrževati konstruktiven dialog in sodelovanje med strokovnjaki s področij javnega zdravja, veterinarske medicine in živilske stroke. Samo s takim sodelovanjem bomo morda lahko dohтели skandinavske dežele in zajezili javnozdravstveno škodo, ki jo povzroča širjenje odpornih sevov v prehranski verigi.

ZAHVALA

Avtorja se zahvaljujeva A. Andlovic, T. Žohar Čretnik, B. Drinovcu, T. Harlander, N. Orešič, M. Ravnik, I. Štrumblju in M. Trkov za sodelovanje v NP pri ljudeh ter M. Biasizzo, M. Jarc, M. Lebanu, J. Mičunovič, M. Ocepku, A. Šinko in I. Zdovc za sodelovanje v TŠ in PM pri perutnini.

LITERATURA

1. Skirrow M. *Campylobacter* enteritis: a »new« disease. Br Med J. 1977; 2 (6078): 9–11.
2. Allos BM. *Campylobacter* infections. In: Brachman PS, Abrutyn E, eds. Bacterial infections of humans. New York: Springer Science and Business Media; 2009. p. 189–211.
3. European food safety authority, European centre for disease prevention and control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. EFSA Journal. 2012; 10 (3): 2597.
4. Belanger AE, Shryock TR. Macrolide-resistant *Campylobacter*: the meat of the matter. J Antimicrob Chemother. 2007; 60 (4): 715–23.
5. Lahuerta A, Takkinen J, Boelaert F, et al. Zoonoses in the European Union: origin, distribution and dynamics – the EFSA-ECDC summary report 2009. Euro Surveill. 2011; 16 (13): 5–8.
6. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. EFSA Journal. 2012; 10 (3): 2598.
7. Rasmussen LS, Ethelberg S, Emborg HD, et al. Trends in occurrence of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from broiler chickens, broiler chicken meat, and human domestically acquired cases and travel associated cases in Denmark. Int J Food Microbiol. 2009; 131 (2–3): 277–9.
8. Feierl G, Jelovcan S. *Campylobacteriosis* in Austria: situation and trends. Wien Klin Wochenschr. 2009; 121 (3–4): 103–7.
9. Aarestrup FM, Engberg J. Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. Vet Res. 2001; 32 (3–4): 311–21.
10. Unicomb LE, Ferguson J, Stafford RJ, et al. Low level fluoroquinolone resistance among *Campylobacter jejuni* isolates in Australia. Clin Infect Dis. 2006; 42 (10): 1368–74.
11. Moore JE, Barton MD, Blair IS, et al. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. Microbes Infect. 2006; 8 (7): 1955–66.
12. European Food Safety Authority. The Community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. EFSA Journal. 2009; 7 (1): 109–251.
13. European Food Safety Authority. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. EFSA Journal. 2010; 8 (1): 111–303.
14. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. EFSA Journal. 2011; 9 (3): 109–320.

15. Lastovica AJ, Allos BM. Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. In: Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ, eds. *Campylobacter*. 3rd ed. Washington: ASM Press; 2008. p. 123–49.
16. Havelaar AH, Ivarsson S, Löfdahl M, et al. Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union, 2009 [izvleček]. *Epidemiol Infect.* 2012; 13: 1–10. V tisku 2012.
17. Vicente A, Barros R, Florinda A, et al. High rates of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* in Portugal – needs for surveillance. *Euro Surveill* [internet]. 2008 [citirano 2012 Sep 5]; 13 (6). Dosegljivo na: http://www.eurosurveillance.org/edition/v13n06/080207_2.asp.
18. Berce I. Laboratorijsko spremljanje antimikrobne odpornosti sevov *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* izoliranih pri človeku v goriški zdravstveni regiji od 1998 do 2004. In: Prvi dnevi javnega zdravja s slavnostnim uvodom in podelitvijo bratov Pirca: vloga laboratorijev v javnem zdravju; 2005 Dec 8; Ljubljana. Ljubljana; 2005.
19. Andlovic A, Pirš M. Občutljivost za antibiotike pri salmonelah, šigelah, jersinijah in kampilobakterih. In: Beović B, Strle F, Čizman M, eds. Zbornik predavanj: okužbe, ki potrebujejo kirurško zdravljenje. Ljubljana: Sekcija za kemoterapijo SZD: Klinični center, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Katedra za infekcijske bolezni in epidemiologijo; 2007. p. 93–104.
20. Jore S, Viljugrein H, Brun E, et al. Trends in campylobacter incidence in broilers and humans in six european countries, 1997–2007. *Prev Vet Med.* 2010; 93 (1): 33–41.
21. Nauta M, Hill A, Porenquist H, et al. A comparison of risk assessments on *Campylobacter* in broiler meat [izvleček]. *Int J Food Microbiol.* 2009; 129 (2): 107.

Marija Trkov¹, Alenka Andlovic², Ingrid Berce³, Tjaša Žohar Čretnik⁴,
Mateja Ravnik⁵, Metka Paragi⁶

Verotoksigena *Escherichia coli* v Evropi in Sloveniji – kaj vemo in kako pristopiti k problemu?

*Verotoxigenic Escherichia coli in Europe and Slovenia –
What Do We Know and How to Approach the Problem?*

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: verotoksigena *Escherichia coli*, lastnosti, Evropa, Slovenija, epidemiologija

Za verotoksigeno *Escherichije coli* (VTEC) je značilno, da izdelujejo verocitotoksine, pri okužbi pa lahko pride do zelo nevarnih zapletov, hemolitično uremičnega sindroma in trombotične trombocitopenične purpore. V prispevku predstavljamo podatke o prijavljenih primerih okužb z VTEC, starosti in spolu bolnikov, času bolezni, zapletih pri okužbah ter seroloških skupinah in genotipih VTEC, ki sta jih zbrala Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni in Evropska agencija za varnost hrane. Ustrezajoči podatki za Slovenijo pa se nanašajo na 112 sevov VTEC, osamljenih med letoma 1993 in 2011 iz vzorcev iztrebkov bolnikov z drisko v različnih slovenskih regijah. Zaradi okužbe z VTEC je tako v Evropi kot tudi v Sloveniji največ ljudi zbolelo v poletnih in jesenskih mesecih. Več kot polovica bolnikov je bila mlajših od pet let. Največ evropskih in slovenskih izolatov VTEC je pripadalo serološkima skupinama O157 in O26, slovenski izolati pa so pripadali še serološkim skupinam O103, O111, O145, O113, O126, O128, O148, O146, O177, O84, O17, O91, O55, O153 in O6. Pri vseh sevih, povezanih s hemolitičnim uremičnim sindromom in trombotično trombocitopenično purpuro, smo določili gen za *vtx2*. Bolniki, pri katerih je prišlo do omenjenih zapletov, so bili predvsem majhni otroci in starejše osebe. Odkrivanje VTEC mora temeljiti na ugotavljanju sposobnosti izdelovanja verotoksinov oz. genov za verotoksine, izolate pa je treba nadalje tipizirati.

ABSTRACT

KEY WORDS: verotoxigenic *Escherichia coli*, characteristics, Europe, Slovenia, epidemiology

Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) strains are characterised by their ability to produce verocytotoxins. The infection may result in a life-threatening condition such as haemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. The data collected by the European Centre for Disease Prevention and Control and the European Food Safety Aut-

¹ Dr. Marija Trkov, univ. dipl. inž. živil. tehnol., Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Trubarjeva ulica 2, 1000 Ljubljana; marija.trkov@ivz-rs.si

² Asist. strok. svet. Alenka Andlovic, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Ingrid Berce, dr. vet. med., Zavod za zdravstveno varstvo Nova Gorica, Vipavska cesta 13, 5000 Nova Gorica

⁴ Asist. mag. Tjaša Žohar Čretnik, dr. med., Zavod za zdravstveno varstvo Celje, Ipavčeva ulica 18, 3000 Celje

⁵ Mag. Mateja Ravnik, univ. dipl. kem., Zavod za zdravstveno varstvo Kranj, Gosposvetska ulica 12, 4000 Kranj

⁶ Dr. Metka Paragi, univ. dipl. biol., Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Trubarjeva ulica 2, 1000 Ljubljana

hority on reported VTEC cases, age and gender of patients, onset of illness and complications, serological groups and genotypes of VTEC strains, are presented in this paper. The data collected for Slovenia are based on 112 VTEC strains, isolated between the years 1993 and 2011 from stool samples of patients with diarrhoea in different Slovenian regions. In Europe and in Slovenia, most people were ill in the summer and autumn months. More than half of the patients were younger than five. The most frequent serogroups were O157 and O26. Slovenian VTEC isolates also belonged to serogroups O103, O111, O145, O113, O126, O128, O148, O146, O177, O84, O17, O91, O55, O153 and O6. All strains associated with haemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura possessed the *vtx2* gene. The patients were mostly young children and older people. The detection of VTEC must be based on the determination of verotoxin production or the presence of genes encoding verotoxins. Further characterisation of VTEC isolates should be performed.

UVOD

Bakterije vrste *Escherichia coli* so del normalne črevesne mikroflore ljudi in živali, vendar pa so mnogi sevi pridobili med procesom evolucije različne dejavnike virulence in tako povzročajo črevesne in zunajčrevesne okužbe. Črevesne okužbe povzročajo verotoksigene (VTEC/STEC), enteropatogene (EPEC), enterotoksigene (ETEC), enteroinvazivne (EIEC), enteroagregativne (EAEC) in difuzno adherentne *E. coli* (DAEC). Med seboj se razlikujejo glede na mehanizem virulence. Tako so nekateri dejavniki virulence specifični za posamezno skupino, nekateri pa so skupni več skupinam. Poglavitna značilnost VTEC je izdelovanje verocitotoksinov, ki jih imenujemo tudi toksini Šiga. Verotoksine delimo v dve skupini, bakterije pa izdelujejo eno ali pa obe skupini toksinov. Znotraj obeh skupin toksinov razlikujemo različne podtipne in variante. Nekatere VTEC imajo tudi otok patogenosti LEE (angl. *locus for enterocyte effacement*), ki je značilen tudi za EPEC (1, 2).

Klinični znaki bolezni zaradi okužbe z VTEC so zelo različni, driska je lahko tudi krvava, lahko pa pride do zapletov, kot sta trombotična trombocitopenična purpura (TTP) in hemolitični uremični sindrom (HUS) (2). Z omenjenima zapletoma so pogosteje povezani sevi, ki izdelujejo verotoksine 2 (3). Najpogostejša serološka skupina, ki je povzročila posamezne primere okužb kot tudi izbruhe, je VTEC O157. Vendar pa izbruhe povzročajo tudi VTEC drugih seroloških skupin in tudi

druge skupine patogenih *E. coli*. Tako so aprila 2012 v Italiji zabeležili izbruh z EIEC. Vir je bila kuhana zelenjava, kontaminirana verjetno po pripravi, zaradi neprimerne ravnanja z živili in shranjevanja (4). Iz Danske so v juniju 2011 poročali o izbruhu, ki ga je povzročila ETEC med večjim številom zaposlenih v različnih organizacijah, ki so se prehranjevali v isti menzi (5). Sev *E. coli* O104:H4, ki je povzročil izbruh krvave driske in HUS lani v Nemčiji, pa je imel celo kombinacijo lastnosti, ki so po eni strani značilne za verotoksigene (izdelovanje verotoksina 2), po drugi pa za enteroagregativne *E. coli* (prisotnost genov *aggR*, *aatA*, *aap*, *aggA*, *aggC*). Šlo je za zelo virulenten sev, zbolelo je okrog 4.000 ljudi, okrog 50 jih je umrlo. Do zapleta HUS je prišlo pri več kot 800 obolelih, to je pri okrog 20% bolnikov (6). Gre za zelo visok delež, saj pride sicer pri okužbah z VTEC O157 do zapleta HUS pri do 10% okuženih (7). Stopnja umrljivosti pri bolnikih s HUS, okuženih s sevom *E. coli* O104:H4, je bila nad 4%, pri ostalih okuženih pa 0,6%. Vir okužbe so bili kalčki (6). Sicer pa so najpomembnejši vir VTEC prežvekovalci, zlasti govedo. Najpomembnejša načina prenosa sta uživanje okuženega mesa in prenos med osebami (8). Kužni odmerek je zelo nizek, ocenjujejo, da pod 50 celic VTEC O157:H7, do nekaj sto bakterij (1).

Bakterije *E. coli*, ki povzročajo črevesne okužbe so pomembne povzročiteljice drisk, najresnejšo obliko bolezni pa lahko povzročajo verotoksigene *E. coli*. V prispevku zato pred-

stavljamo določene podatke o prijavih, starosti in spolu bolnikov, času bolezni, seroloških skupinah in genotipih VTEC v Evropi in Sloveniji. Nakazujemo smernice za čim hitrejšo in učinkovitejšo odkrivanje teh bakterij.

MATERIALI

V prispevku so predstavljeni epidemiološki in mikrobiološki podatki za 112 sevov VTEC, ki smo jih zbrali na Inštitutu za varovanje zdravja Republike Slovenije (IVZ). Osamljeni so bili iz vzorcev iztrebkov 111 bolnikov z drisko med letoma 1993 in 2011 na IVZ, Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani in sedmih regionalnih Zavodih za zdravstveno varstvo (ZZV) (Nova Gorica, Kranj, Celje, Koper, Maribor, Murska Sobota in Novo mesto). Podatki o okužbah z VTEC v Evropi so povzeti iz poročil Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. *European centre for disease prevention and control*, ECDC) in Evropske agencije za varnost hrane (angl. *European food safety authority*, EFSA).

PRIJAVLJENI PRIMERI OKUŽB Z VEROTOKSIGENIMI *E. COLI*

Po podatkih ECDC se je število prijavljenih primerov okužb z VTEC v državah, ki so poročale podatke, z leti spreminjalo. Te spremembe so bile v veliki meri odvisne od uporabljene sistema spremljanja in metodologije odkrivanja VTEC. Nekatere države so v določenih letih poročale vse okužbe z *E. coli*, vključno z VTEC, nekatere pa zgolj okužbe z VTEC O157. V državah, kjer je spremljanje temeljilo na določanju verotoksinov ali genov za verotoksine, so bile druge serološke skupine lahko celo pogostejše povzročiteljice okužb kot O157 (9, 10). Leta 1995 je bila incidenca okužb z VTEC 1,4 na 100.000 prebivalcev in se je do leta 2002 več kot podvojila (3,2 na 100.000 prebivalcev), leta 2005 pa je bila spet

nižja in sicer 1,17 (9). Od leta 2007 se število prijavljenih potrjenih primerov povečuje (tabela 1) (7, 8). V letu 2009 so države, ki so posredovale podatke v ECDC (poleg držav Evropske unije (EU) sta upoštevani tudi Norveška in Islandija), poročale o 3.689 potrjenih primerih okužb z VTEC, kar predstavlja skupno 15 % porast v teh državah v primerjavi z letom 2008 (8).

V letu 2010, ko so države članice EU poročale o 4.000 potrjenih primerih VTEC, se je število prijav v teh državah glede na leto 2009 povečalo za 12 %, in sicer so največji porast zabeležili v Nemčiji in na Nizozemskem (7). Tudi v Sloveniji se je metodologija spremljanja in odkrivanja VTEC z leti spreminjala. V zadnjih letih temelji na določanju genov za verotoksine oz. sposobnosti izdelovanja verotoksinov. Z večanjem števila na ta način preiskanih vzorcev se večja tudi število potrjenih primerov okužb z VTEC. Tako smo leta 2010 potrdili in prijavili 20 primerov okužb iz cele Slovenije, incidenca na 100.000 prebivalcev je bila 0,98 in je bila višja od povprečne incidence v državah EU za to leto (7). V letu 2011 je bila incidenca še višja, in sicer 1,22, saj smo potrdili 25 primerov okužb z VTEC.

Starost in spol bolnikov

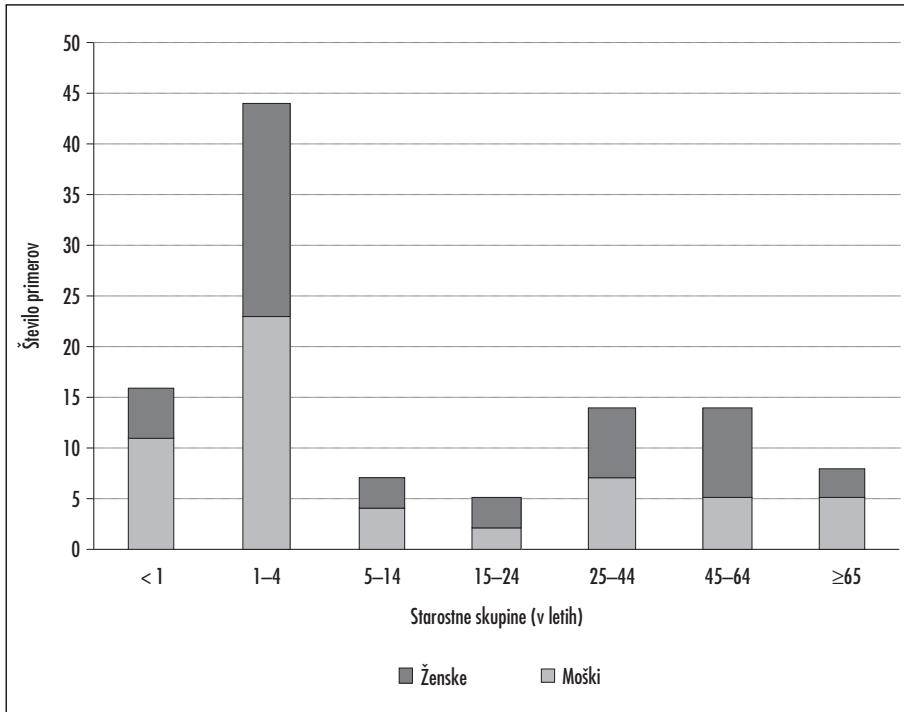
Največ bolnikov, ki so zboleli zaradi okužb s sevi, ki smo jih zbrali v laboratoriju IVZ od leta 1993 do 2011, je bilo mlajših od pet let. Slabih 15 % bolnikov je bilo mlajših od enega leta, skoraj 40 % pa je bilo starih od enega do pet let. Število obolelih je bilo dokaj visoko tudi pri drugih starostnih skupinah, in sicer zlasti med 25. in 44. letom in 45. in 64. letom (slika 1).

V državah, ki so posredovale podatke na ECDC, je bilo v letih med 2005 in 2010 največ bolnikov, okuženih z VTEC, starih do štiri leta. Veliko bolnikov je bilo tudi v starostni skupini med 5. in 14. letom, pri drugih starostnih skupinah je bila pogostost okužb manjša

Tabela 1. Število potrjenih primerov verotoksigenih *E. coli* na 100.000 prebivalcev v državah, ki so poročale podatke na Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni (7, 8).

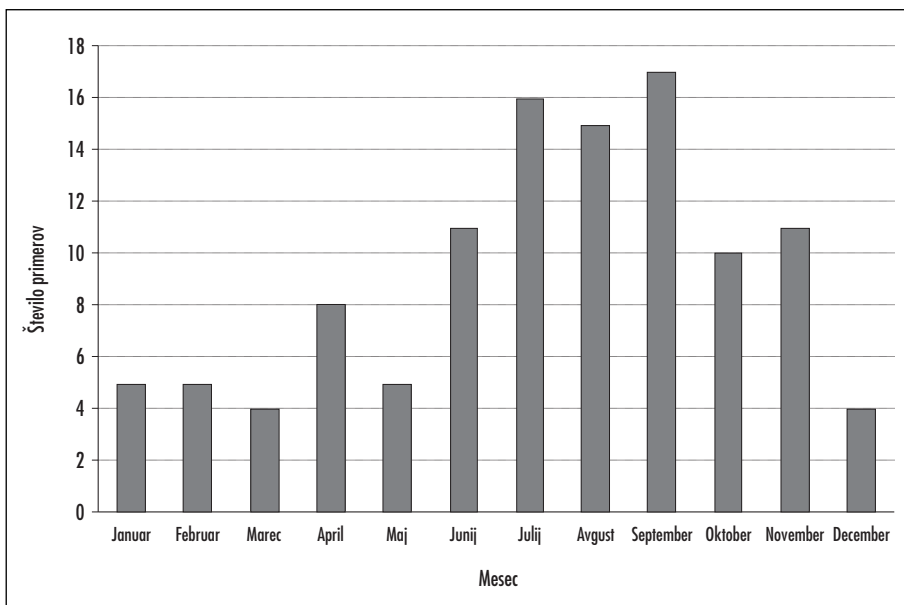
Leto	2006	2007	2008	2009	2010
Število potrjenih primerov/100.000 prebivalcev	0,76	0,67	0,76	0,86	0,83 ^a

^a Upoštevane so zgolj države članice Evropske unije.



Slika 1. Število okuženih bolnikov po starostnih skupinah v Sloveniji od leta 1993 do 2011.

58



Slika 2. Število bolnikov, okuženih z verotoksigenimi *E. coli*, po mesecih v Sloveniji od leta 1993 do 2011.

(7–13). Naj omenimo le, da je bilo v letu 2009 med najmlajšimi okuženimi bolniki nekoliko več dečkov kot deklic (8).

Sezonska porazdelitev primerov

Bolniki, ki so v Sloveniji zboleli zaradi dokazanih okužb s sevi VTEC, so obolevali skozi vse leto. Najmanj ljudi je zbolelo v zimskih mesecih. Do povečanega števila okužb je prihajalo v poletnih in jesenskih mesecih, največ pa julija, avgusta in septembra (slika 2). Podobno situacijo so ugotovili tudi v drugih državah. Leta 2007 je bilo največ prijavi julija, leta 2006 in 2010 avgusta, v letih 2005, 2008 in 2009 pa septembra (3, 7–13).

Serološke skupine sevov verotoksigenih *E. coli*

Največ slovenskih verotoksigenih sevov je pripadalo serološki skupini O157 (dobrih 38%). Ta skupina je bila najpogostejša do leta 2004, kar je verjetno posledica bolj načrtnega iskanja in dokazovanja verotoksinov pri tej serološki skupini v tem obdobju. Nato smo do leta 2011 to serološko skupino ugotovili le pri posameznih izolatih VTEC (14). V letu 2011 je sledil ponoven porast, saj je ta skupina povzročila okužbo pri sedmih od 25 bolnikov, okuženih v tem letu. Druga najpogostejša serološka skupina je bila O26 z dobrimi 22%, na tretjem in četrtem mestu pa sta bili serološki skupini O103 in O111. Slovenski sevi VTEC so pripadali še O145, O113, O91, O128, O177, O84, O146, O17, O126, O148, O55, O153 in O6 serološkim skupinam. Dobrim 12% sevov nismo mogli določiti serološke skupine z antiserumi, ki smo jih imeli na voljo v naših laboratorijih. Noben sev, osamljen do konca leta 2011, ni pripadal serološki skupini O104, ki je lani povzročila izbruh v Nemčiji. Predvsem v zadnjih letih opažamo večjo zastopanost različnih seroloških skupin, kar je verjetno posledica večjega števila preiskanih vzorcev z določanjem genov za verotoksine v verižni reakciji s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR).

Po podatkih ECDC je bilo v letih 2007–2009 dobra polovica prijavljenih potrjenih primerov okužb z VTEC povezanih s serološko skupino O157. Tudi v letu 2010 je prevladovala

ta serološka skupina, vendar se je delež v primerjavi z letom 2009 zmanjšal za 18,8% (7). Zelo visok delež, kar okrog 30%, so v letih od 2007 do 2010, predstavljale VTEC, ki jim serološka skupina O ni bila določena in so se tako uvrstile na drugo mesto med vsemi VTEC. Na tretje in četrto oziroma na drugo in tretje mesto med določenimi serološkimi skupinami O, sta se uvrstili skupini O26 in O103. Pogoste serološke skupine so bile še: O91, O145, O111, O128, O113, O146, O117 (7, 10, 13).

Zapleti pri okužbi z verotoksigenimi *E. coli*

Pri okužbi z VTEC lahko pride do zapletov, kot sta TTP in HUS. Po podatkih, ki smo jih uspeli zbrati za slovenske izolate VTEC, je omenjena zapleta povzročilo 14 od 112 sevov (13%), od tega kar pet v letu 2011, kar predstavlja 20% sevov VTEC, osamljenih v tem letu. Do omenjenih zapletov je prišlo pri majhnih otrocih, starih do štiri leta, ali pa starejših oseb. Serološke skupine teh sevov so bile O157, O26, O177, O17, O145, O126 in O153. Pri vseh sevih, kjer je prišlo do HUS-a in/ali TTP, smo dokazali prisotnost gena za verotoksin 2 (*vtx2*), zanimivo pa je, da se v zadnjih letih pojavlja vedno več sevov brez gena za intimin (*eae*).

Po podatkih ECDC se je število prijavljenih primerov HUS v letu 2009, ko so zabeležili 242 prijavi, v primerjavi z letom 2008, povečalo za 66%. Vzrok za povečano število prijavi okužb z VTEC in tudi primerov HUS pa sta bila izbruha v Angliji in na Nizozemskem (8). V letu 2010 je prišlo do zapleta HUS v 222 potrjenih primerih okužb z VTEC, to je v 5,5% (7). Leto 2011 je zaznamoval izbruh v Nemčiji z izjemno velikim številom bolnikov, pri katerih je prišlo do omenjenega zapleta, in sicer pri okrog 20% okuženih (6). V letih 2007, 2008 in 2010 je bila najpogostejša serološka skupina O157, v letih 2008 in 2010 se je na drugo mesto uvrstila O26. Vzrok za tako visok delež prijavljenih primerov okužb z VTEC kot tudi zapletov HUS s serološko skupino O157 je tudi v tem, da je v nekaterih državah spremljanje osredotočeno predvsem na to serološko skupino. V letih od 2007 do 2010 so največ primerov HUS ugotovili pri otrocih do četrtega leta, veliko primerov pa tudi

v starostni skupini med 5 in 14 let (7, 8, 10). Med lanskim izbruhom v Nemčiji pa se je pokazalo, da lahko s hudo klinično sliko zbolijo tudi odrasli ljudje, ki so bili glede starosti do sedaj manj izpostavljeni, saj je bila povprečna starost bolnikov z zapletom HUS 42 let (6).

Dejavniki virulence sevov verotoksigenih *E. coli*

Določanje genov, povezanih z virulenco VTEC, in njihova nadaljnja tipizacija ni pomembna zgolj zaradi njihove identifikacije in spremljanja, ampak tudi zaradi prepoznavanja možnega težjega poteka bolezni pri sevih z npr. genom za *vtx2* določenih podtipov. Rezultati naše predhodne študije in novejši rezultati so pokazali na raznolikost slovenskih sevov VTEC glede prisotnosti genov, povezanih z njihovo virulenco (14). V državah, ki so posredovale podatke na ECDC za leto 2010, so prevladovali verotoksin 2 pozitivni sevi z genom za intimin (*eae*). Najpogosteje so bili povezani s serološko skupino O157 (7). Takšen genotip ima tudi dobrih 60% slovenskih izolatov VTEC O157. Največ sevov, povezanih s serološkima skupinama O26 in O103, je bilo verotoksin 1 pozitivnih z genom *eae*, kar je značilno tudi za skoraj 70% slovenskih VTEC O26 in večino VTEC O103.

KAKO PRISTOPITI K ODKRIVANJU VEROTOKSIGENIH *E. COLI*?

Da bi ugotovili, kakšen delež črevesnih okužb predstavljajo *E. coli*, bi morali preiskati vse vzorce bolnikov z drisko na prisotnost vseh skupin *E. coli*, ki povzročajo črevesne okužbe, ne le VTEC. Hitra diagnostika okužb z VTEC pa je zelo pomembna predvsem zaradi ustrezne obravnave bolnika in s tem zmanjšanja tveganja za nastanek zapletov HUS in TTP. Nadaljnja tipizacija sevov VTEC je izrednega pomena zaradi njihovega spremljanja (npr. pojava novih skupin, ki so povzročile težko klinično sliko bolezni), za učinkovito in pravočasno odkrivanje izbruhov in spremljanje trendov epidemiologije bolezni. Po priporočilih ameriškega Centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. *Centers for disease control and prevention*, CDC) naj bi klinični

laboratoriji ugotavljali prisotnost VTEC v vseh vzorcih iztrebkov bolnikov z drisko ter sumom na HUS, in sicer s kultivacijo na selektivnih in diferencialnih gojiščih za VTEC O157 in odkrivanjem verotoksinov ali pa genov za verotoksine, izolate pa posredovali nacionalnemu javnozdravstvenemu laboratoriju v potrditev in nadaljnjo tipizacijo (15). Glede na predstavljene podatke v prispevku lahko ugotovimo, da bi s selekcijo testiranja vzorcev iztrebkov glede na starost bolnikov, letni čas in težji potek bolezni spregledali veliko okužb z VTEC. Ker te bakterije pripadajo številnim serološkim skupinam *E. coli*, tudi presejalno testiranje vzorcev na prisotnost zgolj določenih seroloških skupin in nadaljnje dokazovanje verotoksinov ni več ustrezno. Čeprav se določene serološke skupine pojavljajo pogosteje kot druge, v zadnjih letih ugotavljamo, da slovenski sevi VTEC pripadajo vedno bolj različnim serološkim skupinam. Vendar želimo poudariti, da je treba posebno skrbno obravnavati mlajše in starejše osebe ter druge bolnike z oslabljenim imunskim odzivom, bolnike s krvavo drisko, bolnike s sumom na HUS in osebe, ki so bile v stiku z ljudmi in živalmi, okuženimi z VTEC. Za odkrivanje zgolj verotoksigenih *E. coli* pa je nujno uporabljati metode, ki temeljijo na ugotavljanju izdelovanja verotoksinov ali pa genov za verotoksine in pri tem upoštevati specifičnost ter občutljivost metod. Glede na naše večletne izkušnje je bil najboljši pristop testiranje vzorcev s hkratnim PCR (angl. *multiplex PCR*), ki temelji na določanju različnih genov, povezanih z virulenco različnih patogenih skupin *E. coli*, vključno z VTEC. Izrednega pomena je tudi zbiranje izolatov in njihova nadaljnja tipizacija zaradi spremljanja in hitrega odzivanja na nenavadne dogodke doma in v svetu.

ZAKLJUČEK

Menimo, da je treba *E. coli*, ki povzročajo črevesne okužbe, obravnavati kar se da celostno, vsaj na nacionalnem nivoju. Določeni dejavniki virulence so namreč značilni za posamezno skupino, nekateri pa so skupni več skupinam. Ne nazadnje pa smo priča pojavljanju sevov s kombinacijo dejavnikov virulence različnih skupin patogenih *E. coli*, ki so bili do sedaj zelo

redko opisani. Posledica pa so sevi z zelo visoko stopnjo virulence. Nedavni izbruh s sevom *E. coli* O104:H4 je pokazal na nujnost spremljanja ne le verotoksigenih, ampak tudi preostalih skupin *E. coli*, ki povzročajo črevesne okužbe. To pa je povezano s sprotnim uvajanjem metodologije, ki omogoča njihovo odkrivanje in prepoznavanje njihovih lastnosti.

ZAHVALA

Avtorice se zahvaljujemo Tatjani Harlander iz ZZV Novo mesto, Nadji Orešič iz ZZV Maribor, Bojanu Drinovcu iz ZZV Koper in Iztku Štrumlju iz ZZV Murska Sobota, ki so pripomogli k nastanku članka s posredovanjem sevov *E. coli* in z razpoložljivimi epidemiološkimi podatki.

LITERATURA

1. Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci*. 2007; 85 (13 Suppl): E45–62.
2. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2 (2): 123–40.
3. Carroll AM, Gibson A, McNamara EB. Laboratory-based surveillance of human verocytotoxinogenic *Escherichia coli* infection in the Republic of Ireland 2002–2004. *J Med Microbiol*. 2005; 54 (12): 1163–9.
4. European centre for disease prevention and control. Epis: Canteen-associated outbreak of entero-invasive *E. coli* (EIEC) [internet] [citirano 2012 Jun 8]. Dosegljivo na: <https://epis.ecdc.europa.eu/Lists/ForInformation/AllItems.aspx>
5. European centre for disease prevention and control. Epis: Urgent inquiry, monthly summary, July 2011. Outbreak of ETEC associated with sugar snaps from Africa [internet] [citirano 2012 Jun 8]. Dosegljivo na: <https://epis.ecdc.europa.eu/Lists/FoInformation/AllItems.aspx>
6. Frank C, Werber D, Cramer JP, et al. Epidemic profile of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med*. 2011; 365 (19): 1771–80.
7. European food safety authority, European centre for disease prevention and control. Verotoxinogenic *Escherichia coli*. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal*. 2012; 10 (3): 161–89.
8. European centre for disease prevention and control. Vero/shiga toxin-producing *Escherichia coli* (VTEC/STEC) infection. Annual epidemiological report 2011. Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data. Stockholm: European centre for disease prevention and control; 2011. p. 83–6.
9. European centre for disease prevention and control. Verocytotoxinogenic *Escherichia coli* (VTEC). Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe. Stockholm: European centre for disease prevention and control; 2007. p. 244–7.
10. European food safety authority. Verotoxinogenic *Escherichia coli*. The Community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. *EFSA Journal*. 2009; 7 (1): 211–21.
11. European centre for disease prevention and control. Vero/shiga toxin-producing *Escherichia coli* (VTEC/STEC) infection. Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2008. Stockholm: European centre for disease prevention and control; 2008. p. 36–41.
12. European centre for disease prevention and control. Vero/shiga toxin-producing *Escherichia coli* (VTEC/STEC) infection. Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2009. Stockholm: European centre for disease prevention and control; 2009. p. 93–5.
13. European food safety authority. Verotoxinogenic *Escherichia coli*. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal*. 2010; 8 (1): 209–20.
14. Trkov M, Andlovic A, Berce I, et al. Verotoksigeni sevi bakterije *Escherichia coli*, osamljeni v Sloveniji iz humanih vzorcev. *Zdrav Vestn*. 2012; 81 (1): 32–43.
15. Centers for disease control and prevention. Recommendations for diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections by clinical laboratories. *MMWR*. 2009; 58 (RR12): 1–14.

Katja Zelenik¹, Marija Lušicky², Marija Trkov³, Slavica Lorenčič Robnik⁴, Irena Zdovc⁵

Ali postaja listerioza problem v Evropi in Sloveniji?

Is Listeriosis Becoming a Problem in Europe and Slovenia?

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Listeria monocytogenes*, listerioza, pogostnost, okolje, živila, izbruhi

Listeria monocytogenes lahko povzroča resna obolenja pri ljudeh in živalih. Listerioza je po številu smrtnih primerov, povzročenih z zastrupitvami z živil, za salmonelozo na drugem mestu. V Evropi je delež vzorcev živil, pozitivnih na bakterijo *L. monocytogenes*, dokaj stabilen, vendar pa število primerov listerioze v nekaterih evropskih državah raste. Največkrat gre za primere bakteriemije pri starejših ljudeh. Ker se populacija stara, se večja število ljudi z oslabilnim imunskim sistemom. Zdravljenje je uspešno le v 70–80 % primerov, čeprav so v Evropi odkrili le nekaj sevov, odpornih proti antibiotikom. Drugod po svetu so že poročali o večjem številu mnogokratno odpornih sevov. Večina primerov listerioz je sporadičnih, vendar v zadnjih letih podatki genotipizacije sevov listerij, osamljenih iz okolja, živil in iz kliničnih vzorcev, odločilno pripomorejo k epidemiološkim raziskavam, saj povežejo navidezno nepovezane primere in pripomorejo k odkrivanju virov okužbe. Za preprečevanje okužb je potrebno osveščanje potrošnikov in izvajanje dobrih, stalnih programov nadzora, pri tem pa morajo usklajeno sodelovati vse pristojne službe s področja zdravstvene, veterinarske in živilske stroke.

ABSTRACT

KEY WORDS: *Listeria monocytogenes*, listeriosis, prevalence, environment, food, outbreaks

Listeriosis is a serious invasive disease for pregnant women, neonates and immune-compromised adults. The causative organism, *Listeria monocytogenes*, is primarily transmitted to humans through contaminated food. Listeriosis is actually the second most common cause of death related to food poisoning after salmonellosis. Although the number of *L. monocytogenes* contaminated food samples in Europe is stable, the increasing rate of listeriosis has been reported in some European countries, especially among the elderly population. Demographic shifts, humans with underlying chronic diseases and the widespread use of immunosuppressive medications have further contributed to the increase of the population at risk. The treatment success rate of 70–80% is relatively low, despite the minimal presence of resistant strains in Europe. In recent years, genotyping of *Listeria* isolated from the environment, food and clinical samples, importantly contributed to the general knowledge on epidemiology and ecology of listeriosis. Consumer awareness and solid, permanent control programs involving all relevant departments in the field of medical, veterinary and food science are required to control and prevent the infections with *L. monocytogenes*.

¹ Katja Zelenik, dr. vet. med., Zavod za zdravstveno varstvo Maribor, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; katja.zelenik@zzv-mb.si

² Mag. Marija Lušicky, dr. vet. med., Zavod za zdravstveno varstvo Maribor, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

³ Dr. Marija Trkov, univ. dipl. inž. živil. tehnol., Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Trubarjeva ulica 2, 1000 Ljubljana

⁴ Slavica Lorenčič Robnik, dr. med., Zavod za zdravstveno varstvo Maribor, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

⁵ Doc. dr. Irena Zdovc, dr. vet. med., Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, 1000 Ljubljana

UVOD

V rod *Listeria* spada devet vrst: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. grayi*, v letu 2010 sta bili opisani *Listeria marthii* in *Listeria rocourtii* ter v letu 2012 *Listeria fleischmannii* (1, 2). Obolenja pri ljudeh povzročata predvsem *L. monocytogenes*, opisanih pa je tudi nekaj primerov okužb z *L. ivanovii*, ki je patogena predvsem za živali. Listerije so ubikvitarni mikroorganizmi, prisotni predvsem v prsti, organskih materialih, krmi in vodi, pogostejši so v okoljih z večjim številom domačih in divjih živali.

Bakterije vrste *L. monocytogenes* so relativno pomembne kot povzročiteljice okužb z živili. Preživijo različne tehnološke procese obdelave živil, kot sta kisanje in soljenje. Razmnožujejo se lahko tudi pri nizkih temperaturah, od 2 do 4 °C (3, 4).

POGOSTNOST POJAVLJANJA LISTERIJ V OKOLJU

O pogostnosti listerij v naravnem okolju, zunaj živilske proizvodnje, je zelo malo podatkov. V nekaj raziskavah poročajo o visokem deležu pozitivnih vzorcev (> 20 %) (5). V novejši raziskavi iz leta 2012 so preučili pogostnost pojavljanja v urbanem in naravnem okolju (1). Čeprav so ugotovili podoben delež listerij, najdenih v urbanem in naravnem okolju, se je močno razlikovala porazdelitev po vrstah. V naravnem okolju so večkrat odkrili nepatogeni vrsti *L. seeligeri* in *L. welshimeri*, medtem ko sta v urbanem okolju prevladovali *L. innocua* in patogena vrsta *L. monocytogenes*. V urbanem okolju je bil poleg prsti, površinskih vod in rastlinja visok delež pozitivnih vzorcev, odvzetih s pločnikov in pešpoti ter površin, ki prihajajo v stik z ljudmi (1).

V letih 2007 in 2008 je bilo na Zavodu za zdravstveno varstvo (ZZV) Maribor testiranih 221 vzorcev površinskih vod iz Slovenije. V 35,7 % vzorcev smo dokazali prisotnost listerij. Osamljenih je bilo več vrst, v najvišjem deležu so bile prisotne *L. seeligeri*, *L. monocytogenes* in *L. innocua*. Največ listerij je bilo ugotovljenih na področjih v bližini farm, čistilnih naprav in različnih kmetijskih površinah.

POGOSTNOST POJAVLJANJA LISTERIJ PRI ŽIVALIH

Direktiva 2003/99/ES o spremljanju zoonoz in njihovih povzročiteljev predpisuje spremljanje in zbiranje podatkov v zvezi z *L. monocytogenes* (6). Podatki se pošiljajo v bazo Evropske agencije za varnost hrane (angl. *European food safety authority*, EFSA), ki izdaja letna poročila o spremljanju zoonoz. V letu 2010 je devet držav Evropske unije (EU) poročalo o listerijah, odkritih pri različnih živalskih vrstah. Najvišji delež je bil najden pri govedu in drobnici (v povprečju 5,5 in 7,7 %). Pri prašičih listerij niso odkrili. V največ primerih je šlo za vrsto *L. monocytogenes*, poročali so tudi o prisotnosti drugih vrst (4).

V Sloveniji aktivni nadzor asimptomatskih živali ne poteka. V letu 2009 je bilo ugotovljenih šest primerov listerioze pri govedu, šest primerov pri drobnici in en primer pri srnjadi (7).

POGOSTNOST POJAVLJANJA LISTERIJ V ŽIVILIH

Prisotnost listerij v živilih ureja Uredba komisije 2073/2005 z vsemi spremembami, ki predpisujejo mikrobiološka merila za živila (8). Za gotova živila, namenjena neposrednemu uživanju v prodaji, velja, da število *L. monocytogenes* do konca roka uporabe ne sme preseči 100 CFU/g (angl. *colony-forming units*). V pripravljenih živilih, ki so namenjena dojenčkom ali za posebne zdravstvene namene, bakterija vrste *L. monocytogenes* ne sme biti prisotna v 25 g, prav tako bakterij *L. monocytogenes* ne sme biti v vzorcih iz proizvodnje (8).

V Evropi in Sloveniji se delež pozitivnih vzorcev živil v zadnjih letih skoraj ni spremenjal. Največje tveganje za zdravje ljudi predstavljajo meso, delikatesna živila, mleko in mlečni izdelki, siri ter ribe in proizvodi iz rib, zato so državni nadzori usmerjeni prav na te vrste živil (4). V letu 2010 je podatke v EFSA posredovalo 19 držav članic EU in Švica (tabela 1). Število preiskanih in neskladnih vzorcev je od države do države močno nihalo. Neskladnih vzorcev iz prometa je bilo zelo malo, glede na kategorijo živil je delež nihalo od 0 do 1%. Neskladnih vzorcev, odvzetih v proizvodnji, ki morajo zadostiti kriteriju po

Tabela 1. Prisotnost bakterij *L. monocytogenes* v živilih v Evropi (podatki za leto 2010) (4).

Skupina živil	Število preiskanih vzorcev	Delež pozitivnih vzorcev (v %)	Variiranje deleža pozitivnih vzorcev po državah (v %)
Ribe (prekajene, kuhane)	2.938	6	0–28,3
Drugi proizvodi iz rib	1.092	5,7	1,5–18,9
Meso in mesni izdelki – prašičje meso	22.158	2,0	0–31,3
Meso in mesni izdelki – goveje meso	1.450	1,5	0–5,9
Meso in mesni izdelki – piščančje meso	3.636	1,5	0–11,8
Gotova živila za neposredno uživanje	5.488	1,5	0–16,7
Gotova živila za neposredno uživanje – solate	811	4,2	0–7,1
Gotova živila za neposredno uživanje – slaščice	372	0,5	0–0,9
Živila rastlinskega izvora	386	0,5	0–1,4
Različni siri	18.183	0,5	0–7,5
Živila za neposredno uživanje, namenjena dojenčkom in za posebne zdravstvene namene	1.262	0	/

Tabela 2. Prisotnost *L. monocytogenes* v živilih v Sloveniji (podatki za leto 2009) (7).

Skupina živil	Število preiskanih vzorcev	Delež pozitivnih vzorcev (v %)
Meso goveda in prašičev ter mesni izdelki, vzorčeno v proizvodnji	100	25
Drugi izdelki živalskega izvora, vzorčeno v prodaji	61	4,9
Gotovi mesni izdelki za neposredno uživanje, vzorčeno v prodaji	256	7,8
Prekajene ribe, vzorčeno v prodaji	40	35
Gotova živila za neposredno uživanje – sendviči, vzorčeno v prodaji	138	0
Gotova živila za neposredno uživanje – solate, vzorčeno v prodaji	128	1,6
Gotova živila za neposredno uživanje – slaščice, vzorčeno v prodaji	250	0
Siri, vzorčeno v prodaji	20	0
Živila rastlinskega izvora (zamrznjena zelenjava)	18	5,6

odsotnosti bakterij *L. monocytogenes* v 25 g, je bilo od 0 do 11,5% (4).

V Sloveniji je za spremljanje živil živalskega porekla v procesu proizvodnje zadolžena Veterinarska uprava Republike Slovenije (RS) (tabela 2). Zdravstveni inšpektorat je pristojen za nadzor nad živilmi v prodaji (7).

V letu 2010 se je program vzorčenja in laboratorijskih preizkusov živil Zdravstvenega inšpektorata RS skrčil. Na bakterije vrste *L. monocytogenes* je bilo pregledanih 333 živil. Od tega je bilo 210 vzorcev pripravljenih delikatesnih živil, v katerih je bila prisotnost *L. monocytogenes* ugotovljena v 1,9% primerov. V 10 vzorcih živil za posebne zdravstvene namene, 10 vzorcih živil za dojenčke in 103 vzorcih slaščic prisotnost *L. monocytogenes* ni bila ugotovljena (9).

PATOGENEZA OKUŽB Z LISTERIJO MONOCYTOGENES

Okužbe pri ljudeh so redke, vendar je stopnja umrljivosti pri invazivnih oblikah visoka (3). Prenos poteka v glavnem preko okuženih živil. Potrjeni so bili redki primeri kontaktne prenosa. V večini primerov gre za kožno obliko bolezni pri ljudeh, ki so poklicno izpostavljeni, npr. veterinarji, mesarji (10). Zasediti je nekaj poročil o bolnišničnem prenosu s kontaminiranim materialom z bolnika na bolnika in preko rok bolnišničnega osebja (4). Skupine s povečanim tveganjem predstavljajo novorojenci, nosečnice, osebe z oslABLJENO celično imunostjo in ljudje, starejši od 65 let (4). Pri nosečnicah je tveganje za listeriozo 12-krat višje kot pri zdravi populaciji (11).

Inkubacijska doba je zelo različna, od 2 do 88 dni, povprečno 17 dni. Navadno je krajša pri obolenju osrednjega živčevja (povprečno 10 dni), daljša pa pri okužbah nosečnic (povprečno 28 dni) (12).

KLINIČNA SLIKA

Bolezen se lahko kaže na različne načine, od blagih, gripi podobnih oblik in diareje, do hujših, invazivnih oblik, kot so septikemija, meningitis, romboencefalitis. Pri nosečnicah navadno ne pride do okužbe osrednjega živčevja. Bolezen lahko poteka asimptomatsko ali z nekoliko povišano temperaturo, zato je listeriozo težko diagnosticirati. Pomembno je pomisliti na možnost okužbe z listerijo in testirati prisotnost bakterij v krvi.

Listerije se lahko razširijo na plod intrauterino in povzročijo splav, prezgodnji porod, mrtvorojenega otroka ali generalizirano okužbo (lat. *granulomatosis infantiseptica*). Neonatalna oblika lahko poteka kot zgodnja, če se plod okuži intrauterino, ali kot pozna, če pride do okužbe pri prehodu skozi porodni kanal. Nastopi lahko sepsa ali meningitis.

Obolenje je lahko tudi žariščno. Opisani so primeri konjunktivitisa, dermatitisa, limfadenitisa. Bakteriemija lahko pripelje do peritonitisa, arteritisa, perikarditisa in okužb drugih organov (4).

Pri imunsko kompetentnih ljudeh lahko *L. monocytogenes* povzroči akutno obliko febrilnega gastroenteritisa. Najpogostejši opisani simptomi so vročina, vodeno blato, bolečine v sklepih in glavobol. Drugi, manj pogosti simptomi so izpuščaji, povečane bezgavke, vrtoglavica in retrobulbarna bolečina. Prvi simptomi se pojavijo v manj kot 24 urah, inkubacija se lahko podaljša na 6–10 dni. Navadno pride do samozdravitve brez resnejših zapletov. Bolezen traja 1–3 dni, lahko pa se zavleče do 1 tedna. Včasih lahko pride do bakteriemije (13).

DIAGNOSTIKA

Listeriozo lahko dokažemo s prisotnostjo listerij v navadno sterilnem vzorcu, kot je kri ali možganska tekočina. Osamimo jih lahko tudi iz amnijske tekočine, posteljice, mekonija, lohij ter pri novorojencu iz želodčnega izpir-

ka ali brisov ušes. Glede na to, da je 1–15 % ljudi asimptomatskih prenašalcev, imajo vzorci blata in vzorci brisov nožnice zmanjšan diagnostični pomen. Pri nosečnicah se listerioza kaže z blagimi gastrointestinalnimi ali gripi podobnimi simptomi (4).

Za epidemiološke raziskave je pomembna osamitev bakterije in njena tipizacija. Zlati standard genotipizacije predstavlja gelska pulzna elektroforeza (angl. *pulse-field gel electrophoresis*, PFGE). Namesto klasične serotipizacije se zadnje čase uporablja mnogokratna serotipizacija z verižno reakcijo s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR). S tipizacijo izolatov dobimo pomembne informacije o raznolikosti sevov in njihovi sorodnosti. Bakterije vrste *L. monocytogenes* sestavljajo 4 evolucijske linije (I, II, III in IV). Večina jih spada v linijo I in II, vključno s serotipom 1/2a (linija II) in serotipoma 1/2b in 4b (linija I). Za izbruhe zastрупitev so navadno odgovorne manjše gruče genetsko povezanih sevov, ki spadajo v linijo I. Seve linije II najdemo v okolju in živalih, običajno so izolirani v primerih listerioze pri živalih in sporadičnih primerih pri ljudeh (14). Največ od 66 izolatov bakterije vrste *L. monocytogenes*, osamljenih iz različnih živil na Inštitutu za varovanje zdravja (IVZ) med letoma 2007 in 2010, je pripadalo serotipoma 1/2a (46,3 %) in 1/2c (23,9%), preostali izolati so pripadali še serotipom 1/2b, 4e, 4b. Enajst izolatov, osamljenih v letu 2010 v Sloveniji iz humanih vzorcev, pa je pripadalo serotipom 1/2a, 1/2c in 4e (15).

ZDRAVLJENJE

L. monocytogenes je znotrajcelična bakterija. Razmnožuje se v retikuloendotelijskem sistemu in preživi v fagocitnih celicah. Določeni antibiotiki ne dosežejo bakterij, kar razloži razlike med testirani občutljivosti *in vitro* in *in vivo* (4). *In vitro* naj bi bila *L. monocytogenes* občutljiva za celo vrsto protimikrobnih zdravil z izjemo fosfomicina, prve generacije kinolonov, tretje generacije cefalosporinov in nalidiksične kisline (4). Standarda CLSI (angl. *Clinical laboratory standards institute*) in EUCAST (angl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) podajata merila za testiranje občutljivosti za penicilin, ampicilin in trimetoprim-sulfametoksazol. V stan-

dardu EUCAST je navedeno še merilo za meropenem (16).

Zdravilo izbora je penicilin ali ampicilin, lahko samostojno ali v kombinaciji z gentamicinom. Sinergija kombinacije je bila dokazana samo *in vitro*. Pri bolnikih z alergijo na betalaktamske antibiotike predstavljata alternativo za zdravljenje trimetoprim-sulfametoksazol ali eritromicin, vendar eritromicin slabo prehaja skozi placentalno bariero. Listerije so občutljive tudi za vankomicin, vendar ta ni učinkovit pri okužbah osrednjega živčevja. Drugi dve protimikrobni zdravili, ki sta se izkazali za uspešni *in vitro*, sta linezolid in meropenem. Moksifloksacin in levofloksacin predstavljata obetajoči zdravili, vendar je za zdaj z njima malo kliničnih izkušenj (4).

Čeprav ni podatkov o zdravljenju listeriozne gastroenteritisa, priporočajo za osebe s povečanim tveganjem, ki so zaužile sumljivo živilo, povezano z izbruhom bolezni, 7-dnevno preventivno zdravljenje z amoksicilinom ali trimetoprim-sulfametoksazolom (4).

PRIMERI LISTERIOZE PRI LJUDEH

Čeprav naj bi se v Sloveniji primeri listerioze prijavljali skladno z Zakonom o nalezljivih boleznih, se predvideva, da je primerov več od prijavljenih. Podatki za obdobje med leto-

ma 2000 in 2004 kažejo, da je bilo prijavljenih le 41 % primerov (17, 18). O kongenitalnih primerih v zadnjih letih ni podatkov. Od leta 1990 do 2009 je bilo v Sloveniji letno prijavljenih od 0 do 38 primerov. V letu 2009 so bili trije primeri smrtni (7). Od leta 2010 seve listerij, osamljene iz humanih vzorcev iz cele Slovenije, zbirajo in nadalje tipizirajo v laboratoriju IVZ. Tako so leta 2010 zbrali in tipizirali 11 izolatov, leta 2011 pa štiri (19).

V Avstriji, Španiji in Latviji od leta 2006 do 2010 incidenca statistično značilno raste, upad je bil zaznan v Belgiji, Češki, Luksemburgu in Slovaški. Po podatkih EFSA je v Evropi incidenca med 0,35 in 0,4 potrjenih primerov na 100.000 prebivalcev. V letu 2010 je bilo prijavljenih in potrjenih 1.602 primerov. Najvišji delež so predstavljali oboleli, stari nad 65 let (60,2 %), 6,7 % primerov je bilo v starostni skupini od 0 do 4 leta, v večini primerov je šlo za dojenčke, mlajše od enega leta. Vzrok okužbe je bil pojasnjen v 132 primerih (8,26 %). Najpogosteje so kot vir okužb omenjeni siri, mleko in ribe. Smrtnih primerov je bilo 17 %. Najvišji delež smrtnosti je bil v starostni skupini od 0 do 5 let (22,9 %), sledila je starostna skupina 45 do 64 let (19,1 %) in skupina nad 65 let (17,3 %) (3). V zadnjih letih so poročali o več izbruhih invazivne in

Tabela 3. Izbruhi invazivne listerioze v letih 2005–2010 v Evropi (20).

Leto	Država	Število primerov (število smrtnih primerov)	Vir zastrupitve
2005	Švica	12 (3)	mehki sir
2006	Češka	78 (13)	mehki sir
2006–2007	Nemčija	16 (5)	klobasa
2007	Norveška	21 (5)	mehki sir
2009	Danska	8 (2)	pripravljeno živilo z govedino
2009–2010	Avstrija, Nemčija, Češka	34 (8)	sir (»quargel«)

Tabela 4. Izbruhi neinvazivne listerioze v letih 1993–2008 v Evropi.

Leto	Država	Število primerov	Vir zastrupitve
1993	Italija	18	solata z rižem
1997	Finska	5	prekajena postrv
1997	Italija	1.566	solata s tuno in koruzo
2001	Švedska	48	sveži sir
2008	Avstrija	12	aspik

neinvazivne oblike listerioze po Evropi (tabela 3, tabela 4).

Konec leta 2009 so se v Avstriji in Nemčiji pojavili primeri listerioze, katerim bi brez molekularnega tipiziranja lahko pripisali sporadičen značaj. Primeri so bili geografsko nepovezani, klasične epidemiološke preiskave niso odkrile povezav. Zaradi doslednega tipiziranja sevov so strokovnjaki povezali posamezne primere, razkrili izbruh in posledično vir okužb (21, 22).

ZAKLJUČEK

Epidemiološka slika na področju okužb z listerijo se je v Evropi v zadnjih letih močno spremenila. Spremembe so verjetno bolj kot s spremembami listerij povezane s socialno-ekonomskimi trendi (4). Populacija s povečanim tveganjem za okužbe z listerijami se zaradi demografskih sprememb in uporabe imunosupresivnih zdravil širi. K temu so prispevale tudi ekonomske migracije v Evropi. V Veliki Britaniji so ugotovili višji porast kongenitalne listerioze pri priseljenkah, višji delež obolevnosti so pripisali prebivalcem revnejših sosesk (11, 23).

Prav tako so se spremenile prehranjevalne navade in ravnanje s hrano. Vedno več je hitro pripravljene hrane. Pojavil se je trend po zmanjševanju soli. Spremembe v tehnologiji in industrijski proizvodnji živil vodijo do

daljših rokov uporabnosti, kar predstavlja večje tveganje za okužbo hrane z listerijami.

Odpornost bakterij proti protimikrobnim zdravilom se je v zadnjih letih močno povečala. V Franciji so že odkrili seve *L. monocytogenes*, odporne proti eritromicinu, tetraciklinu in trimetoprimu. Drugod po svetu so osamili večkratno odporne seve. Čeprav v Evropi po zadnjih podatkih niso odkrili seva, odpornega proti penicilinu, se minimalne inhibitorne koncentracije povečujejo (24).

Industrijska proizvodnja živil, kombinirana z globalno trgovino, in majhno število obolenih predstavljata oviro pri tradicionalnih epidemioloških raziskavah. Z genotipizacijo sevov listerij lahko razlikujemo posamezne gruče, spremljamo prenos listerij iz okolja po prehranjevalni verigi in lažje določimo in raziščemo vir okužbe. Učinkovitost mikrobiološkega nadzora je povsem odvisna od doslednega in pravočasnega zbiranja in tipiziranja izolatov na državnem in evropskem nivoju.

Listerioza še vedno predstavlja izziv. V Franciji je *L. monocytogenes* kot povzročiteljica encefalitisov na četrtem mestu (25). Zaradi visoke stopnje smrtnosti (okoli 20 %) in naraščajoče incidence v nekaterih državah v Evropi je potrebno poostriiti in izboljšati nadzor nad listerijami. V delo na laboratorijsko-diagnostičnem področju v sodelovanju z medicinsko stroko ter epidemiološko službo bo potrebno vložiti več truda in tako dosledno odkrivati vzroke in vire zastrupitev.

LITERATURA

1. Sauters BD, Overdeest J, Fortes E, et al. Diversity of listeria species in urban and natural environments. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78 (12): 4420–33.
2. Bertsch D, Rau J, Eugster MR, et al. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *Int J Syst Evol Microbiol.* V tisku 2012.
3. European Food Safety Authority. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal* [internet]. 2012 [citirano 2012 May 25]; 10 (3): 2597. Dosegljivo na: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2597.pdf>
4. Allerberger F, Wagner M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16 (1): 16–23.
5. Sauters BD, Wiedmann M. Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. In: Ryser ET, Marth EH, eds. *Listeria, listeriosis, and food safety.* 3rd ed. Boca Raton: CRC Press; 2007. p. 21–53.
6. Direktiva 2003/99/ES Evropskega Parlamenta in Sveta, z dne 17. novembra 2003 o spremljanju zoonoz in povzročiteljev zoonoz, ki spreminja Odločbo Sveta 90/424/EGS in razveljavlja Direktivo Sveta 92/117/EGS.
7. EFSA Zoonosis Monitoring Slovenia The Report referred to in Article 9 of Directive 2003/99/EC Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in humans, foodstuffs, animals and feedingstuffs 2009 [internet]. 2012 [citirano 2012 May 25]. Dosegljivo na: <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/zoocountryreport09si.pdf>

8. Uredba Komisije (ES) št. 2073/2005, z dne 15. novembra 2005, o mikrobioloških merilih za živila, z vsemi spremembami.
9. Zavod za zdravstveno varstvo Maribor, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije. Poročilo o programu vzorčenja in laboratorijskih preskusov živil ter materialov in izdelkov, namenjenih za stik z živilo, za leto 2010. Maribor, Ljubljana; 2011.
10. Zdovc I, Zelenik K, Pate M, et al. A case of cutaneous listeriosis in a man. *Proceedings of the 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases [CD-ROM]*; 2008 Apr 19–22; Barcelona, Spain. Barcelona; 2008.
11. Mook P, Grant KA, Little CL, et al. Emergence of pregnancy-related listeriosis amongst ethnic minorities in England and Wales. *Euro Surveill [internet]*. 2010 [citirano 2012 May 25]; 15 (27): 17–23. Dosegljivo na: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19610>
12. Goulet V, King L, Vaillant V, et al. Estimated incubation periods for listeriosis vary according to clinical form of disease. *Proceedings of the International Symposium on Problems of Listeria*; 2010 May 5–8; Porto, Portugal. Porto; 2010.
13. Ooi ST, Lorber B. Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clin Infect Dis*. 2005; 40 (9): 1327–32.
14. Orsi RH, den Bakker HC, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol*. 2011; 301 (2): 79–96.
15. Trkov M, Rupel T, Müller-Premru M, et al. Serotypes of *Listeria monocytogenes* strains isolated from clinical and food samples. In: Janežič S, Benčina M, Rupnik M, eds. *Proceedings of the 9th Congress of the Slovenian Biochemical Society [also] 5th Congress of the Slovenian Microbiological Society with International Participation [also] 3rd CEFORM (Central European Forum for Microbiology)*; 2011 Oct 12–15; Maribor, Slovenia. Maribor: Zavod za zdravstveno varstvo; 2011. p. 226.
16. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters [internet]. Version 2.0, valid from 2012-01-01. [citirano 2012 Oct 3]. Dosegljivo na: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_2.0_120221.pdf
17. Zakon o nalezljivih boleznih (uradno prečiščeno besedilo). Uradni list RS, št. 33/06.
18. Lorenčič Robnik S, Lušicky M, Reberšek Gorišek J, et al. Okužbe z bakterijo *Listeria monocytogenes* pri materah in novorojenčkih. *Med Razgl*. 2006; 45 (3): 81–9.
19. Trkov M, Müller-Premru M, Lorenčič Robnik S, et al. Listerioza v Sloveniji v letu 2010: laboratorijsko spremljanje. Enboz [internet]. 2011 [citirano 2012 Jun 25]; 1 (3): 12–13. Dosegljivo na: http://www.ivz.si/Mp.aspx/tukaj.pdf?ni=223&pi=5&_5_attachmentID=3279&_5_attachmentName=tukaj&_5_mimeType=application%2fpdf&_5_action=DownloadAttachment&pl=223-5.3
20. Hellström S. Contamination Routes and Control of *Listeria monocytogenes* in Food Production [akademsko disertacija]. Helsinki: University of Helsinki; 2011.
21. Fretz R, Pichler J, Sagel U, et al. Update: Multinational listeriosis outbreak due to 'Quargel', a sour milk curd cheese, caused by two different *L. monocytogenes* serotype 1/2a strains, 2009–2010. *Euro Surveill [internet]*. 2010 [citirano 2012 May 25]; 15 (16). Dosegljivo na: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19543>
22. Fretz R, Sagel U, Ruppitsch W, et al. Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese 'Quargel', Austria and Germany 2009. *Euro Surveill [internet]*. 2010 [citirano 2012 May 25]; 15 (5). Dosegljivo na: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19477>
23. Gillespie IA, Mook P, Little CL, et al. Human listeriosis in England, 2001–2007: association with neighbourhood deprivation. *Euro Surveill [internet]*. 2010 [citirano 2012 May 25]; 15 (27). Dosegljivo na: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19609>
24. Granier SA, Moubareck C, Colaneri C, et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77 (8): 2788–90.
25. Mailles A, Vaillant V, Lecuit M, et al. Listeriosis: a frequent cause of fatal encephalitis in France with high case fatality. *Proceedings of the International Symposium on Problems of Listeria*; 2010 May 5–8; Porto, Portugal. Porto; 2010.
26. Denny J, McLauchlin J. Human *Listeria monocytogenes* infections in Europe – an opportunity for improved European surveillance. *Euro Surveill [internet]*. 2008 [citirano 2012 May 25]; 13 (13). Dosegljivo na: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=8082>
27. Coetzee N, Laza-Stanca V, Orendi JM, et al. A cluster of *Listeria monocytogenes* infections in hospitalised adults, Midlands, England, February 2011. *Euro Surveill [internet]*. 2011 [citirano 2012 May 25]; 16 (20). Dosegljivo na: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19869>
28. Guillet C, Join-Lambert O, Le Monnier A, et al. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg Infect Dis [internet]*. 2010 [citirano 2012 May 25]. Dosegljivo na: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/16/1/09-1155.htm>

Brane Krt¹, Matjaž Ocepek², Tatjana Avšič - Županc³, Manica Mueller - Premru⁴

Bruceloza in njena diagnostika – problem veterinarske in humane medicine

Brucellosis and Its Diagnostics – Problem of Veterinary and Human Medicine

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: bruceloza, diagnostika, laboratorijske okužbe

Bruceloza je kužna bolezen živali in ljudi, ki povzroča velike izgube v rejah prežvekovalcev in prašičev. Brucele so zelo kužne in nevarne za rejce, veterinarje in laboratorijske delavce, saj so med najpogostejšimi povzročitelji laboratorijskih okužb. Za diagnostiko bruceloze se poleg osamitve povzročitelja uporabljajo predvsem varnejše serološke in molekularne metode. Bruceloze, ki bi ogrožala zdravje ljudi, pri domačih živalih v Sloveniji že dolgo ni. Zaradi vse večje migracije ljudi in trgovanja z živalmi s področij, kjer je bruceloza endemična, pa je verjetno, da se bo v prihodnje občasno pojavljala tako pri ljudeh kot pri živalih. Zato je pomembno, da je obveščanje dobro in da so diagnostični laboratoriji usposobljeni za hitro in zanesljivo ter za laboratorijskega delavca varno diagnostiko.

ABSTRACT

KEY WORDS: brucellosis, diagnostics, laboratory-acquired infections

Brucellosis is a contagious disease affecting animals and humans. It causes serious losses in the breeding of ruminants and pigs. The bacteria of the genus *Brucella* are very infectious and dangerous for breeders, veterinarians and laboratory personnel, since they are among the most common agents causing laboratory-acquired infections. In addition to the isolation of the agent, safer serological and molecular methods are more often being employed for the diagnostics of brucellosis. In Slovenia, brucellosis that could endanger human health has not been present in domestic animals for a long time. However, due to increasing migration of people and trade of animals from areas where brucellosis is endemic, its occasional occurrence in the future is probable both in humans and in animals. It is therefore important that the information is timely and that diagnostic laboratories are qualified for rapid and reliable diagnostics, which is also safe for laboratory workers.

¹ Znan. sod. dr. Brane Krt, dr. vet. med., Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, 1000 Ljubljana; brane.krt@vf.uni-lj.si

² Viš. znan. sod. dr. Matjaž Ocepek, dr. vet. med., Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, 1000 Ljubljana

³ Prof. dr. Tatjana Avšič - Županc, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁴ Prof. dr. Manica Mueller - Premru, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

UVOD

Bruceloza je kužna bolezen živali in ljudi, ki jo povzročajo bakterije iz rodu *Brucella*. Za bolezen so dovzetne številne živalske vrste. V rejah goveda, ovc, koz in prašičev povzročajo velike izgube. Slednje so toliko večje, ker je bruceloza zelo pomembna, saj je v svetovnem merilu najpogostejša zoonoza in so zato ukrepi za zatiranje bolezní zelo strogi. Ljudje se okužijo predvsem z mlekom in mlečnimi izdelki, pa tudi z neposrednim stikom z živalmi, zlasti ob abortusih, ki so najbolj značilen znak bolezní pri živalih. Za človeka so patogene *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* in *B. canis*.

Brucella abortus

Brucella abortus povzročajo brucelozo predvsem pri govedu (goveja bruceloza). Bolezní v Sloveniji ni; nazadnje je bila ugotovljena leta 1961. Značilni za bolezen so abortusi, ki se pojavljajo v drugi polovici brejosti. Najbolj so dovzetne spolno zrele živali. Do okužbe pride z okuženo krmo ali ob pripustu. Ob abortusu, pa tudi ob normalnem porodu bolnih živali, se sprosti veliko klic, ki so predvsem v plodovih vodah, posteljici in v plodu samem. Brucele se pogosto izločajo z mlekom, tudi če v vimenu ni patoloških sprememb.

Brucella melitensis

Brucella melitensis povzročajo brucelozo predvsem pri ovcah in kozah (melitokokoz). Pojavljajo se abortusi, drugih simptomov pa ni. *Brucella melitensis* je med vsemi brucelami najbolj nevarna človeku, ker je najpogostejša in povzročajo najtežje oblike bolezní. Vir okužbe so najpogostejše mleko in mlečni izdelki. Bolezní v Sloveniji pri živalih ni od leta 1951.

Brucella suis

Brucella suis je patogena predvsem za prašiče. Povzročajo abortuse, pri merjascih pa vnetje mod in obmodkov. Večkrat povzročajo tudi vnetja sklepov. V Sloveniji je ni, razen biotipa 2, ki se sporadično pojavlja pri zajcih in ki naj ne bi bil, za razliko od ostalih biotipov *B. suis*, patogen za človeka.

***Brucella canis* in druge brucele**

Brucella canis povzročajo abortuse in vnetja nadmodka pri psih. V Sloveniji še ni bila ugotovljena.

Brucella ovis se najpogostejše kaže z vnetjem nadmodka pri ovcah, patogena je samo za ovce. V Sloveniji smo jo prvič ugotovili leta 1990 in jo tudi hitro zatrli.

Brucella neotomae se pojavlja samo pri puščavskih podganah, *B. phocae*, *B. phoeniceae* in *B. delphini* pa so bili ugotovljeni pri morskih sesalcih. Avstrijci so pred nedavnim odkrili novo vrsto, *B. microti*, in sicer pri voluharjih (1, 2).

ZGODOVINA IN TRENUTNO STANJE

Bruceloza je razširjena na različnih geografskih področjih. Pojavljanje bruceloze je v največji meri odvisno od veterinarskega nadzora; če je ta učinkovit, se bruceloza ne pojavlja niti pri živalih niti pri ljudeh. Zato pojavnost in pogostnost bolezní močno nihata od države do države. Slovenija ima od leta 2005 status države uradno proste bruceloze pri ovcah in kozah, od leta 2007 pa status države uradno proste goveje bruceloze. Čeprav sta bili obe bolezní dejansko izkoreninjene pred več kot 60 oz. 50 leti, je morala država za pridobitev statusa (ki je eden od pogojev za nemoten promet z živalmi) izvesti s strani Evropske unije (EU) predpisan nadzor (monitoring) nad obema boleznima. Večji del tega nadzora (za pridobitev statusa) je bil opravljen v letih pred vstopom Slovenije v EU in po njem, v manjšem obsegu (za vzdrževanje statusa) pa se še vedno nadaljuje. Bolezen je mogoče nadzirati z ustreznoplošno obdelavo živil, predvsem mleka in mlečnih izdelkov, ter zakolom živali s pozitivno serološko reakcijo na brucelo. Za zaščito goveda, koz in ovac so na razpolago cepiva.

Ukrepi za preprečevanje vnosa bolezní z uvozom živali temeljijo predvsem na kontroli zdravstvenih certifikatov, ki spremljajo živali; uvoznih karanten, kakršne so bile pred vstopom Slovenije v EU, pa praktično ni več. To lahko predstavlja določeno tveganje za (ponovni) vnos bolezní v državo, saj je bruceloza prisotna v večini balkanskih in mediteranskih držav, sporadično pa se pojavlja tudi v nekaterih zahodnoevropskih državah, v sve-

tovnem merilu pa še na Bližnjem in Srednjem vzhodu, v Aziji, Afriki in v Južni Ameriki. Papas poroča, da letno v svetovnem merilu zbolijo za brucelozo 500.000 ljudi. Avtohtone bruceloze pri nas nimamo. Občasno pri ljudeh diagnosticiramo vnesene primere, predvsem iz Bosne, s Kosova, iz Makedonije, Srbije in Albanije, ki se okužijo v matičnih državah. Seveda pa tudi v Sloveniji, tako kot drugje po svetu, možno nevarnost za okužbo domačih živali predstavljajo divje živali, kjer pa je stanje glede bruceloze precej manj poznano. Največ poročil o tem se nanaša na primere prenosa *B. suis* z divjih na domače prašiče, izjemoma pa tudi na druge živali (npr. na govedo).

BRUCELOZA PRI LJUDEH

Ker je bruceloza zoonoza, se z živali lahko prenese na ljudi, ki prihajajo v stik z obolelo živaljo ali zaužijejo okužena živila. Brucele se s človeka na človeka običajno ne prenašajo. Človek se okuži na več načinov. Najpogosteje pridejo bakterije v človeška prebavila z zaužitjem okuženega mleka ali mlečnih izdelkov, možen pa je tudi prenos z neposrednim stikom skozi poškodovano kožo in z vdihavanjem ter preko očesne veznice. To velja predvsem za ljudi, ki so zaradi narave svojega dela (veterinarji, kmetje) dnevno v stiku z živalmi, in za laboratorijske delavce, ki delajo z bakterijskimi kulturami. Pot mikroba se iz prebavil nadaljuje skozi prebavno sluznico v limfo ter dalje do bezgavk in končno v kri. Fagocitne celice (monociti, makrofagi) požirajo mikrobe in jih raznesejo do različnih tkiv. Mikrobi se razmnožujejo v makrofagih (so fakultativno znotrajcelični), kar povzroči nastanek kronične granulomske vnetne reakcije, predvsem v bezgavkah, jetrih, vranici, kostnem mozgu, ledvicah in osrednjem živčevju. Bakterija nima toksinov, toksičen je njen lipopolisaharid. Izloča tudi protein, ki sodeluje pri nastanku granulomov.

Inkubacijska doba pri ljudeh traja od enega do šestih tednov, čeprav je težko določljiva. Okužba spodbudi celično in humoralno imunost. Specifična protitelesa IgM se pojavijo že v prvem tednu, protitelesa IgG pa v drugem tednu bolezni. Pri večini bolnikov se pojavijo simptomi v enem do treh tednih. Če je povzročitelj *B. melitensis*, se bolezen ime-

nuje malteška ali mediteranska mrzlica, če je *B. abortus*, se bolezen imenuje Bangova bolezen. Smrtnost je od 1 do 2 %.

Potek okužbe je zelo različen; lahko je akuten, kroničen ali asimptomatski. V primeru akutnega poteka se bolezen začne z vročino in mrzlico, splošno utrujenostjo, znojenjem, slabostjo, izgubo apetita, nespečnostjo, glavobolom, bruhanjem, zaprtostjo ali driskami, kašljem, pogosto z bolečinami v mišicah, sklepkih in križu, hujšanjem, motnjami koncentracije in depresijo. Glavni znak akutne bruceloze je dolgotrajna in valujoča vročina z mrzlico (lat. *febris undulans*), ki proti večeru naraste, proti jutru pa upade. Bolniki imajo lahko povečane bezgavke, jetra in vranico, vnetje sklepov, lahko se pojavi meningitis ali celo endokarditis. Bolezen je kronična, kadar določeni znaki trajajo več kot eno leto; prevladuje subfebrilna temperatura, glavobol, simptomi kronične utrujenosti, vnetja sklepov, vnetje enega ali več vretenc in depresija. Ponovitve se lahko pojavijo pri manj kot 10 % bolnikov v obdobju enega leta po okužbi, tudi pri zdravljenih primerih.

LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA PRI ŽIVALIH

Serološka diagnostika

Za ugotavljanje bruceloze pri živalih se daleč največ uporablja serološka diagnostika, kjer protitelesa dokazujemo v krvi ali v mleku (skupinski hlevski vzorci pri govedu). V seroloških testih uporabljamo antigene, pripravljene iz brucel v obliki S (*B. abortus*) ali R (*B. ovis* ali *B. canis*), odvisno od tega, katero živalsko vrsto preiskujemo. Metodologija v veterinarski serološki diagnostiki je predpisana in standardizirana (rezultati se pri nekaterih metodah izražajo v mednarodnih enotah).

V preteklosti se je največ uporabljala aglutinacija, v določeni meri je v uporabi tudi danes. Klasična aglutinacija (Wrightov test) je premalo občutljiva in specifična. Večkrat se pojavljajo navzkrižne reakcije s protitelesi proti drugim bakterijam. Največji problem je bakterija *Yersinia enterocolitica* serotip O:9, pa tudi nekatere druge. Navzkrižne reakcije (ki se pojavljajo tudi pri drugih seroloških testih, vendar redkeje) lahko v določeni meri odpravimo tako, da antigenu za aglutinacijo

dodamo npr. etilendiaminotetraacetno kislino (angl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA), merkaptoetanol ali pufer. Zato se danes od aglutinacijskih testov vse več uporabljajo hitri testi (npr. test Rose bengal, test s »puferiranim antigenom«), kjer je antigenu dodan pufer (pH 3,6-4), antigen sam pa je obarvan. Reakcijo izvajamo na predmetnem stekelcu ali impregniranem belem kartonu in jo odčitamo po nekaj minutah. Ta metoda se kot presejalni test v veterini uporablja najpogosteje. Podobna hitra aglutinacija se uporablja tudi pri diagnostiki okužbe z *B. canis*.

Za preiskave hlevskih vzorcev mleka se je do nedavnega veliko uporabljal mlečno prstanasti preizkus (MPP), v zadnjem času pa ga vse bolj izpodriva encimski imunski test (angl. *enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA), ki je bolj občutljiva in specifična metoda. ELISA se vse več uporablja tudi pri preiskavah serumov, kot presejalni in hkrati tudi potrditveni test.

Reakcija vezanja komplemента je bolj specifična in se zaradi zahtevnosti izvedbe uporablja predvsem kot potrditveni serološki test. Fluorescenčni polarizacijski test (angl. *fluorescence polarization assay*, FPA) je tudi dobro občutljiva in specifična metoda, ki pa se za razliko od drugih seroloških metod ne uporablja prav pogosto. Precipitacija v agar-skem gelu se lahko (poleg ELISA) uporablja pri diagnostiki okužbe z *B. ovis*.

Poleg seroloških testov se lahko v diagnostiki bruceleze uporablja tudi alergijski test. Reakcija temelji na poznem tipu preobčutljivosti. Na mestu vnosa bruceleina pride do eritema in edema. Test je slabo občutljiv, vendar zelo specifičen (1, 2).

Bakteriološka diagnostika

Najbolj zanesljiv dokaz bruceleze je osamitev brucel iz patološkega materiala. Brucele najlaže osamimo iz organov abortiranega plodu (predvsem iz želodca, vranice in pljuč) in posteljice, pa tudi iz mleka ali okužb na organih (modo, nadmodek, bezgavke). Primeren material (katerega odvzem je veliko manj nevaren za okužbo) za preiskavo so tudi nožnični ali (še bolje) brisi materničnega vratu, ki se lahko pošiljajo v preiskavo brez transportnega gojišča.

Iz kužnega materiala lahko pripravimo razmaze in jih obarvamo (barvanje po Macciavellu, Kösterju, prilagojeno barvanje po Ziehl-Neelsenu). Ta metoda je le orientacijska, saj brucel v razmazu ne moremo razlikovati od nekaterih drugih mikrobov. Poleg barvanja lahko brucele v razmazih iščemo tudi s pomočjo označenih (fluorokromi, encimi) protiteles.

Za osamitev brucel uporabljamo kompleksna gojišča, ki vsebujejo različne aminokisliline, tiamin, nikotinamid in ione magnezija. Rast je boljša, če gojišču dodamo 5-10% seruma ali krvi. Za osamitev iz kontaminiranega materiala uporabljamo selektivna gojišča z antibiotiki. Za prvo orientacijo pri določanju rodu opravimo nekatere osnovne biokemijske teste, med katerimi je najbolj uporaben test sinteze ureaze, ki je za brucele (razen *B. ovis*) zelo značilna (test je navadno pozitiven že v 0,5-2 urah).

Vrste in biotipe brucel lahko določamo z ugotavljanjem oksidativnega metabolizma nekaterih aminokislin in ogljikovih hidratov. V ta namen nam služi Warburgov ali Gilsonov respirometer, ki v zaprtem sistemu meri porabo kisika in s tem pove, ali pride do oksidacije določenih substratov. Metoda je zelo zahtevna in draga, pa tudi nevarna (možnost okužbe!), zato je primerna le za referenčne laboratorije.

Druža metoda za določanje vrste oz. biotipa, ki jo tudi izvaja malo laboratorijev, je fagotipizacija. Rutinsko se uporablja pet skupin fagov: Tbilisi, Weybridge, Firenze, Berkeley in R, včasih pa še Izatnagar in Nepean.

Pri določanju vrste si lahko pomagamo tudi s specifičnimi antiserumi (A, M, R) proti določenim antigenom. Med enostavnejše metode spada tudi barvni preizkus, pri katerem kulture, ki jih opredeljujemo, nasajamo na gojišča, ki vsebujejo bazični fuksin oz. tionin. Glede na to, ali na določenem gojišču rastejo ali ne, sklepamo, za katero vrsto oz. biotip gre (1, 2).

Molekularna diagnostika

Zaradi zahtevnosti nekaterih klasičnih metod in zaradi nevarnosti okužbe laboratorijskega osebja se danes pri determinaciji in tipizaciji večinoma uporabljajo molekularne metode. Le-te se lahko uporabijo tudi za neposred-

no dokazovanje brucel v kliničnih vzorcih (3–5). Zaradi zelo majhnih razlik med genomi različnih vrst brucel so molekularne metode omejene na ugotavljanje genov, ki so značilni za celoten rod brucel oz. za vrsti *B. abortus* in *B. melitensis*. Z modifikacijo protokolov pa lahko za neposredno dokazovanje brucel v kliničnih vzorcih z verižno reakcijo s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) uporabimo začetne oligonukleotide, ki sta jih opisali Brickerjeva in Hallingova in so prvenstveno namenjeni diferenciaciji brucel – t. i. AMOS PCR (6). Ker je slednji lahko določal le biovare 1, 2 in 4 *B. abortus*, biovar 1 *B. suis*, *B. melitensis* in *B. ovis*, so ga večkrat izpopolnjevali, dokler ni bil razvit nov postopek multipleks PCR, imenovan Bruce-ladder, ki ga trenutno uporablja večina veterinarskih laboratorijev (7).

Za molekularno epidemiologijo se je v preteklosti največ uporabljala tehnično zelo zahtevna metoda ugotavljanja polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP) (IS711 RFLP), ki pa jo je danes nadomestila predvsem hkratna analiza večjega števila lokusov z variabilnim številom tandemskih ponovitev (angl. *multiple-locus variable number tandem repeat analysis*, MLVA) (8, 9).

LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA PRI LJUDEH IN ZDRAVLJENJE

Brucele so zelo kužne in nevarne za laboratorijske delavce in so najpogostejše povzročiteljice laboratorijskih okužb. Pri mikrobiološki diagnostiki je pomembno, da klinik posumi na brucelozo in na to opozori laboratorij. Običajno je to težko, saj je klinična slika neznačilna in tudi sicer je bolezen pri nas redka. Okužbo z brucelami običajno odkrijemo slučajno, zato so laboratorijski delavci ob tem izpostavljeni tveganju za okužbo. Da bi preprečili laboratorijske okužbe, svetujemo uporabo molekularne in posredne serološke diagnostike, kjer bakterije predhodno inaktiviramo. Kadar je kultivacija nujna, bolniku odvzamemo hemokulture, redkeje pa druge kužnine, npr. punktate sklepov, kostnega mozga, likvor itd., in jih zasejemo na obogatena gojišča (10).

Brucele so po Gramu negativni kokobacili, ki se slabo razbarvajo. V kulturi rastejo počasi, nekatere vrste bolje v prisotnosti 5% CO₂. Imajo oksidazo in katalazo ter pozitiven ureazni test. Določitev vrste poteka v referenčnem laboratoriju s serološkimi ali z molekularnimi metodami. Delo mora potekati v laboratoriju 3. stopnje biološke varnosti.

V novejšem času se za hitro in varno mikrobiološko diagnostiko bruceloze uporabljajo različne molekularne metode. Na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani (IMI-MF) smo v ta namen uvedli metodo PCR v realnem času, ki omogoča hitro, občutljivo in specifično dokazovanje brucel v različnih kužninah bolnikov. Metoda zazna pridelke reakcije PCR na podlagi vezave specifičnih oligonukleotidnih lovk, označenih s fluorokromom FAM. Prav tako uporabljamo interno kontrolo, ki omogoča nadzorovanje uspešnosti reakcije v vsakem vzorcu. Interna kontrola ima vezano fluorescentno barvilo JOE. Spodnja meja občutljivosti testa, ki še daje zaupanja vredne rezultate, je 104 kopij/ml DNA.

Posredno dokazujemo okužbo z brucelami z encimskim imunskim testom (angl. *enzyme immunoassay*, EIA), kjer določamo specifična protitelesa razreda IgM in IgG. Diagnozo akutne okužbe z brucelami potrdimo z dokazom specifičnih protiteles razreda IgM in IgG ali le z dokazom specifičnih protiteles razreda IgM v akutnem serumskem vzorcu in/ali s serokonverzijo specifičnih protiteles razreda IgG v parnem serumskem vzorcu. Za diagnostiko kronične ali trajne okužbe priporočamo tudi dokazovanje specifičnih protiteles razreda IgA.

Na IMI-MF smo med letoma 2006 in 2012 mikrobiološko dokazali brucelozo pri šestih bolnikih (pri treh z osamitvijo iz krvi in z dokazom specifičnih protiteles, pri treh pa samo z dokazom specifičnih protiteles). Vsi bolniki so bili okuženi z vrsto *B. melitensis*.

Brucelozo zdravimo s kombinacijo doksiciklina šest tednov in streptomicina prve tri tedne ali rifampicina šest tednov. Izpostavljenim laboratorijskim delavcem svetujemo serološko testiranje takoj po izpostavitvi, nato pa v dvotedenskih razmikih do tri mesece in v mesečnih razmikih v nadaljnjih 3–9 mesecih po izpostavitvi. Če pride do masivne izpo-

stavitve bakterijam, preventivno dobijo antibiotike (11).

ZAKLJUČEK

Bruceloze pri živalih, ki bi ogrožala tudi ljudi, v Sloveniji že dolgo časa ni več. Seveda pa se položaj lahko zelo hitro spremeni, saj trgovanje z živalmi kljub strogemu nadzoru predstavlja grožnjo za vnos bolezni. Občasno pri

ljudeh diagnosticiramo vnesene primere, predvsem iz Bosne, s Kosova, iz Makedonije, Srbije in Albanije, ki se okužijo v matičnih državah. Brucele so tudi najpogostejše povzročiteljice laboratorijskih okužb. Zato je pomembno, da je obveščanje dobro in da so diagnostični laboratoriji usposobljeni za hitro in zanesljivo ter za laboratorijskega delavca varno diagnostiko.

LITERATURA

1. Nielsen K, Duncan JR. Animal brucellosis. Boca Raton: Blackwell Science; 1990.
2. World organisation for animal health. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: mammals, birds, and bees. Paris: Office international des épizooties; 2011.
3. Leal-Klevezas DS, Martinez-Vazquez IO, Lopez-Merino A, et al. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J Clin Microbiol.* 1995; 33 (12): 3087-90.
4. Serpe L, Gallo P, Fidanza N, et al. Single-step method for rapid detection of *Brucella* spp. in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction. *J Dairy Res.* 1999; 66 (2): 313-7.
5. Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol.* 2002; 90 (1-4): 435-46.
6. Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol.* 1994; 32 (11): 2660-6.
7. Garcia-Yoldi D, Marin CM, de Miguel MJ, et al. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clin Chem.* 2006; 52 (4): 779-81.
8. Al Dahouk S, Le Fleche P, Nockler K, et al. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. *J Microbiol Methods.* 2007; 69 (1): 137-45.
9. De Santis R, Ciammaruconi A, Faggioni G, et al. High throughput MLVA-16 typing for *Brucella* based on the microfluidics technology. *BMC Microbiol.* 2011; 11: 60.
10. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, et al. Brucellosis. *N Engl J Med.* 2005; 352 (22): 2325-36.
11. Yagupsky P, Baron EJ. Laboratory exposures to brucellae and implications for bioterrorism. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11 (8): 1180-5.

Irena Zdovc¹, Majda Golob², Katja Seme³, Urška Zajc⁴, Jerneja Ambrožič - Avguštin⁵

Odpornost proti protimikrobnim zdravilom pri bakterijah, izoliranih iz živali in živil

Antimicrobial Resistance of Bacteria Isolated from Animals and Food

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: odpornost proti antibiotikom, proti meticilinu odporni stafilokoki, betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja, živali, veterinarska medicina

V zadnjem času je odpornost bakterij proti antibiotikom v veterinarski medicini postala velik problem tako pri ekonomskih kot tudi pri ljubiteljskih vrstah živali. Veterinarji za male živali pogosto ostajajo nemočni pri zdravljenju okužb z bakterijami, proti katerim nimajo na voljo učinkovitih antibiotikov, registriranih za veterinarsko uporabo. Pri živalih, ki so namenjene za prehrano ljudi, imajo velik zoonotični pomen proti meticilinu odporni stafilokoki, ki so razširjeni predvsem v rejah prašičev. V zadnjih letih postajajo problem tudi enterobakterije, ki izločajo betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja. Vsi omenjeni problemi imajo lahko zelo velik vpliv na zdravje ljudi, zato jih je mogoče reševati le z odgovornim in usklajenim delom vseh vpletenih strok.

ABSTRACT

KEY WORDS: antimicrobial resistance, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, extended spectrum beta-lactamases, animals, veterinary medicine

Recently, bacterial resistance to antibiotics has become a major problem in veterinary medicine for both economic and pet animals. Veterinarians in small animal practices are often helpless when treating infections against which there are no effective antibiotics, registered for veterinary use. In food-producing animals, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (live-stock-associated), found mainly among pig population, is of great zoonotic significance. Recently, *Enterobacteriaceae* have also become clinically and epidemiologically troublesome. They are capable of producing extended-spectrum beta-lactamases. All these problems can have a tremendous impact on human health, which is why they can only be solved with responsible and coordinated work of all involved professions.

¹ Doc. dr. Irena Zdovc, dr. vet. med., Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, 1000 Ljubljana; irena.zdovc@vf.uni-lj.si

² Asist. Majda Golob, dr. vet. med., Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, 1000 Ljubljana

³ Prof. dr. Katja Seme, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁴ Urška Zajc, dr. vet. med., Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, 1000 Ljubljana

⁵ Doc. dr. Jerneja Ambrožič - Avguštin, univ. dipl. biol., Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

UVOD

V veterinarski medicini se je uporaba antibiotikov začela že zelo kmalu po uvedbi antibiotičnega zdravljenja pri ljudeh. Sprva so se antibiotiki uporabljali le za zdravljenje posameznih bolnih živali, kasneje pa tudi za preprečevanje okužb v populacijah z večjim tveganjem za pojav bakterijskih bolezni, predvsem za preprečevanje okužb dihal in prebavil v intenzivnih rejah perutnine, prašičev in telet. Največji problem pa je v preteklosti pomenilo dodajanje antibiotikov v krmo z namenom pospeševanja rasti živali (angl. *growth promoters*, GP). Zaradi potreb po intenzivni pridelavi hrane živalskega izvora je v nekaterih državah poraba antibiotikov za rejske namene celo preseгла porabo v veterini in medicini. V državah Evropske unije (EU) je sicer uporaba v rejske namene od leta 2006 popolnoma prepovedana, vendar je skupna uporaba antibiotikov še vedno prevelika (1).

Večina antibiotikov, ki se uporablja za zdravljenje živali, spada v iste ali podobne farmakološke skupine kot tisti antibiotiki, ki se uporabljajo za ljudi. Zato bakterije pri živalih pogosto razvijejo podoben način sekundarne odpornosti, kar lahko privede do težav pri zdravljenju ljudi in živali, ne glede na to, v katerih populacijah je bila odpornost pridobljena. To je še posebno nevarno pri nekaterih povzročiteljih zoonoz (npr. iz rodov *Salmonella* in *Campylobacter*) ali pa v primerih, ko se geni za odpornost prenašajo iz živalskih v sorodne človeške bakterije in obratno. Pojav večkratno odpornih bakterijskih sevov pri živalih je pomemben s stališča zdravja živali in hkrati varovanja zdravja ljudi. Način in pogostnost uporabe antibiotikov v veterinarski medicini sta močno odvisna od ljubiteljskega ali ekonomskega namena reje, zato se pri različnih živalskih vrstah in celo kategorijah živali precej razlikujeta (2, 3).

ODPORNE BAKTERIJE PRI LJUBITELJSKIH VRSTAH ŽIVALI

Pri ljubiteljskih vrstah živali postaja zdravstvena problematika zelo podobna kot pri ljudeh. Pri psih in mačkah je pogostejše bolnišnično zdravljenje in s tem povezane okužbe, zaradi daljše življenjske dobe je več živali

s slabšim imunskim odzivom (bolniki z rakavimi in kroničnimi boleznimi), več je tudi invazivnih posegov v telo. Uporaba antibiotikov je individualna in je namenjena le zdravljenju bolnih živali, izjemoma pa kot preventivni ukrep. Hišni ljubljenci živijo v zelo tesnem stiku z ljudmi, zato je možen neposredni prenos bakterij z živali na človeka in obratno (4–6).

Staphylococcus aureus* in *Staphylococcus pseudintermedius

Pri domačih živalih so stafilokoki razmeroma pomembne oportunistično patogene bakterije in pogosti povzročitelji različnih lokalnih in sistemskih okužb (7–9). Podobno kot pri ljudeh so klinično pomembne predvsem koagulazno pozitivne vrste stafilokokov (KPS). Pri domačih živalih so poleg vrste *Staphylococcus aureus* pomembni še stafilokoki skupine *Staphylococcus intermedius* (angl. *Staphylococcus intermedius group*, SIG), kamor spadajo *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus intermedius* in *Staphylococcus delphini*. Pri stafilokokih je zaradi izločanja betalaktamaz pogosto izražena odpornost proti penicilinom, ki lahko doseže preko 70 % (8, 9). Zdravljenje je uspešno z betalaktamskimi antibiotiki v kombinaciji z inhibitorji betalaktamaz, poleg tega pa so taki sevi običajno dobro občutljivi tudi za večino ostalih antibiotikov (8, 9). Večji problem predstavljajo stafilokoki, ki so odporni proti meticilinu (angl. *methicillin-resistant staphylococci*, MRS), kar pomeni, da so odporni tudi proti vsem ostalim betalaktamskim antibiotikom (penicilini, cefalosporini, monobaktami in karbapenemi), razen proti novejšim cefalosporinom, ki učinkujejo tudi na proti meticilinu odporni *Staphylococcus aureus* (angl. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) (10).

Proti meticilinu odporni *Staphylococcus aureus*

Pri psih in mačkah je okužba ali kolonizacija z MRSA razmeroma redka, sevi pa so navadno enaki kot tisti, ki prevladujejo v populaciji ljudi, s katerimi živali živijo. Pri živalih in njihovih lastnikih je navadno izoliran isti tip MRSA, vendar je smer prenosa težko dokazati (4, 11). V Sloveniji je bil doslej ugotovljen

edini primer MRSA pri mački s kroničnim vnetjem ušesa, kjer sta bila izolirana dva različna fenotipa (hemolitični in nehemolitični). Vendar sta oba izolata pripadala istemu genotipu (ST 1327, *spa* t005), ki ga sicer najdemo pri ljudeh (neobjavljeni podatki).

Proti meticilinu odporni *Staphylococcus pseudintermedius*

Za pse in mačke je mnogo bolj pomemben proti meticilinu odporen *S. pseudintermedius* (angl. *methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius*, MRSP), ki ima identično vlogo kot MRSA pri ljudeh (5). Podobno kot pri človeških izolatih je za odpornost odgovoren gen *mecA*, ki je del velikega genskega elementa *SCCmec* (angl. *staphylococcal cassette chromosome mec*). Na tem elementu so prisotni tudi zapisi za druge lastnosti, lahko tudi za odpornost proti drugim antibiotikom. Sevi MRSP so lahko hkrati odporni proti nekaterim ne-beta-laktamskim skupinam antibiotikov (npr. kinolonom, tetraciklinom), običajno so izjemno odporni proti več skupinam antibiotikov in se v nekem okolju verjetno širijo klonalno. Prevalenca pri psih je po podatkih iz literature 0–17%, vendar je v resnici verjetno precej višja (2, 5, 8, 9). Eden izmed možnih razlogov je dejstvo, da pri osnovni rutinski diagnostiki take izolate lahko spregledamo. *S. pseudintermedius* je morfološko in biokemijsko zelo podoben *S. aureus* in *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, vendar ima drugačne fenotipske kriterije za določanje odpornosti proti meticilinu. Zato je pravilna identifikacija izolata do vrste zelo pomembna zaradi pravilne izbire kriterijev za odpornost (10). Pri disk difuzijski metodi so za testiranje MRSP (za razliko od MRSA) bolj zanesljivi rezultati, ki jih dobimo z oksacilinskim diskom ($R = 17$ mm), medtem ko je test s cefoksitinskim diskom manj zanesljiv ($R = 23$ mm).

Pri sevih, ki so bili doslej izolirani v Sloveniji, so bili ugotovljeni različni vzorci odpornosti. Najbolj pogosti so sevi, ki so poleg proti betalaktamom odporni še proti kinolonom (ciprofloksacin, enrofloksacin, marbofloksacin), makrolidom (eritromicin, azitromicin), linkozamidom (klindamicin), aminoglikozidom (gentamicin, neomicin), kombinaciji trimetoprima s sulfonamidom, nekateri pa poleg

tega še proti tetraciklinom, razen doksiciklinu (12, 13).

Pri psih in mačkah se pojavljajo še proti meticilinu odporni *S. schleiferi* subsp. *coagulans* in različni koagulazno negativni stafilokoki (KNS), predvsem *S. felis*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. epidermidis* in *S. warneri*. Verjetno so to prvotni nosilci gena *mecA*, ki je odgovoren za odpornost proti meticilinu, vendar so kot povzročitelji okužb običajno manj pomembni (2, 8, 9).

Zoonotični pomen

Objavljenih je več raziskav o kolonizaciji ljudi in živali z istimi vrstami in celo tipi stafilokokov (11). Kadar so psi in mačke kolonizirani z MRSA, gre navadno za klone, ki evolucijsko pripadajo človeku, medtem ko so kloni MRSP popolnoma živalskega izvora (5). Opisani so redki primeri okužb z MRSP pri ljudeh, ki so v tesnem stiku z živalmi, vendar temu raziskovalci ne pripisujejo večjega zoonotičnega pomena, ker so okužbe ljudi z MRSP praviloma pogojene s stanjem zmanjšane imunske sposobnosti bolnika. Ne smemo pa zanemariti potencialne možnosti prenosa genskega elementa *SCCmec* na druge stafilokoke, predvsem *S. aureus*.

Enterokoki

Enterokoki so normalni predstavniki črevesne mikroflore, ki naseljujejo tudi kožo in sluznice, povzročajo pa lahko različne bolezni tako pri ljudeh kot pri vseh vrstah domačih živali. Pri ljubiteljskih živalih najpogosteje povzročajo enteritis, okužbe sečil, septikemijo, endokarditis, okužbe ran in mastitis. V zadnjem času so tudi v Sloveniji opisani posamezni primeri okužb z večkratno odpornimi enterokoki pri psih (sepsa, okužbe sečnega mehurja), ki so dokaz, da postajajo enterokoki tudi pri živalih vse pogostejši povzročitelji ponavljajočih se, težko ozdravljivih okužb (14, 15). Zdravljenje enterokoknih okužb je zaradi intrinzične odpornosti enterokokov proti številnim skupinam antibiotikov že sicer precej oteženo (10). Poleg tega lahko med zdravljenjem hitro razvijejo mehanizme odpornosti proti uporabljenim antibiotikom, hkrati pa predstavljajo rezervoar genov za odpornost, ki se lahko predvsem s plazmidi prenaša tudi na

druge, bolj patogene bakterije (npr. *S. aureus*, vključno z MRSA, in *S. pseudintermedius*, vključno z MRSP). Prisotnost enterokokov pri ljubiteljskih vrstah živali pa lahko predstavlja potencialni vir okužbe za ljudi (16).

Escherichia coli

Escherichia coli lahko pri ljudeh in domačih živalih povzroča različna obolenja. Večina sevov je del normalne mikrobne flore v različnih organskih sistemih, nekateri pa imajo različne dejavnike patogenosti. Sevi *E. coli* iz živali in okolja so lahko nosilci genov za odpornost, ki se lahko prenesejo na človeku prilagojene patogene seve *E. coli*. V takih primerih je zdravljenje težje, daljše in pogosto manj uspešno (2).

Največji problem predstavljajo sevi *E. coli*, ki izločajo plazmidno kodirane betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja (angl. *extended-spectrum beta-lactamases*, ESBL). Nasprotno pa je zapis za betalaktamaze AmpC kodiran na kromosomu in omogoča odpornost proti drugi in tretji generaciji cefalosporinov (vključno s kombinacijo antibiotika in inhibitorji betalaktamaz) ter cefamicinom (npr. cefoksitin), sevi pa so običajno občutljivi še za četrto generacijo cefalosporinov (npr. cefepim, cefkvinom) in karbapeneme. Encimi AmpC so lahko kodirani tudi plazmidno (17, 18). Pomembne so plazmidno kodirane betalaktamaze AmpC CMY in ESBL razreda A (TEM, SHV, CTX-M). Večina sevov, izoliranih pri živalih, je hkrati odporna tudi proti kinolonom.

Težave z odpornimi sevi *E. coli* tipa ESBL so bile omejene predvsem na bolnišnične okužbe ljudi, poročila o okužbah živali pa so bila redka (2). V Sloveniji je bilo do leta 2010 pri živalih na voljo le omejeno število podatkov, ki so se nanašali predvsem na klinične vzorce ljubiteljskih vrst. Opisani so bili primeri izolacije *E. coli*, ki izloča ESBL, iz sluhovoda psa s kroničnim vnetjem ušes (CTX-M1), pri mački z vnetjem fascij (CTX-M2) in iz blata budre (CTX-M1). Pri nobeni živali ni bil ugotovljen vir okužbe (2, 13). V zadnjih letih se vse enterobakterije, izolirane iz kliničnih vzorcev živali (največji delež predstavlja urin), testirajo tudi na prisotnost ESBL/AmpC.

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa je pogojno patogen mikroorganizem, ki povzroča resne okužbe predvsem pri živalih z oslabiljenim imunskim sistemom in po dolgotrajnem antibiotičnem zdravljenju, je pa tudi pomemben povzročitelj bolnišničnih okužb. Pri mesojedih živalih, še posebej pri psih, najpogosteje povzroča obsežna vnetja zunanega sluhovoda. V primeru neuspešnega zdravljenja lahko prodre v globlja tkiva in povzroči vnetje srednjega ušesa, poškodbe možganskega živca in osteomielitis (19).

Za *P. aeruginosa* je značilno, da je odporen proti številnim antibiotikom, kar je lahko posledica bodisi intrinzične odpornosti proti določenim skupinam antibiotikov ali pa pridobljene odpornosti posameznih sevov. V literaturi je opisano, da lahko posamezni sevi *P. aeruginosa* razvijejo odpornost proti antibiotikom med terapijo celo v nekaj dneh (10). Pri večini sevov ugotovljamo odpornost vsaj proti enemu antibiotiku, ki se ponavadi uporablja za zdravljenje. V zadnjem času je opazna povečana odpornost proti fluorokinolonom, ki je v preteklosti dosegala največ 5%, po letu 2009 pa je strmo narasla do 25% za ciprofloksacin, za enrofloksacin pa celo čez 40% (19).

Acinetobacter baumannii

Do nedavnega je bila bakterija *Acinetobacter baumannii* znana le v humani medicini kot oportunistična patogena bakterija in ena izmed povzročiteljic bolnišničnih okužb. Okužbe živali so opisane zelo redko in vloga *A. baumannii* je v veterinarski medicini še zelo nejasna. Za okužbo so dovezetni predvsem bolniki, ki imajo zmanjšano imunsko sposobnost oz. so podvrženi dolgotrajnemu zdravljenju zaradi drugih vzrokov. Prvi dokazan klinični primer okužbe živali z bakterijo *A. baumannii* je bil v Sloveniji opisan leta 2012 pri psu z akutnim vnetjem komolčnega sklepa. Zaradi odpornosti proti vsem antibiotikom, ki so registrirani za uporabo v veterinarski medicini, je bil pes uspešno zdravjen z imipenemom. Zaradi tega je bil ta primer posebej dokumentiran, hkrati pa sta bila izpostavljen problem naraščajoče odpornosti živalskih bakterij in vprašljivost upravičenosti

uporabe antibiotikov, ki so namenjeni za kritično rabo v humani medicini (20).

ODPORNE BAKTERIJE PRI GOSPODARSKIH VRSTAH ŽIVALI

Pri gospodarskih živalih je osebni stik s človekom manj izrazit, vendar lahko prihaja do prenosa odpornih bakterij (ali njihovih genov) preko hrane, kar pomeni, da se hkrati lahko kolonizira ali okuži večje število ljudi. Med domačimi živalmi, ki so namenjene za prehrano ljudi, najdemo največji delež živali z večkratno odpornimi bakterijami predvsem v rejah prašičev, perutnine in govedi (1, 17, 18).

Staphylococcus aureus* in proti meticilinu odporni *Staphylococcus aureus

Podatki o razširjenosti MRSA med gospodarskimi živalmi v večini držav EU in drugod po svetu so odprli novo poglavje v razumevanju vloge živali pri razvoju in širjenju odpornih bakterij. Do nedavnega so seve MRSA pri ljudeh razvrščali na osnovi epidemioloških in genetskih značilnosti na tiste, ki so pridobljeni v bolnišnicah (angl. *hospital-associated MRSA*, HA-MRSA) in druge, pridobljene zunaj njih (angl. *community-associated MRSA*, CA-MRSA). V zadnjih letih pa je postala pomembna še tretja skupina izolatov (angl. *livestock-associated MRSA*, LA-MRSA), ki je epizootiološko povezana s prašiči oz. s posebnim klonom ST398 (6, 8, 12).

Proti meticilinu odporni *Staphylococcus aureus* pri prašičih

Pri prašičih je najpomembnejši KPS *Staphylococcus hyicus*, ki povzroča sajavost (specifična oblika eksudativnega dermatitisa), medtem ko *S. aureus* nima večjega kliničnega pomena. Prvotna poročila, da so prašiči pomemben vir okužbe z MRSA pri ljudeh, se zato najprej niso zdela posebej pomembna. Prvi primeri so bili ugotovljeni le pri ljudeh, ki so bili v tesnem stiku s prašiči, predvsem pri delavcih na farmah ali njihovih družinskih članih. Na Nizozemskem so ugotovili, da je pri ljudeh, ki so v stiku s prašiči, prevalenca MRSA kar 23 %, identične seve pa so izolira-

li tudi pri njihovih živalih (21). Kasneje so seve tega klona zasledili tudi pri ljudeh, ki niso imeli neposredne povezave s prašiči. Na Nizozemskem je LA-MRSA pomembno prispevala k skupnemu povečanju deleža okužb z MRSA pri ljudeh (22–24).

Z uporabo ustaljenih protokolov teh izolatov najprej ni bilo mogoče uvrstiti v tedaj znane skupine, kasneje pa so jih s tipizacijo na osnovi multilokusnih zaporedij (angl. *multilocus sequence typing*, MLST) uvrstili v skupino ST398. Na osnovi gena za stafilokokni protein A (*spa*) izolati LA-MRSA pripadajo različnim *spa* tipom, med katerimi so najpogostejši t011, t034, t108 in t1245. Ker je večina izolatov odporna proti tetraciklinu, predvidevajo, da je bila uporaba tega antibiotika verjetno eden izmed selekcijskih dejavnikov. Price s sodelavci je za pojasnitev tega primera izbral in gensko analiziral 89 živalskih in človeških izolatov *S. aureus* CC398 iz 19 držav, med njimi tudi dva slovenska (23). Na podlagi sekvenc celotnega genoma je ugotovil, da je prašičji klon MRSA v osnovi človeški za meticilin občutljiv *S. aureus* (angl. *methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*, MSSA), ki je pod antibiotičnim selekcijskim pritiskom v populaciji prašičev pridobil odpornost proti meticilinu.

V Sloveniji je bilo na osnovi monitoringa iz leta 2008 izoliranih prvih 8 sevov iz hlevskega prahu, kar je po statistiki Evropske agencije za varnost hrane (angl. *European food safety authority*, EFSA) pomenilo manj kot 10-odstotno prekuženost slovenskih farm in nas uvrstilo med države z manjšo tveganostjo za okužbe ljudi. Sevi so pripadali trem najpogostejšim *spa* tipom (t011, t034, t108) in so bili vsi odporni proti tetraciklinu. Pri preiskavah prašičjega mesa leta 2011 je bila ugotovljena 33-odstotna kontaminacija prašičjega mesa z MRSA (13). V okviru projektne naloge (še neobjavljeni delni podatki) je bilo leta 2012 pregledanih še 50 brisov nosu prašičev na okuženi farmi, kjer je bila ugotovljena 94-odstotna prekuženost živali. Hkrati so bili pregledani še brisi nosu štirih delavcev (vsi pozitivni) in štirih veterinarjev vzorčevalcev (trije pozitivni, en negativen ob uporabi maske). Pri slednjih je šlo očitno le za kontaminacijo, ker so bili ob naslednjih dveh pregledih (po enem oz. dveh tednih) vsi brisi negativni. Pregledani

so bili še brisi nosu petih delavcev v laboratoriju, kjer so pregledovali prah, in vsi rezultati so bili negativni (neobjavljeni podatki).

Kljub pogosti kolonizaciji prašičev z MRSA pa veterinarji pri živalih ne zaznavajo resnih kliničnih stanj. Opisani so redki primeri okužb kože, sečnih poti in maternice ter mastitisa (25). V Sloveniji sta bila zabeležena le dva primera izolacije MRSA ST398 s kože prašiča z eksudativnim dermatitisom (sajavost), vendar verjetno nista imela kliničnega pomena, ker je v kulturi obakrat močno prevladoval *S. hyicus*, osnovni povzročitelj te bolezni (13).

Proti meticilinu odporni *Staphylococcus aureus* pri govedu

Staphylococcus aureus je pri govedu najpogostejši povzročitelj mastitisa, ki se običajno uspešno zdravi z antibiotiki. Prva izolacija MRSA pri kravi je bila opisana že leta 1972, kasneje pa so bila poročila dokaj redka, kar je mogoče pripisati tudi pomanjkljivi diagnostiki (8, 26–28). V Sloveniji je bila opravljena raziskava o prisotnosti MRSA v mleku 57 klinično zdravih krav iz rej, kjer je bilo v preteklosti večje število primerov stafilokoknega mastitisa. Skupno je bilo pregledanih 228 vzorcev, ki so bili sicer kljub velikemu številu izolatov *S. aureus* (56 %) vsi negativni na MRSA. Nimamo pa podatkov o primerih MRSA pri kravah s kliničnim mastitisom. Znano je, da se pri govedu pojavlja tudi klon ST398, kar je verjetno posledica prenosa s prašičev (28). Leta 2011 je bil pri kravah in ljudeh v Veliki Britaniji ugotovljen poseben tip MRSA, pri katerem so odkrili nov gen za odpornost proti meticilinu *mecA*_{LGA251}. Gen se nekoliko razlikuje od običajnega *mecA*, zato je za molekularno potrditev potrebna modificirana metoda (29). Zaradi dejstva, da so za okužbo dovzetni tudi ljudje, in strahu, da bi se klon razširil podobno kot LA-MRSA, bo potrebno goveje izolate testirati tudi na prisotnost gena *mecA*_{LGA251}.

Proti meticilinu odporni *Staphylococcus aureus* pri perutnini

Staphylococcus aureus in drugi stafilokoki lahko povzročajo pri perutnini različna bolezenska stanja, vendar so okužbe z MRSA verjetno manj pogoste. Opisani so primeri okužb piš-

čancev na gospodarstvu s kombinirano rejo perutnine in prašičev, kjer je zelo verjetno prišlo do prenosa bakterij z delavcev in opreme (30, 31).

Proti meticilinu odporni *Staphylococcus aureus* pri konjih

Konji imajo le še redko status gospodarskih živali in namesto tega pridobivajo pomembno vlogo družnih in športnih živali. Zaradi tega so se prva poročila o okužbah z MRSA pri konjih nanašala na sporadične klinične primere, ki so jih obravnavali v veterinarskih bolnišnicah. Največ poročil prihaja iz Kanade, predvsem o tipu ST8, ki je verjetno v osnovi človeški klon, dobro prilagojen na konje (9). Iz drugih držav poročajo tudi o primerih kolonizacije konj z MRSA ST398, ki se je med konje verjetno razširil z drugih gospodarskih živali, ni pa znano, če ima za konje tudi klinični pomen. Z Nizozemske poročajo tudi o prvem primeru prenosa ST398 s konja na človeka (32). V Sloveniji sta bili o MRSA pri konjih doslej opravljene dve raziskavi. Prvo je leta 2006 opravil Vengust s sodelavci na 300 konjih iz različnih populacij in vse pregledane živali so bile negativne na MRSA (33). Leta 2009 je bila na Veterinarski fakulteti opravljena dodatna raziskava na 76 plemenskih žrebcih (152 vzorcev), ki so bili prav tako vsi negativni. Na podlagi teh podatkov sklepamo, da je stanje glede MRSA pri slovenskih konjih v primerjavi z nekaterimi drugimi državami zelo ugodno. Vendar pa je bil ugotovljen zelo velik delež (37 %) živali, ki so bile nosilci proti meticilinu odpornih koagulazno negativnih stafilokokov, predvsem *S. sciuri* (12, 13).

Pomen proti meticilinu odpornih stafilokokov za zdravje ljudi

S stafilokoki kontaminirana hrana je lahko zdravju škodljiva iz dveh razlogov. Prva nevarnost je, da stafilokoki lahko izločajo enterotoksine (proizvodnja toksinov pri MRSA je enaka kot pri MSSA). Znana so poročila o zastrupitvah s kontaminiranim svinjskim mesom, vendar so primarni vzroki za kontaminacijo bolj verjetno z MRSA okuženi delavci. Če pride do vnosa živih bakterij MRSA s hrano, lahko to povzroči kolonizacijo prebavil z MRSA (3, 17). Drugi problem je kontami-

nirana hrana kot nosilec širjenja zunajčrevesnih okužb pri ljudeh, kar lahko vodi do enakih zapletov kot pri ostalih okužbah z MRSA.

Enterobakterije

Enterobakterije, predvsem *Salmonella* spp. in *E. coli*, so v vseh državah EU vključene v sistematično spremljanje odpornosti proti antibiotikom (17, 18).

Salmonella spp.

Salmonele so pomembne kot povzročiteljice zoonoz in so na srečo ohranile razmeroma dobro občutljivost za antibiotike. V Sloveniji ugotavljamo podobne serovare kot drugod v Evropski skupnosti, med njimi so najpogostejši Infantis, Typhimurium, Enteritidis, Tennessee, Derby, Saintpaul in drugi. Med posameznimi serovari salmonel se glede na odpornost proti antibiotikom pojavljajo zelo različni vzorci občutljivosti, vendar pa je na splošno lahko opaziti manjši delež večkratno odpornih izolatov kot pri drugih bakterijah (stafilokoki, kampilobaktiri, *E. coli*). Največji delež odpornosti je bil ugotovljen proti tetraciklinom, sulfonamidom, fluorokinolonom in ampicilinu, najmanjši pa proti tretji generaciji cefalosporinov (34). Podobno stanje je zabeleženo tudi v drugih državah EU, razen za skupino fluorokinolonov, kjer so podatki znotraj posameznih držav članic zelo različni. Občutljivost salmonel je na nivoju Evropske skupnosti v zadnjih letih (2005–2010) bolj ali manj stabilna. Opazni so trendi naraščanja odpornosti proti posameznim skupinam antibiotikov na nacionalni ravni (17, 34).

Escherichia coli

Escherichia coli je za gospodarske živali lahko pomembna patogena bakterija, poleg tega pa je tudi indikatorski mikroorganizem pri izvajanju monitoringov za spremljanje odpornosti proti antibiotikom. Podobno kot pri drugih bakterijah je tudi pri *E. coli* opazen trend naraščanja odpornosti proti različnim antibiotikom, predvsem proti fluorokinolonom in cefalosporinom. Problematika pojavljanja ESBL pa je večje razsežnosti dobila šele, ko so seve začeli ugotavljati tudi pri gospodarskih živalih, predvsem pri govedu in perutnini, še posebej pri brojlerjih (18, 24, 35–37).

Bakterije, ki izločajo ESBL/AmpC v mesu

Opozorila, da so ekonomske živali lahko nosilke odpornih sevov *E. coli*, ki se s hrano lahko prenašajo tudi na ljudi, so vedno bolj številna in podkrepljena z rezultati obsežnih raziskav (1). Na podlagi molekularne tipizacije so dokazali, da se podobni tipi odpornosti kažejo pri bakterijah človeškega, živalskega in okoljskega izvora in je tako možen prenos odpornih bakterij ali njihovih genov v vseh fazah prehranske verige (18, 35). Podatki iz različnih držav so slabo primerljivi, ker so bile raziskave narejene v različnih populacijah živali in z uporabo različnih metod izolacije. Primerjava ni mogoča predvsem zaradi neenotnega sistema vzorčenja. Individualni vzorci živali praviloma kažejo boljšo sliko kot vzorci mesa, kar je verjetno posledica naknadne kontaminacije v klavnicah in trgovinah. Vse to narekuje uvedbo enotnega in stalnega monitoringa prisotnosti ESBL v različnih vrstah živil (18).

V Sloveniji so bila v letu 2011 opravljena preliminarna testiranja o prisotnosti večkratno odpornih bakterij v mesu. Z usmerjeno preiskavo (tj. z uporabo selektivnih gojišč v vseh fazah izolacije bakterij) je bilo pregledanih 80 vzorcev perutninskega mesa in *E. coli* tipa ESBL/AmpC je bila izolirana iz več kot 70% vzorcev. Nasprotno pa v 60 pregledanih vzorcih prašičjega mesa bakterije, ki izločajo ESBL/AmpC, niso bile ugotovljene (13). Na podlagi preliminarnih rezultatov je pristojna veterinarska služba za leto 2012 odredila dodatni monitoring na večjem številu vzorcev, ki bo omogočal statistično ovrednotenje stanja.

ZAKLJUČEK

Preprečevanje odpornosti bakterij proti antibiotikom je v veterinarski medicini pomembno s stališča ohranjanja učinkovitih antibiotikov za zdravljenje živali in preprečevanja prenosa odpornih bakterij oz. genov za odpornost na ljudi. Hišni ljubljenci so glede količine porabljenih antibiotikov sicer manj pomembni kot velike živali, vendar bivajo v tesnem stiku s človekom in so dovzetni za okužbe z istimi ali podobnimi bakterijami. Poleg tega se za njihovo zdravljenje občasno uporabljajo antibiotiki, ki so registrirani samo za ljudi, zato lahko z nepravilno uporabo prispevajo k razvoju odpornosti. Zaradi tega bo potrebno zelo

natančno opredeliti, v katerih primerih bo (če sploh) dovoljeno za živali uporabljati rezervne antibiotike, katerih uporaba je pri ljudeh omejena samo na najbolj kritične primere. Poraba antibiotikov pri ekonomskih živalih se je v EU količinsko že zmanjšala s prepovedjo uporabe za pospeševanje rasti, vendar se

morajo ukrepi nadaljevati tudi na drugih področjih, predvsem pri zmanjšanju porabe za preventivno zdravljenje.

V prispevku so bili uporabljeni tudi podatki, ki smo jih pridobili pri delu v okviru projektne naloge CRP V4-1080.

LITERATURA

1. World health organisation. Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. Copenhagen: World health organisation; 2011.
2. Weese JS. Antimicrobial resistance in companion animals. *Anim Health Res Rev.* 2008; 9 (2): 169-76.
3. Catry B, van Duijkeren E, Pomba MC, et al. Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals: epidemiology and control options for human and animal health. *Epidemiol Infect.* 2010; 138 (5): 626-44.
4. Ferreira JP, Anderson KL, Correa MT, et al. Transmission of MRSA between companion animals and infected human patients presenting to outpatient medical care facilities. *PLoS ONE.* 2011; 6 (11): e26978.
5. Van Duijkeren E, Catry B, Greko C, et al. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66 (12): 2705-14.
6. Cohn LA, Middleton JR. A veterinary perspective on methicillin resistant staphylococci. *Journal of Vet Emerg Crit Care.* 2010; 20 (1): 31-45.
7. Leonard FC, Markey BK. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *Vet J.* 2008; 175 (1): 27-36.
8. Weese JS. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals. *ILAR J.* 2010; 51 (3): 233-44.
9. Weese JS, Van Duijkeren E. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet Microbiol.* 2010; 140 (3-4): 418-29.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute 2011 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement. CLSI document M100-S21. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
11. Hanselman BA, Kruth SA, Rousseau J, et al. Coagulase positive staphylococcal colonisation of humans and their household pets. *Can Vet J.* 2009; 50 (9): 954-8.
12. Zdovc I, Kušar D, Golob M. Pojav proti meticilinu odpornih stafilokokov pri domačih živalih v Sloveniji. In: Majdič G, ed. 4. slovenski veterinarski kongres; 2011 Nov 18-19; Portorož, Slovenia. Ljubljana: Veterinarska fakulteta; 2011.
13. Zdovc I, Golob M, Zajc U, et al. Pojav večkratno odpornih bakterij zaradi pretirane uporabe antibiotikov - veterinarski vidik. In: Trebov U, ed. Zbornik 9. strokovnega srečanja veterinarske zbornice; 2012 May; Laško, Slovenia. Ljubljana: Veterinarska zbornica; 2012. p. 10-4.
14. Golob M, Pavlin D, Zdovc I. Enterokokna sepsa pri psu. In: Majdič G, ed. 4. slovenski veterinarski kongres; 2011 Nov 18-19; Portorož, Slovenia. Ljubljana: Veterinarska fakulteta; 2011.
15. Brložnik M, Golob M, Zdovc I. Enterokokni cistitis pri psu - primer neučinkovitosti antibiotikov in vivo. In: 22. Simpozij o aktualnih boleznih malih živali; 2009 Mar 5-7; Lipica, Slovenia. Ljubljana: Slovensko združenje veterinarjev za male živali; 2009. p. 121-3.
16. Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Davis JA, et al. Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from dogs and cats in the United States. *J Appl Microbiol.* 2009; 107 (4): 1269-78.
17. European Food Safety Authority. Scientific report of EFSA and ECDC. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA Journal.* 2012; 10 (3): 2598.
18. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA Journal* 2011; 9 (8): 2322.
19. Golob M, Zdovc I. Odpornost bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, izolirane iz sluhovodov psov. In: 24. Simpozij o aktualnih boleznih malih živali; 2011 Apr 14-16; Portorož, Slovenia. Ljubljana: Slovensko združenje veterinarjev za male živali; 2011. p. 65-8.
20. Zdovc I, Matko M, Golob M. *Acinetobacter baumannii* v koločnem sklepu psa. In: 25. Simpozij o aktualnih boleznih malih živali; 2012 Mar 30-31; Portorož, Slovenia. Ljubljana: Slovensko združenje veterinarjev za male živali; 2012. p. 152-4.
21. Voss A, Loeffen F, Bakker J, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11 (12): 1965-6.

22. European Food Safety Authority. Report of Analysis of the baseline survey on the prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs in the EU in 2008. *EFSA Journal*. 2010; 8 (6): 1597.
23. Price LB, Stegger M, Hasman H, et al. *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in Livestock. *MBio*. 2012; 3 (1). pii: e00305-11.
24. Mevius DJ, Bondt N, Van den Giessen A, et al. MARAN 2008: Monitoring of antimicrobial resistance and antimicrobial usage in animals in the Netherlands in 2008 [internet]. Lelystad: Central Veterinary Institute; 2009 [citrano 2012 Jun 12]. Dosegljivo na: <http://edepot.wur.nl/148648>
25. Schwarz S, Kadlec K, Strommenger B. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the BfT-Germ-Vet monitoring programme 2004–2006 in Germany. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 61 (2): 282–5.
26. Devriese LA, Van Damme LR, Famaree L. Methicillin (cloxacillin) resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1972; 19 (7): 598–605.
27. Juhasz-Kaszanytzky E, Janosi E, Somogyi P, et al. MRSA transmission between cows and humans. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13 (4): 630–2.
28. Vanderhaeghen W, Carpentier T, Adriaensen C, et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. Brussels: Veterinary and Agrochemical Research Center; 2008. p. 30–4.
29. Garcia-Alvarez L, Holden MTG, Lindsay H, et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*. 2011; 11 (8): 595–603.
30. Pletinckx LJ, Verheghe M, Dewulf J, et al. Screening of poultry-pig farms for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Sampling methodology and within herd prevalence in broiler flocks and pigs. *Infect Genet Evol*. 2011; 11 (8): 2133–7.
31. Persons D, Van Hoorebeke S, Hermans K, et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Poultry. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15 (3): 452–3.
32. Van Duijkeren E, Ten Horn L, Wagenaar JA, et al. Suspected horse-to-human transmission of MRSA ST398 [pismo]. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17 (6): 1137–8.
33. Vengust M, Anderson ME, Rousseau J, et al. Methicillin-resistant staphylococcal colonisation in clinically normal dogs and horses in the community. *Lett Appl Microbiol*. 2006; 43 (6): 602–6.
34. Golob M, Gruntar I, Mičunovič J, et al. Odpornost zoonotičnih bakterij iz rodu *Salmonella* pri živalih in v živilih živalskega izvora. In: Zbornik 9. strokovnega srečanja veterinarske zbornice; 2012 May; Laško, Slovenia. Ljubljana: Veterinarska zbornica; 2012. p. 15–8.
35. Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Cohen Stuart J, et al. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17 (6): 873–80.
36. Zdovc I, Ambrožič - Avguštin J, Golob M, et al. Phenotypic and genotypic characterisation of antimicrobial resistance in *E. coli* isolates of animal origin in Slovenia. In: Janežič S, Benčina M, Rupnik M, et al., eds. 9th Congress of the Slovenian Biochemical Society [also] 5th Congress of the Slovenian Microbiological Society with International Participation [also] 3rd CEFORM (Central European Forum for Microbiology); 2011 Oct 12–15; Maribor, Slovenia. Maribor: Zavod za zdravstveno varstvo; 2011. p. 164.
37. Golob M, Krt B, Mičunovič J, et al. Antimicrobial resistance of *E. coli* strains isolated from raw meat in Slovenia in 2010. In: Mitrov D, ed. Days of veterinary medicine 2011; Skopje, Ohrid. Ohrid: Faculty of veterinary medicine – Skopje; 2011. p. 98–9.

Andrej Steyer¹, Ivan Toplak², Mateja Poljšak - Prijatelj³

Zoonotski potencial nekaterih enteričnih virusov in vloga vodnih virov pri njihovem kroženju v naravi

Zoonotic Potential of Some Enteric Viruses and the Role of Water Sources in Their Circulation in Environment

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: enterični virusi, virusi v hrani in vodi, zoonoze, virus hepatitisa A, virus hepatitisa E

Enterični virusi predstavljajo heterogeno skupino virusov iz različnih virusnih družin, kot so *Caliciviridae*, *Reoviridae*, *Astroviridae*, *Picornaviridae*. Čeprav spadajo v različne virusne družine, imajo nekatere skupne lastnosti, ki jim omogočajo obstojnost v okolju in s tem možnosti posrednih okužb s kontaminirano vodo in hrano. Med pomembne virusne predstavnike, ki se prenašajo z vodo in hrano, spadata tudi virus hepatitisa A in virus hepatitisa E. Najpogostejši vzrok posrednih okužb s tovrstnimi virusi so kontaminirani vodni viri. Vsaj za rotaviruse in virus hepatitisa E je dokazan tudi zoonotski prenos. Vnos živalskih iztrebkov v okolje ali neustrezno ravnanje z njimi je še dodaten vir mogočih okužb. Kontrolirano ravnanje s človeškimi ali živalskimi iztrebki ter ustrezen nadzor nad kvaliteto pitne vode sta pomembna dejavnika pri preprečevanju širjenja okužb z enteričnimi virusi ter virusom hepatitisa A in E.

ABSTRACT

KEY WORDS: enteric viruses, foodborne viruses, zoonoses, hepatitis A virus, hepatitis E virus

The enteric virus group is composed of heterogeneous members of various virus families, such as *Caliciviridae*, *Reoviridae*, *Astroviridae*, *Picornaviridae*. They however express some common characteristics. Enteric viruses are stable in the environment, enabling them to infect the host indirectly through contaminated food and water. Among food-borne viruses, hepatitis A and hepatitis E are also important. The most common source of food-borne infections is a contaminated water source. Zoonotic transmission has been proven for rotaviruses and the hepatitis E virus. Inappropriate handling of animal excreta or fertilizing with animal slurry raises the possibility of zoonotic viruses to be transmitted and infect human hosts. Controlled handling of human or animal excreta and monitoring the quality of drinking water are important factors for preventing enteric viruses, the hepatitis A virus and the hepatitis E virus infections.

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

² Doc. dr. Ivan Toplak, dr. vet. med., Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, 1000 Ljubljana

³ Asist. strok. svet. dr. Mateja Poljšak - Prijatelj, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

UVOD

Enterični virusi so široka skupina virusov z nekaterimi skupnimi lastnostmi, ki jim omogočajo uspešen prenos med gostitelji. Mednje prištevamo številne povzročitelje gastroenteritov (rotavirusi, kalicivirusi, astrovirusi, enterični adenovirusi idr.) kakor tudi viruse, ki se sicer razmnožujejo v črevesni sluznici, a se lahko razširijo po telesu in povzročijo bolezni v drugih organih (npr. številni enterovirusi). Okužba poteka fekalno-oralno, njihovo glavno mesto razmnoževanja je sluznica tankega črevesja. Virus se izloča v iztrebki v visokih koncentracijah, kar omogoča kontaminacijo okolja in povečano možnost okužb v njem (1). K hitremu prenosu dodatno pripomorejo še fizikalno-kemijske lastnosti virusov, predvsem njihova stabilnost v okolju, neobčutljivost na temperaturno nihanje in kislino okolje (nizka vrednost pH) (1, 2).

Številni enterični virusi se pojavljajo ne samo pri ljudeh, ampak tudi pri številnih živalskih vrstah. Največ podatkov o zoonotnem potencialu imamo predvsem za rotavirusne skupine A, ki kljub uspešnemu cepivu na tržišču še vedno veljajo za glavne povzročitelje gastroenteritov pri dojenčkih in majhnih otrocih. Z uvedbo novih, predvsem molekularnih tehnik se pojavnost enteričnih virusov pri živalih vedno pogosteje obravnava v raziskovalnih prispevkih mednarodnih revij (3).

V širšo skupino virusov, ki se prenašajo fekalno-oralno, s kontaminiranimi površinami, hrano in vodo, prištevamo tudi dva predstavnika virusnih povzročiteljev hepatitisov, in sicer virus hepatitisa A in virus hepatitisa E (4, 5). V prispevku bomo več pozornosti namenili predstavitvi virusa hepatitisa E, saj se pogosto pojavlja pri raznih živalskih vrstah, se prenaša na človeka s hrano in vodo, predvsem določeni genotipi v azijskih državah pa lahko povzročijo tudi večje epidemije (6). Preučevanje zoonotskega potenciala virusov je v današnjem času velikega pomena ne le zaradi poznavanja širjenja okužb in poskusa preprečevanja, ampak tudi zaradi ustrezne zaščite ljudi z uspešnim cepivom. Pri živalih lahko velikokrat najdemo številne virusne seve z drugačnimi molekularnimi značilnostmi od tistih, ki krožijo pri ljudeh. Vnos tovrst-

nih sevov med ljudi lahko po eni strani povzroči obširne epidemije, po drugi strani pa predstavlja veliko oviro uspešnim cepivom, saj le-ti lahko obidejo vzpostavljeno zaščito. Zoonotske prenose je zato pomembno spremljati, preučevati uspešnost pomnoževanja živalskih virusnih sevov pri ljudeh in iskati ustrezne odgovore na obstoječe spremembe.

Pogosto obolevnost z enteričnimi virusi strokovnjaki pojasnjujejo predvsem z virusno stabilnostjo in njihovo odpornostjo na različne fizikalno-kemijske vplive, kar omogoča njihovo obstojnost v okolju (1, 2). Glavna pot prenosa okužb sicer ostaja neposreden prenos med gostitelji, vendar pripisujejo vedno večji pomen posrednemu načinu prenosa, tj. z okuženimi površinami, hrano in vodo (1). Področje raziskav virusov v vodi in hrani se je pričelo razvijati šele v 60-ih letih prejšnjega stoletja. Domnevno je bila prva zabeležena virusna hidrična epidemija leta 1896 v Angliji povezana z virusom hepatitisa A, a seveda takrat brez jasne razlage. Z leti so ob vzpostavitvi epidemioloških raziskav, raziskovalnih mrež in z razvojem okoljske virologije pot prenosa nekaterih virusov s hrano in vodo postavili na prioriteto listo preučevanja. Tako so se znanstveniki že v 60-ih letih prejšnjega stoletja strinjali, da je pri okužbah s hepatitisom A zelo pomemben prenos s kontaminirano vodo (7). Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) ocenjuje, da bi v svetovnem merilu z do- stopom do neoprečne vode lahko preprečili 1,5 milijona smrtni otrok zgolj zaradi črevesnih okužb (8). Najpomembnejši patogen, ki v Združenih državah Amerike (ZDA) povzroča okužbe s hrano in vodo, je po ocenah Centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. *Centers for disease control and prevention*, CDC) prav norovirus, saj ga povezujejo z več kot 51 % vseh izbruhov, povzročenih z uživanjem kontaminirane hrane ali vode (9). Virus v hrani in vodi so torej vzrok velike smrtnosti, predvsem v državah v razvoju. V razvitem prede- lu sveta je smrtnost nizka, predstavljajo pa veliko ekonomsko breme v javnem zdravstvu. Zato je naloga okoljske virologije predvsem ugotavljanje vrst prenosov in virov kontaminacij ter predlaganje in spremljanje učinkovitih sanacij virov okužb (7).

V našem prispevku bomo predstavili pomembnejše predstavnike enteričnih viru-

sov in virusov hepatitisa A in E, ki se prenašajo z vodo in hrano, ter podali najnovejša spoznanja o njihovem zoonotskem rezervoarju. Raziskave na tem področju smo pred leti začeli tudi v Sloveniji. V povezavi z gospodarstvom, zdravstvenimi ustanovami in raziskovalnimi inštituti smo prispevali pomemben delež pri razvoju stroke na tem področju.

ENTERIČNI VIRUSI IN NJIHOV ZOOTSKI POTENCIAL

Rotavirusi

Rotavirusi skupine A so glavni povzročitelji drisk pri otrocih do petega leta starosti. Po ocenah SZO so letno rotavirusne driske vzrok za 453.000 smrti otrok po svetu (10).

Rotavirusi so brez ovojnice, 18,5 kilobaz (kb) velik genom iz 11 odsekov je obdan s troslojno beljakovinsko kapsido. Zunanji sloj je sestavljen iz beljakovin VP4 in VP7, ki določata serotip P in G in sta glavna nevtralizacijska antigena (11). Za lažjo in hitrejšo klasifikacijo rotavirusov se v zadnjih dvajsetih letih uporablja molekularna tipizacija genov za ti dve beljakovinski molekuli, s katero določamo genotipe G in P. Zaradi koordinirane in poenotene klasifikacije ter poimenovanja genotipov in rotavirusnih sevov smo leta 2008 ustanovili posebno delovno skupino za klasifikacijo rotavirusov (angl. *Rotavirus Classification Working Group*, RCWG), ki uvaja klasifikacijo na podlagi analize celotnega genoma in dodeljuje genotipe vsem 11 odsekom genoma. Na zunanji kapsidni beljakovini je do danes s strani RCWG priznanih in opisanih 27 genotipov G in 39 genotipov P (12). Pri ljudeh so najpogostejši genotipi: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] in G9P[8]. Velika variabilnost, predvsem genov za beljakovini zunanjega sloja kapside, sproža mnoga vprašanja, povezana predvsem z imunskim odgovorom in tipsko-specifično zaščito ter molekularnimi mehanizmi, ki prispevajo k variabilnosti teh virusov. Že v 90-ih letih prejšnjega stoletja so ugotavljali, da se rotavirusi pojavljajo v številnih G-P genotipskih kombinacijah in da najverjetneje k temu pripomore prerazporejanje genoma, saj je le-ta segmentiran in to omogoča (11). Slednje smo preučevali in potrdili tudi v obsežnejši raziskavi v Sloveniji, kjer smo dokazali zoonotski prenos rotavirusov na

ljude in s primerjalnimi analizami človeških in živalskih rotavirusnih sevov dokazali prerazporejanje genoma med njimi (13).

Danes je znano, da pri ljudeh najdemo številne rotavirusne genotipe, ki se pojavljajo pri mnogih živalskih vrstah (prašiči, goveda, ovce, mačke, psi, žirafe, antilope), vendar je njihova pojavnost pri ljudeh razmeroma nizka (3). Zoonotsko preneseni rotavirusi pri ljudeh, najverjetneje zaradi neprilagojenosti na novo okolje, niso sposobni tako uspešnega pomnoževanja kot pri živalskih vrstah, kjer se običajno pojavljajo. Zato običajno človek kljub okužbi ne izraža težje oblike bolezni (14). Le v redkih primerih dokažemo živalske rotavirusne seve pri otrocih s hudo obliko bolezni. Ob sočasni okužbi celice s človeškim in živalskim rotavirusnim sevom se lahko ob virusnem pomnoževanju njun genom prerazporedi in izvorno živalski rotavirusni sev z nekaterimi lastnostmi človeškega seva lahko pridobi ali poveča sposobnost pomnoževanja v človeških tkivih (11). Tovrstno pot vnosa novega živalskega rotavirusnega genotipa med ljudmi so že dokazali, npr. vnos in globalno širjenje genotipov G9, G12, G6 in G8. Genotipa G9 in G12 najverjetneje izvirata iz prašičev, od koder sta z medvrstnim prenosom prešla na ljudi in se približno 10 let od prve zaznave pri ljudeh razširila iz JV Azije na vse kontinente. Genotip G9 predstavlja celo peti najpogostejši rotavirusni genotip pri ljudeh na svetu (15). Genotipa G6 in G8 že dlje časa zaznavajo pri ljudeh. Kljub nekaterim prerazporeditvam v genomu se oba genotipa pojavljata le sporadično v manjših odstotkih primerov okužb. Vsaj za genotip G6 domnevajo, da je s prenosom z goveda ali drugih parkljarjev na človeka in z manjšimi molekularnimi spremembami postal delno prilagojen na razmnoževanje v človeških celicah, a ne dosega tako visoke uspešnosti pomnoževanja kot drugi pogosti rotavirusni genotipi, zato je širjenje tega virusa omejeno (16, 17). Nadaljnje spremljanje genotipov G6 in G8 pri ljudeh je pomembno predvsem z vidika uspešne zaščite z obstoječimi cepivi. Obe cepivi, tako Rotarix® (GlaxoSmithKline) kot RotaTeq® (Merck Sharp&Dohme) sta namreč dosegli nekoliko nižji nivo zaščite pred genotipom G2P[4], ki spada v genomski tip DS-1 podobno kot sevi genotipov G6 in G8 (12).

V Sloveniji smo med letoma 2006 in 2012 analizirali 2.359 vzorcev iztrebkov otrok s potrjenim rotavirusnim gastroenteritisom. Pri 95,21 % primerov smo določili običajne rotavirusne genotipe, ki se pogosto pojavljajo pri ljudeh, pri 0,17 % smo dokazali rotaviruse z neobičajno kombinacijo genotipov G-P, kar nakazuje na prerazporejanje genoma. Mešana okužbe smo dokazali pri 1,57 % primerov in pri 0,89 % rotavirusne seve živalskega izvora. Med sevi živalskega izvora smo najpogosteje dokazali genotipa G10P[14] in G6P[9], ki najverjetneje izvirata iz goveda. Zanimiva je bila pojavnost genotipa G10P[14], ki smo ga večinoma določili v poletnih mesecih leta 2007 na različnih območjih Slovenije. Na podlagi genomske analize sevov G10P[14] smo dokazali, da se G10P[14] v Sloveniji ni razširil z enkratnim prenosom z živali na človeka, ampak je verjetnejša teorija večkratnih posameznih medvrstnih prenosov (18). Živali, pri katerih smo dokazali rotaviruse, ostajajo rezervoar potencialno novih rotavirusnih genotipov, ki se prav zaradi molekularnih mehanizmov prerazporejanja lahko pojavljajo kot pogost povzročitelj drisk pri ljudeh.

Kalicivirusi

V družini *Caliciviridae* so za človeka najpomembnejši virusi v rodovih *Norovirus* in *Sapovirus*. Norovirusi so najpogostejši povzročitelji gastroenteritisa pri ljudeh ne glede na starostno skupino ter najpogostejši povzročitelji črevesnih okužb s hrano in vodo. Sapovirusi povzročajo predvsem sporadične primere okužb z drisko, čeprav so jih sicer redko dokazali tudi v izbruhih črevesnih okužb. Norovirusi in sapovirusi so majhni ikozaedrični virusi brez ovojnice, z genomom iz pozitivno usmerjene enovijačne molekule RNA, velike 7,3–8,3 kb (19).

Genetska variabilnost norovirusov je velika. Opisanih je pet genskih skupin norovirusov (GI–GV), znotraj katerih so glede na nukleotidno podobnost norovirusi razdeljeni še na številne genotipe. Pri ljudeh so doslej dokazali 20 genotipov znotraj GI, GII in GIV. Najpogosteje se pojavlja genotip GII.4, pri katerem se periodično, okvirno na dve leti, pojavljajo nove antigenske različice (20). Variabilnost norovirusov močno pripomore k povišanju števila okužb, saj je vzpostavljena imunost po

okužbi kratkotrajna, k dojemljivosti za novo okužbo pa doprinesejo nove porajajoče se različice istega genotipa. To pojasnjuje veliko število obolelih ob norovirusnih izbruhih. Z epidemiološkim spremljanjem norovirusnih okužb so ugotovili, da se pogosteje pojavljajo v zimskih mesecih. Glavna načina prenosa sta stik z obolelo osebo ter uživanje kontaminirane hrane in vode (21). Zaradi stabilnosti v okolju se lahko okužimo tudi s kontaminiranimi površinami ter z aerosoli, ki se ustvarjajo ob bruhanju okužene osebe (1).

Zoonotski potencial norovirusov še ni popolnoma raziskan. V literaturi je objavljenih veliko raziskav o norovirusih pri različnih živalskih vrstah, največ pri prašičih in govedu, dokazali pa so jih še pri mačkah, levih in psih. Čeprav je opisanih veliko primerov norovirusnih okužb pri živalih, pa do sedaj niso dokazali dovolj visoke podobnosti med človeškimi in živalskimi norovirusnimi sevi, ki bi nakazovala na nedavni neposredni prenos z živali na človeka. Kljub temu obstajajo določene podobnosti med njimi in s tem domneve o živalskem izvoru norovirusov, ki bi se lahko pojavljali pri blagih oblikah gastroenteritisa pri ljudeh (22). Omenjeno bi lahko dokazali ali ovrgli zgolj z obsežno raziskavo, ki bi vključevala ljudi z gastroenteritisom kakor tudi osebe brez bolezenskih znakov. Zanimivo bi bilo pregledati tudi osebe s poklicno izpostavljenostjo prašičem, govedu in drugim živalskim vrstam.

Pri sapovirusih je opisanih pet genskih skupin (GI–GV), ki se podobno kot norovirusi delijo še na genotipe. Pri ljudeh najdemo predvsem sapoviruse znotraj genskih skupin GI, GII, GIV in GV (23). Poleg človeka lahko sapovirusi okužijo in povzročajo bolezen predvsem pri prašičih, določili pa so jih tudi pri kunah. Prašičji sapovirusi se med seboj zelo razlikujejo, večina jih spada v gensko skupino GIII, v obsežni raziskavi po evropskih prašičjih farmah pa so dokazali predstavnike novih predlaganih genskih skupin GVI–GX (24). Pri tej in drugih raziskavah niso dokazali primerov, ki bi nakazovali na zoonotski prenos sapovirusov na človeka (22).

V Sloveniji smo v obdobju 2000–2009 spremljali sporadične primere in izbruhe norovirusnih in sapovirusnih okužb. Z molekularnimi analizami smo najpogosteje doka-

zali norovirus genske skupine II, genotip 4 (GII.4). Dokazali smo tudi norovirusne predstavnike genske skupine I, vendar v manjšem odstotku, ter nekatere redke rekombinantne tipe. Med sapovirusi je prav tako prevladoval genotip GII.4. Veliko bolj raznolika slika norovirusnih in sapovirusnih genotipov je bila pri prašičih in govedu. Medvrstnih prenosov med testiranimi virusi nismo dokazali (25).

Virus hepatitis E

Po ugotovitvah številnih avtorjev je virus hepatitis E (angl. *hepatitis E virus*, HEV) najpogostejši povzročitelj akutnega hepatitis E pri ljudeh. Ocenjujejo, da je na leto več kot 3,3 milijonov primerov simptomatskega hepatitis E, od tega samo v Indiji 2,2 milijona, in več kot 70.000 smrti. Prenaša se fekalno-oralno, s kontaktom z okuženimi osebami, živalmi ali z uživanjem kontaminirane hrane in vode (26, 27).

HEV je majhen ikozaedrični virus (27–34 nm), njegov genom je sestavljen iz enovijačne, pozitivno usmerjene molekule RNA. Zaradi podobne organizacije genoma in strukture virusa so ga sprva uvrščali v družino *Caliciviridae*, vendar so pozneje ugotovili, da je nukleotidno zaporedje obeh genomov precej različno. Danes HEV uvrščamo v družino *Hepeviridae*, rod *Hepevirus* (4).

Glede na podobnost nukleotidnega zaporedja genoma razvrščamo HEV v štiri genotipe (genotipi 1–4), ki se pojavljajo pri ljudeh in številnih živalskih vrstah (28). Genotipa 1 in 2 se pojavljata izključno pri ljudeh, geografsko sta omejena na Azijo, Afriko in Srednjo Ameriko ter povzročata epidemično pojavljanje hepatitis E. Epidemije so povezane z uživanjem kontaminirane vode v državah v razvoju. Največ tovrstnih okužb zaznajo prav v Indiji in na Kitajskem (27). Genotip 3 je razširjen povsod po svetu, genotip 4 pa so dokazali predvsem v jugovzhodni Aziji, šele pred kratkim tudi v Evropi (29). Genotipa 3 in 4 se pojavljata tako pri ljudeh kot pri domačih in divjih prašičih ter jelenih, dokazali pa so ga tudi pri podganah (30). Povzročata sporadične primere hepatitis E. Pri domačih in divjih prašičih poteka okužba večinoma asimptomatsko. Prisotnost virusa najpogosteje ugotavljajo pri mladih živalih. V številnih raziskavah so dokazali, da je akutna okužba

z izločanjem virusa najpogostejša pri prašičih v starostni skupini 2–3 mesece (28). Podobno smo ugotovili tudi v rejah na slovenskih farmah. Med letoma 2004 in 2008 smo v tej starostni skupini na šestih slovenskih farmah dokazali prisotnost virusa pri 10,6–28,6% prašičev (31). Dokazali smo tudi novo, še neopisano linijo znotraj genotipa 3. Po pregledu redkih primerov potrjenega hepatitis E pri ljudeh v Sloveniji te nove opisane linije nismo dokazali (31). V letih 2010 in 2011 je bilo v rejah na področju Štajerske in Pomurja pregledanih 99 vzorcev iztrebkov domačih prašičev, starih 2–4 mesece, ki so bili zbrani v 56 različnih rejah. Prisotnost RNA HEV smo z metodo obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (angl. *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, RT-PCR) v realnem času dokazali v 25,2% vzorcih, pozitivni vzorci pa so bili odvzeti v 20 različnih rejah.

Velik zoonotski potencial HEV je dokazan v številnih raziskavah. Posredni dokaz so razne serološke raziskave, v katerih so dokazali višjo seroprevalenco med ljudmi, poklicno izpostavljenim stikom z domačimi prašiči. Kot neposredni dokaz zoonotskega prenosa so opisani primeri visoke podobnosti ali celo identičnosti nukleotidnega zaporedja HEV, dokazani pri bolnikih in v kontaminirani hrani živalskega izvora, predvsem v jetrih okuženih prašičev (6). Polemike o pomenu dokazane virusne RNA v prašičjih jetrih iz trgovin z mesnimi izdelki so razjasnili z raziskavami ameriških znanstvenikov (32). Ti so dokazali, da se v jetrih z RNA virusa hepatitis E nahajajo infektivni virusi, sposobni okužbe po injiciranju v poskusne živali. Tudi v Evropi so že dokazali okužbe s HEV, ki izvirajo iz živali (domači prašiči, divji prašiči), predvsem z uživanjem mesnih izdelkov brez ali s pomanjkljivo predhodno termično obdelavo. V novejšem času se zavedamo vedno večjega pomena osveščanja ljudi o možnostih okužb s HEV, še posebej pri imunsko oslabljenih bolnikih, pri katerih se lahko razvije kronična okužba (33, 34).

V Sloveniji nimamo uradnih podatkov o številu okužb s HEV pri ljudeh. Na voljo je le podatek Laboratorija za molekularno mikrobiologijo, diagnostiko hepatitisov in aidsa na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Univerze v Ljubljani, kjer letno dokažejo do sedem primerov okužb (35).

Virus hepatitisa A

Virus hepatitisa A (angl. *hepatitis A virus*, HAV) je uvrščen v rod *Hepatitisvirus* družine *Picornaviridae*. Virus je ikozaedričen, brez ovojnice, velikosti 27 nm in ima genom iz enovijačne RNA, velikosti 7,5 kb. Prenaša se fekalno-oralno in je odporen proti številnim fizikalno-kemijskim vplivom iz okolja (36). Čeprav je serološko določen en serotip, ga po genetskih kriterijih delimo v šest genotipov (I-VI). Genotipe I-III so opisali pri ljudeh, genotipe IV-VI pa pri primatih (37). HAV ne uvrščamo med zoonotične viruse. Za okužbe s HAV je znano, da v 80–95 % potekajo asimptomatsko v otroštvu, v odrasli dobi pa se v 75–90 % razvije zlatenična oblika (36).

Poglavitna vira okužb s HAV sta kontaminirani voda in hrana. V državah v razvoju, kjer je hepatitis A endemičen, se človek okuži že v času otroštva in je večina odraslih že zaščitena (36). Težave se pojavijo pri potovanjih neprekuženih ali necepljenih oseb v endemska območja. Osnovna preventiva v omenjenih krajih je dobra higiena rok, pitje ustekleničene vode, pranje sadja in zelenjave z ustekleničeno vodo, izogibali naj bi se tudi uživanju školjk (1). Opisanih je namreč veliko primerov okužb s HAV zaradi termično neobdelanih kontaminiranih školjk. Največji izbruh okužb s HAV doslej so zabeležili na Kitajskem, ko se je v povezavi z uživanjem kontaminiranih školjk okužilo več kot 292.000 oseb (38). V endemskih območjih je kontaminirana voda glavni vir okužb z virusom hepatitisa A, predvsem v krajih brez urejene kanalizacije. V Sloveniji je v zadnjih letih incidenca okužb s HAV zelo nizka (0,5–1,0/100.000 prebivalcev), prav tako nismo zaznali izbruhov okužb (35).

Manj pogosti enterični virusi

Med enteričnimi virusi, ki se pojavljajo pri ljudeh in živalih, je pomembno omeniti še astroviruse, majhne ikozaedrične viruse brez ovojnice z enovijačnim genomom RNA. V zadnjem času so jih dokazali pri številnih živalskih vrstah. Nekateri izsledki genomskih raziskav nakazujejo celo možnost medvrstnih prenosov in porajanje novih živalsko-človeških rekombinantnih astrovirusnih sevov. Zaradi širokega kroga živalskih vrst kot gostiteljev, obstojnosti v okolju ter njihovega pojavlja-

nja pri ljudeh in v okoljskih vzorcih je teoretična možnost medvrstnih prenosov močno podkrepljena. Trdnega dokaza o tem do danes znanstvenikom še ni uspeli pridobiti (39).

Kot mogoč zoonotski patogen se omenja tudi pikobirnavirus, ikozaedrični virus brez ovojnice, velikosti 35–40 nm, z genomom iz dveh molekul dvovijačne RNA. Prvič so ga opisali v poznih 80-ih letih prejšnjega stoletja pri otrocih z drisko. V poznejših raziskavah povezava z gastroenteritisom ni bila nedvomno potrjena, so pa dokazali pojavljanje tega virusa tudi pri prašičih. Podobnost prašičjih in človeških pikobirnavirusov so že nakazali v raziskavi pikobirnavirusov pri otrocih z drisko v Kalkuti v Indiji (40).

VODNI VIRI IN OKUŽBE Z VODO IN HRANO

Obstojnost virusov v okolju omogoča njihovo kroženje v naravi – od gostitelja, z izločki v okolje ter tako do novega gostitelja. Pomemben člen v verigi prenosov enteričnih virusov je voda, ki se kontaminira z izločki ljudi in živali. Zaradi tega se poudarja preudarno ravnanje s fekalnimi odpadki, njihovo primerno zbiranje in prečiščevanje v čistilnih napravah (41). Neustrezno zbiranje, poškodovani ali neustrezni kanalizacijski sistemi in spiranje fekalnih odpadkov so poglavitni viri kontaminacije površinskih in podtalnih vodnih virov (42). Fekalne odplake tako človeškega kot živalskega izvora je treba ustrezno prečistiti in šele po tem izpustiti v okolje z iztoki v reke. Težave predstavlja predvsem nadzor učinkovitosti delovanja čistilnih naprav, saj se enterični virusi iz fekalnih odplak ne odstranijo v tolikšni meri, kot bi pričakovali ali želeli oz. nad tem trenutno tudi nimamo nadzora. V nekaterih raziskavah je bilo ugotovljeno, da je nivo zmanjšanja koncentracije enteričnih virusov po postopku čiščenja v biološki čistilni napravi le do 10^3 virusnih delcev/ml in da so v iztokih čistilnih naprav še vedno infektivni virusi v koncentraciji do 1.000 virusov/ml iztoka (43–45). Prečiščeni izpusti odplak iz čistilnih naprav v vodotoke, ki bi se uporabljali v verigi pridelave hrane ali celo kot vir pitne vode, predstavljajo tveganje za okužbe (3).

Različni vodni viri predstavljajo večje ali manjše tveganje za okužbe z virusi. Najmanj

Tabela 1. Nekateri enterični virusi v vodnih virih v Sloveniji (31, 46). RVA - rotavirusi skupine A, NoV-I, NoV-II – norovirusi genskih skupin I in II, HA5V – človeški astrovirusi (angl. human astroviruses), HEV – virus hepatitisa E (angl. hepatitis E virus), Nt – ni testiran.

		SKUPAJ	Število (%) pozitivnih					Skupaj pozitivni
			RVA	NoV-I	NoV-II	HA5V	HEV	
Vzorci površinskih vod	Reke	57 (90,5)	10 (17,5)	19 (33,3)	22 (38,6)	13 (22,8)	3 (5,3)	32 (56,1)
	Potoki	6 (9,5)	1 (16,7)	2 (33,3)	4 (66,7)	4 (66,7)	0	6 (100)
	SKUPAJ	63 (100)	11 (17,5)	21 (33,3)	26 (41,3)	17 (27,0)	3 (4,8)	38 (60,3)
Vzorci pitnih vod	Individualna vodna zajetja (podtalnice)	72 (80,9)	27 (37,5)	2 (2,8)	0	1 (1,4)	Nt	30 (41,7)
	Večji vodovodi	17 (19,1)	0	0	0	1 (5,9)	Nt	1 (5,9)
	SKUPAJ	89 (100)	27 (30,3)	2 (2,2)	0	2 (2,2)	Nt	31 (34,8)
SKUPAJ		152 (100)	38 (25,0)	23 (15,1)	26 (17,1)	19 (12,5)	3 (4,8 ^a)	69 (45,4)

^a odstotek, izračunan glede na število vzorcev površinskih vod (3/63)

tveganja predstavljajo veliki vodovodni sistemi, kjer se voda pred izpustom v vodovodni sistem dodatno prečisti in obdela. Več tveganja predstavljajo manjši vodovodni sistemi, kjer sanitarna kontrola ni tako pogosta. Največjemu tveganju za okužbo so izpostavljeni ljudje z lastnimi vodnimi viri, največkrat podtalnice, ki ni kontrolirana in se pred uporabo dodatno ne obdela.

V Sloveniji smo v letih 2008–2009 testirali številna vodovodna zajetja na nekatere enterične viruse, od srednje velikih vodovodnih sistemov do individualnih vodnih zajetij ter površinskih vod, rek in potokov. V individualnih vodnih zajetjih, ki so predstavljala podtalno vodo, smo enterične viruse dokazali pri 41,7% vzorcev, v večjih vodovodnih zajetjih pri 5,9%, v površinskih vodnih vzorcih pa smo viruse dokazali pri 60,3% (tabela 1) (46). Neobdelane površinske vode se seveda ne uporabljajo za pitje, lahko pa enterične viruse v prehransko verigo prenesemo z zalivanjem ali drugimi oblikami stika živil s tako vodo. Primeri, ko površinske vode lahko predstavljajo vir okužb, so tudi rekreativne aktivnosti v onesnaženih rekah in jezerih (47). S fekalijami kontaminirane reke s svojimi iztoki vnašajo enterične viruse tudi v morski ekosistem, zaradi česar so tu problematična predvsem školjčišča. Kontaminirane školjke so bile že velikokrat vir okužb z različnimi enteričnimi virusi, največkrat norovirusi, zabeležili

pa so tudi okužbe s hepatitisom A in hepatitisom E. Uživanje termično neobdelanih ali pomanjkljivo obdelanih kontaminiranih školjk je povzročilo velike izbruhe gastroenteritisov ali hepatitisov mednarodnih razsežnosti, tudi zaradi izvoza (1).

ZAKLJUČEK

Po pregledu dosedanjih raziskav na področju enteričnih virusov lahko zaključimo, da je pomen teh okužb velikokrat podcenjen. Številnih okužb ne zaznamo zaradi blagih kliničnih znakov, ki ne potrebujejo zdravniške obravnave ali celo hospitalizacije. Vsekakor povzročajo okužbe z enteričnimi virusi velike stroške v zdravstvu, posredno pa tudi stroške, povezane z izostanki od dela in podobno. Večje težave lahko povzročijo izbruhi okužb, povezani s hrano in vodo. Tovrstne okužbe je zaradi velikega števila obolelih oseb potrebno preprečevati z ustreznimi sanitarnimi ukrepi. Enterični virusi, ki se uspešno prenašajo z živali na človeka, predstavljajo dodaten izziv predvsem za razvoj in/ali ohranjanje uspešnega cepiva. Variabilnost virusov se namreč z medvrstnimi prenosi pri določenem gostitelju lahko močno poveča. Poglobljena dejavnika pri preprečevanju prenosov živalskih enteričnih virusov na ljudi sta preudarno ravnanje z živalskimi iztrebki in skrb za čisto pitno vodo.

LITERATURA

1. Koopmans M, Duizer E. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol.* 2004; 90 (1): 23–41.
2. Xavier Abad F, Pintó RM, Bosch A. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60 (10): 3704–10.
3. Cook N, Bridger J, Kendall K, et al. The zoonotic potential of rotavirus. *J Infect.* 2004; 48 (4): 289–302.
4. Aggarwal R, Jameel S. Hepatitis E. *Hepatology.* 2011; 54 (6): 2218–26.
5. Sánchez G, Bosch A, Pintó RM. Hepatitis A virus detection in food: current and future prospects. *Lett Appl Microbiol.* 2007; 45 (1): 1–5.
6. Meng XJ. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol.* 2010; 140 (3–4): 256–65.
7. Cliver DO. Early days of food and environmental virology. *Food Environ Virol.* 2010; 2 (1): 1–23.
8. WHO and UNICEF: Progress on Drinking Water and Sanitation – Special Focus on Sanitation [internet]. Geneva: World Health Organization; 2012 [citirano 2012 Jun 27]. Dosegljivo na: http://www.who.int/water_sanitation_health/monitoring/jmp2008/en/index.html
9. CDC: Surveillance for norovirus outbreaks [internet]. Atlanta: Center for Disease Control and Prevention; 2012 [citirano 2012 Jun 27]. Dosegljivo na: <http://www.cdc.gov/features/dsNorovirus/>
10. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, et al. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2012; 12 (2): 136–41.
11. Estes MK, Kapikian AZ. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1917–74.
12. Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol.* 2011; 156 (8): 1397–413.
13. Steyer A, Poljšak - Prijatelj M, Barlič - Maganja D, et al. Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. *J Gen Virol.* 2008; 89 (Pt 7): 1690–8.
14. Martella V, Bányai K, Matthijnssens J, et al. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol.* 2010; 140 (3–4): 246–55.
15. Matthijnssens J, Heylen E, Zeller M, et al. Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol Biol Evol.* 2010; 27 (10): 2431–6.
16. Matthijnssens J, Potgieter CA, Ciarlet M, et al. Are Human P[14] rotavirus strains the result of interspecies transmission from sheep or other ungulates that belong to the mammalian order *Artiodactyla*? *J Virol.* 2009; 83 (7): 2917–29.
17. Bányai K, Bogdán Á, Domonkos G, et al. Genetic diversity and zoonotic potential of human rotavirus strains, 2003–2006, Hungary. *J Med Virol.* 2009; 81 (2): 362–70.
18. Steyer A, Bajželj M, Iturriza-Gómara M, et al. Molecular analysis of human group A rotavirus G10P[14] genotype in Slovenia. *J Clin Virol.* 2010; 49 (2): 121–5.
19. Green KY. Caliciviridae: The noroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 948–79.
20. Zheng D-P, Ando T, Fankhauser RL, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology.* 2006; 346 (2): 312–23.
21. Koopmans M. Progress in understanding norovirus epidemiology. *Curr Opin Infect Dis.* 2008; 21 (5): 544–52.
22. Bank-Wolf BR, König M, Thiel HJ. Zoonotic Aspects of infections with noroviruses and sapoviruses. *Vet Microbiol.* 2010; 140 (3–4): 204–12.
23. Oka T, Mori K, Iritani N, et al. Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. *Arch Virol.* 2012; 157 (2): 349–52.
24. Reuter G, Zimšek Mijovski J, Poljšak - Prijatelj M, et al. Incidence, diversity, and molecular epidemiology of sapoviruses in swine across Europe. *J Clin Microbiol.* 2010; 48 (2): 363–8.
25. Zimšek Mijovski J, Poljšak - Prijatelj M, Steyer A, et al. Detection and molecular characterisation of noroviruses and sapoviruses in asymptomatic swine and cattle in Slovenian farms. *Infect Genet Evol.* 2010; 10 (3): 413–20.
26. Rein DB, Stevens GA, Theaker J, et al. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology.* 2012; 55 (4): 988–97.
27. Khuroo MS. Discovery of hepatitis E: The epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. *Virus Res.* 2011; 161 (1): 3–14.
28. Meng XJ. Recent advances in hepatitis E virus. *J Viral Hepat.* 2010; 17 (3): 153–61.
29. Tessé S, Lioure B, Fornecker L, et al. Circulation of genotype 4 hepatitis E virus in Europe: First autochthonous hepatitis E infection in France. *J Clin Virol.* 2012; 54 (2): 197–200.
30. Johne R, Heckel G, Plenge-Bönig A, et al. Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16 (9): 1452–5.
31. Steyer A, Naglič T, Močilnik T, et al. Hepatitis E virus in domestic pigs and surface waters in Slovenia: Prevalence and molecular characterization of a novel genotype 3 lineage. *Infect Genet Evol.* 2011; 11 (7): 1732–7.
32. Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, et al. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J Gen Virol.* 2007; 88 (Pt 3): 912–7.

33. Colson P, Borentain P, Queyriaux B, et al. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis.* 2010; 202 (6): 825-34.
34. Wedemeyer H, Pischke S, Manns MP. Pathogenesis and treatment of hepatitis E virus infection. *Gastroenterology.* 2012; 142 (6): 1388-97.
35. Seme K, Kovanda A, Poljak M. Virusi hepatitis. In: Poljak M, Petrovec M, eds. *Medicinska virologija*. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011. p. 75-109.
36. Martin A, Lemon SM. Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. *Hepatology.* 2006; 43 (2 Suppl 1): S164-72.
37. Cristina J, Costa-Mattioli M. Genetic variability and molecular evolution of hepatitis A virus. *Virus Res.* 2007; 127 (2): 151-7.
38. Halliday ML, Kang LY, Zhou TK, et al. An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. *J Infect Dis.* 1991; 164 (5): 852-9.
39. De Benedictis P, Schultz-Cherry S, Burnham A. Astrovirus infections in humans and animals – molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infect Genet Evol.* 2011; 11 (7): 1529-44.
40. Genesh B, Bányai K, Martella V, et al. Picobirnavirus infections: viral persistence and zoonotic potential. *Rev Med Virol.* V tisku 2012.
41. Okoh AI, Sibanda T, Gusha SS. Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment. *Int J Environ Res Public Health.* 2010; 7 (6): 2620-37.
42. Rodríguez-Lázaro D, Cook N, Ruggeri FM, et al. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiol Rev.* 2012; 36 (4): 786-814.
43. van den Berg H, Lodder W, van der Poel W, et al. Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Res Microbiol.* 2005; 156 (4): 532-40.
44. El-Senousy WM, Guix S, Abid I, et al. Removal of astrovirus from water and sewage treatment plants, evaluated by a competitive reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73 (1): 164-7.
45. Victoria M, Guimarães FR, Fumian TM, et al. One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *J Water Health.* 2010; 8 (1): 158-65.
46. Steyer A, Godič Torkar K, Gutiérrez-Aguirre I, et al. High prevalence of enteric viruses in untreated individual drinking water sources and surface water in Slovenia. *Int J Hyg Environ Health.* 2011; 214 (5): 392-8.
47. Sinclair RG, Jones EL, Gerba CP. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *J Appl Microbiol.* 2009; 107 (6): 1769-80.

Stanka Lotrič - Furlan¹, Petra Bogovič²

Klinična obravnava bolnikov z vročinsko boleznijo po vbodu klopa v Sloveniji

Clinical Treatment of Patients with Febrile Illness after Tick Bite in Slovenia

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: vročinska bolezen, klop, obravnava, Slovenija

Klopi prenašajo bolezni, ki jih povzročajo virusi, bakterije in praživali. Slovenija predstavlja endemsko območje za klopni meningoencefalitis, ki ga povzroča virus klopnega meningoencefalitisa, lymsko boreliozo, ki jo povzroča bakterija *Borrelia burgdorferi* sensu lato, in humano granulocitno anaplazmozo, ki jo povzroča bakterija *Anaplasma phagocytophilum*. Glavni prenašalci povzročiteljev vseh treh bolezni pri nas so ščitasti klopi vrste *Ixodes ricinus*. Pri klinični obravnavi bolnika z vročinsko boleznijo po vbodu klopa je treba opraviti preiskave, s katerimi dokažemo okužbo z virusom klopnega meningoencefalitisa in/ali bakterijo *A. phagocytophilum*. V Sloveniji namreč lymška boreliozna zelo redko poteka kot akutna vročinska bolezen, medtem ko se tularemija in vročica Q na splošno pojavljata zelo redko.

ABSTRACT

KEY WORDS: febrile illness, tick, treatment, Slovenia

Ticks are known to transmit diseases that are caused by viruses, bacteria and protozoa. Slovenia presents an endemic region for tick-borne encephalitis, lyme borreliosis and human granulocytic anaplasmosis. The hard ticks, *Ixodes ricinus*, are the principal vector for the aetiological agents, such as tick-borne encephalitis virus, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum*. In clinical treatment of patients with a febrile illness after a tick bite, tests need to be carried out to prove the infection with tick-borne encephalitis virus and/or bacteria *A. phagocytophilum*. This is because in Slovenia, lyme borreliosis only seldom takes the course of a febrile illness, while tularemia and Q fever are very rare.

¹ Prof. dr. Stanka Lotrič - Furlan, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana; stanka.lotric-furlan@mf.uni-lj.si

² Mag. Petra Bogovič, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana

UVOD

Bolezni, katerih povzročitelje na ljudi prenašajo klopi, predstavljajo pri nas in tudi drugod po svetu pomemben vzrok obolevnosti odraslih in otrok. V zmernem podnebnem pasu se pojavljajo sezonsko; pri nas večinoma v obdobju od maja do oktobra, kar je povezano z biološko aktivnostjo klopov. Ogrožene so predvsem osebe, ki se poklicno ali rekreativno pogosto zadržujejo v naravi. Klopi so prenašalci boleznih, ki jih povzročajo virusi, bakterije in praživali (tabela 1).

EPIDEMIOLOGIJA

Slovenija je že skoraj 60 let poznana kot del velikega srednjeevropskega endemičnega področja za klopni meningoencefalitis (KME). Endemično področje je bilo do pred desetimi leti zemljepisno omejeno in se ni bistveno spreminjalo, v zadnjih letih pa se širi (1). Slovenija, poleg Litve, Latvije in Estonije, spada med evropske države z najvišjo obolev-

nostjo (2). V zadnjih petih letih je bila povprečna incidenca 14,1 na 100.000 prebivalcev, s precejšnjimi razlikami med posameznimi predeli. Obolevnost je najvišja v kranjski regiji in na Koroškem, kjer sta bili incidenčni stopnji leta 2009 38,0 oz. 26,1 na 100.000 prebivalcev (3). Incidenca lymške boreliozе pri nas je 200–300 primerov na 100.000 prebivalcev letno in ima tendenco naraščanja (4). Ker se simptomi in znaki boleznih lahko pojavijo tudi več mesecev po okužbi, se primeri pojavljajo tudi izven sezone aktivnosti klopov. Vrh primerov pa je tako kot pri KME v poletnih mesecih. V Evropi je bilo do sedaj opisanih nekaj več kot sto bolnikov s humano granulocitno anaplazmozo, ki jo povzroča *Anaplasma phagocytophilum*, največ v Sloveniji (več kot 70 primerov) in na Švedskem (5, 6).

Glavni prenašalci povzročiteljev vseh treh boleznih pri nas so ščitasti klopi vrste *Ixodes ricinus*. Virus KME in borelije se v klopih prenašajo transstadialno (preko razvojnih oblik klopa) in transovarialno (samica klopa izloča okužena jajčeca), medtem ko se *A. pha-*

Tabela 1. Bolezni, ki jih na ljudi prenašajo klopi, njihovi povzročitelji in geografska razširjenost. TIBOLA – klopna limfadenopatija (angl. tick-borne lymphadenopathy), ZDA – Združene države Amerike.

Bolezen	Povzročitelj	Geografska razširjenost
klopni meningoencefalitis ^a	<i>Flaviviridae/Flavivirus</i>	srednja in južna Evropa, Skandinavija, Rusija
lymska borelioz ^a	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	ZDA, Evropa, nekdanja Sovjetska zveza, Azija
humana granulocitna anaplazmoza ^a	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	ZDA (Wisconsin, Minnesota), Evropa, Slovenija
humana monocitna erlihioza	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	jugovzhodni in centralni del ZDA
tularemija ^a	<i>Francisella tularensis</i>	severna polobla (med 30. in 71. vzporednikom)
vročica Q ^a	<i>Coxiella burnetii</i>	ves svet
babezioza ^b	<i>Babesia</i> spp. (<i>B. microti</i> , <i>B. divergens</i> , <i>B. bovis</i> , WAI)	ZDA, Evropa
sredozemska mrzlica ^b	<i>Rickettsia conorii</i>	mediteransko področje, Hrvaška, Bližnji in Srednji vzhod, Afrika, Indija
afriška klopna mrzlica	<i>Rickettsia africae</i>	podсахarska Afrika
mrzlica Skalnega pogorja	<i>Rickettsia rickettsii</i>	ZDA (osrednji in južni del), Mehika
klopna limfadenopatija (TIBOLA)	<i>Rickettsia slovaca</i>	Evropa, Azija
izraelska klopna mrzlica	<i>Rickettsia conorii</i> Israeli	Izrael
japonska klopna mrzlica	<i>Rickettsia japonica</i>	Japonska
severnoazijska klopna mrzlica	<i>Rickettsia sibirica</i>	Sibirija, osrednja Azija, Mongolija, Pakistan
queenslandska mrzlica	<i>Rickettsia australis</i>	Avstralija
povratna mrzlica ^b	<i>Borrelia</i> (<i>B. duttoni</i> , <i>B. hermsii</i> , <i>B. turicatae</i>)	sredozemske države, Srednja in Južna Amerika, Afrika

^a boleznih, ki so v Sloveniji zanesljivo prisotne

^b boleznih, ki so v Sloveniji morebiti prisotne

gocytophilum prenaša samo transstadialno. Ocenjujejo, da je v Evropi z virusom KME okuženih 0,1–5 % klopov, odvisno od geografske lokacije in letnega časa (7). Pri nas je po podatkih raziskave, opravljene leta 2006, z virusom KME okuženih 0,6 % klopov (8). V nekaterih predelih Slovenije je z borelijami okuženih več kot 50 % klopov, z *A. phagocytophilum* pa približno 9 % klopov (9, 10).

Tularemija je v Sloveniji redka bolezen. V zadnjem 10-letnem obdobju je bilo pri nas prijavljenih le 11 primerov bolezni. O zmanjšanju pojavljanja tularemije poročajo tudi iz drugih predelov Evrope. Pogostejša je v skandinavskih državah (4).

Vročica Q je zoonoza, razširjena po vsem svetu. Obolevajo domače in divje živali, zlasti drobnica, tudi govedo, pri katerih okužba lahko poteka brez simptomov. Povzročitelj vročice Q (*Coxiella burnetii*) se prenaša z okužene živali z neposrednim stikom, posredno pa z vdihavanjem aerosola, ki vsebuje bakterije, zelo redko preko klopov. Število prijavljenih primerov je v Sloveniji zelo majhno, letno zaznamo 2–5 primerov. Vročica Q se pojavlja tudi v obliki epidemij, zadnja pri nas je bila spomladi 2007 (11).

RAZISKAVE O VZROKIH VROČINSKIH BOLEZNI, KI JIH PRENAŠAJO KLOPI V SLOVENIJI

V Sloveniji so bile opravljene tri raziskave o vzrokih vročinske bolezni po vbodu klopa, dve pri skupini odraslih bolnikov in ena pri otrocih (12–14). V prospektivni raziskavi, ki je potekala med odraslimi bolniki na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja v Ljubljani v letih 1995 in 1996, so poleg okužbe z virusom KME (27,7 %) in bakterijo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (20 %) kot vzrok vročinske bolezni po vbodu klopa dokazali tudi prvi primer okužbe z bakterijo *Anaplasma phagocytophilum* v Evropi. Kar polovica vročinskih bolezni po vbodu klopa je v omenjeni raziskavi ostala vzročno nepojasnenih (12). V podobni raziskavi, ki je potekala pri otrocih, je vzrok vročinske bolezni ostal neopredeljen v 47 % primerov (14). Poleg okužbe z virusom KME, bakterijama *B. burgdorferi* sensu lato in *A. phagocytophilum* so pri obeh raziskavah iskali tudi prisotnost proti-

teles proti bakteriji *Rickettsia conorii* in parazitu *Babesia microti*, pri otrocih pa tudi prisotnost protiteles proti bakteriji *Francisella tularensis*. V raziskavi o okužbah z babezijami pri ljudeh z ohranjeno imunostjo v Sloveniji so bile opravljene še dodatne preiskave za dokaz prisotnosti babezij (dokaz protiteles proti *B. divergens*, dokaz dednega materiala z verižno reakcijo s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) *B. microti* in *B. divergens* ter pregled razmaza krvi). Pri nobenem od njih akutna okužba ni bila potrjena z metodo PCR ali s pozitivnim razmazom krvi, obarvanim po Giemsi (13).

KLINIČNA SLIKA, LABORATORIJSKE ZNAČILNOSTI, DIAGNOSTIČNE PREISKAVE IN ZDRAVLJENJE VROČINSKIH BOLEZNI, KI JIH PRENAŠAJO KLOPI V SLOVENIJI

Značilnosti klinične slike in laboratorijskih preiskav, diagnostične preiskave ter zdravljenje vročinskih bolezni, ki jih prenašajo klopi in so v našem okolju zanesljivo prisotne, prikazuje tabela 2. V Sloveniji lymfska boreliozna zelo redko poteka kot akutna vročinska bolezen, zato je v tem prispevku ne bova obravnavali (15).

Obravnava kliničnega primera

Petinpetdesetletni gospod iz okolice Škofje Loke, ki se zdravi zaradi arterijske hipertenzije, je v začetku meseca maja leta 2009 obiskal izbranega zdravnika zaradi nekaj dni trajajoče povišane telesne temperature nad 39 °C, bolečin v žrelu, bruhanja in driske. V okolici ni imel nihče podobnih težav. Bolnik je navajal več vbodov klopov, zadnjega pred enim tednom. Cepljen proti virusu KME ni bil. Zdravnik mu je predpisal antiemetik in aktivno oglje. Težave so izzvenele, vendar so se čez par dni ponovile. Izbrani zdravnik je bolnika napolil na pregled k specialistu.

V urgentni ambulanti Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana je bil bolnik pregledan zaradi štiri dni trajajoče povišane telesne temperature do 40 °C z mrzlico, močnega glavobola, slabosti, bruhanja, fotofobije

Tabela 2. Prikaz značilnosti klinične slike in laboratorijskih preiskav, diagnostičnih preiskav in zdravljenja vročinskih bolezní, ki jih prenašajo klopi in ki so zanesljivo prisotne v Sloveniji. ELISA – encimski imunski test (angl. enzyme linked immunosorbent assay), PCR – verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction), IFT – test posredne imunofluorescence (angl. immunofluorescence test), CRP – C-reaktivni protein, SR – hitrost sedimentacije eritrocitov (angl. sedimentation rate).

Bolezen	Klinični potek okužbe / oblika bolezni	Laboratorijske preiskave	Diagnoza	Zdravljenje
klopi meningoencefalitis (zahodnoevropski podtip virusa)	asimptomatska okužba (pogosto), meningitis (50%), meningoencefalitis (40%), meningoencefalomielitis (10%), abortivna oblika (redko), postencefalitični sindrom (do 60%) smrtnost 0,5–2%	neznačilne, prva faza bolezni: pogosto levkopenija in/ali trombocitopenija, lahko povečane vrednosti jetrnih encimov, druga faza bolezni: lahko blaga levkocitoza, limfocitna pleocitoza	serološke preiskave – ELISA (kri, izjemoma likvor) osamitev virusa, PCR (le za raziskovalne namene)	simptomatsko
humana granulocitna anaplazmoza	asimptomatska okužba (pogosto), vročinska bolezen z glavobolom, utrujenostjo, bolečinami v mišicah in sklepih, redko izpuščaji smrtnost < 1%	neznačilne, pospešena SR, levkopenija in/ali trombocitopenija, limfopenija, anemija, povišane vrednosti jetrnih encimov in CRP	osamitev iz krvi, razmaz krvi, barvanem po Wrightu ali Giemsi (morule), serološko (IFT), PCR	doksiciklin, rifampicin
tularemija	vročinska bolezen z glavobolom, utrujenostjo, bolečinami v mišicah, žrelu, trebuhu, urogenitalnega, glandularna, okuloglandularna, tifusna, pljučna in črevesna smrtnost 1–3%	neznačilne, lahko pospešena SR, levkocitoza, povišane vrednosti jetrnih encimov	serološke preiskave – test hemaglutinacije, ELISA, osamitev iz različnih kliničnih vzorcev	streptomycin, gentamicin
vročica Q	vročinska bolezen z izpuščajem ali brez, pljučnica, hepatitis, meningitis, encefalitis, možni so zapleti, kronična oblika (najpogostejše kot endokarditis), smrtnost pri kronični obliki 23%	normalna ali pospešena SR, povišane vrednosti jetrnih encimov	osamitev iz krvi (redko), serološko (IFT, ELISA)	doksiciklin

ter bolečin v mišicah in sklepah. Ob pregledu je imel povišano telesno temperaturo (38,4 °C) in pozitivne meningealne znake. Opazen je bil tremor rok in jezika, drugih posebnosti niso ugotovili. Rutinske laboratorijske preiskave so pokazale levkopenijo ($2,1 \times 10^9/l$; normalno $4-10 \times 10^9/l$), trombocitopenijo ($34 \times 10^9/l$; normalno $140-340 \times 10^9/l$), povišano koncentracijo C-reaktivnega proteina (97 mg/l; normalno <5 mg/l) in prokalcitonina (1,56 µg/l; normalno $<0,5$ µg/l) ter povečane vrednosti serumske aspartat aminotransferaze (AST) (0,93 µkat/l; normalno $<0,58$ µkat/l) in alanin aminotransferaze (ALT) (1,05 µkat/l; normalno $<0,74$ µkat/l). Opravili so lumbalno punkcijo. Laboratorijski pregled likvorja je pokazal limfocitno pleocitozo (428 celic/mm³; normalno <5 celic/mm³) od tega večina limfocitov (378 celic/mm³), ostalo monociti (50 celic/mm³), normalen nivo glukoze in proteinov. Bolnik je bil sprejet na zdravljenje v bolnišnico.

Ob sprejemu so opravili mikrobiološke preiskave za ugotovitev okužbe z virusom KME, bakterijami *B. burgdorferi* sensu lato in *A. phagocytophilum*. Z encimskim imunskim testom (angl. *enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA) so v serumu ugotovili pozitivna specifična protitelesa razreda IgM proti virusu KME (2,007; negativno: $<0,247$; pozitivno: $>0,347$), medtem ko specifičnih protiteles razreda IgG niso dokazali. V serumu in likvorju prav tako niso dokazali specifičnih protiteles razreda IgM in IgG proti borelijam. Tudi poskus izolacije borelij iz likvorja je bil negativen. Z barvanjem vzorca periferne krvi po Giemsi niso našli morul (skupki erlihij) v nevtrofilnih granulocitih. V vzorcu polne krvi so z metodo PCR dokazali DNA bakterije *A. phagocytophilum*. V vzorcu seruma z metodo posredne imunofluorescence (angl. *indirect immunofluorescence assay*, IFA) niso dokazali specifičnih protiteles proti bakteriji *Ehrlichia chaffeensis* (IgM negativno, IgG negativno; mejni titer IgM 1 : 20, mejni titer IgG 1 : 64), so pa ugotovili mejno vrednost specifičnih protiteles razreda IgG proti bakteriji *A. phagocytophilum* (IgG 1 : 32; mejni titer 1 : 32).

Zaradi suma na akutno humano granulocitno anaplazmozo (zvišana koncentracija C-reaktivnega proteina in prokalcitonina, pozitiven PCR) so bolnika sedem dni zdravi-

li z doksiciklinom, v odmerku 100 mg 2-krat dnevno. Bolnik je bil v bolnišnici devet dni, povišana telesna temperatura in tremor sta izzvenela šesti dan bolnišničnega zdravljenja. Ob odpustu je bolnik imel še trombocitopenijo ($100 \times 10^9/l$), ostali laboratorijski izvidi so bili normalni.

Ob kontrolnem pregledu, dva tedna po odpustu, so ponovili serološke preiskave za dokaz specifičnih protiteles proti virusu KME in proti bakteriji *A. phagocytophilum*, ki so pokazale serokonverzijo protiteles razreda IgG proti virusu KME (IgG 18,8 U/ml, mejna vrednost: 5,0 U/ml) in serokonverzijo protiteles razreda IgG proti bakteriji *A. phagocytophilum* (IgG 1: 512). Na osnovi mikrobioloških preiskav so pri bolniku potrdili sočasno akutno okužbo z virusom KME in bakterijo *A. phagocytophilum*.

RAZLAGA

Na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja v Ljubljani pri vseh bolnikih s seroznim meningitisom rutinsko ugotavljamo specifična protitelesa razreda IgM in IgG proti virusu KME in proti bakteriji *B. burgdorferi* sensu lato. Pri bolnikih s seroznim meningitisom potrdimo diagnozo KME z dokazom specifičnih protiteles razreda IgM in IgG v serumu z metodo ELISA (16). Pri bolniku z vročinsko boleznijo (običajno po vbodu klopa) dokažemo akutno okužbo z bakterijo *A. phagocytophilum* s serokonverzijo ali štirikratnim porastom titra specifičnih protiteles IgG in/ali pozitivnim testom PCR v vzorcu polne krvi ali z osamitvijo bakterije *A. phagocytophilum* iz krvi (17).

V Sloveniji je pomembno, da ločimo prvo fazo KME od humane granulocitne anaplazmoze, saj je to bakterijska bolezen, bolnike je treba zdraviti z antibiotikom. Bolniki s humano granulocitno anaplazmozo imajo v primerjavi z bolniki, ki prebolevajo prvo fazo KME, pogostejše artralgijske, mialgijske ter povišane vrednosti C-reaktivnega proteina in laktatne dehidrogenaze v serumu (16).

ZAKLJUČEK

V Sloveniji je treba pri bolniku z vročinsko boleznijo po vbodu klopa najpogosteje pomisliti

na klopni meningoencefalitis, redkeje na humano granulocitno anaplazmozo. Pri nas lymska borelijoza redko poteka kot akutna vročinska

bolezen. Možne so tudi sočasne akutne okužbe z različnimi povzročitelji bolezni, ki jih prenašajo klopi, kot je bilo v primeru našega bolnika.

LITERATURA

1. Avšič - Županc T, Knap N, Korva M, et al. Z vektorji preneseni virusni povzročitelji okužb osrednjega živčevja. *Med Razgl.* 2009; 48 Suppl. 5: 61-6.
2. Kaiser R. Tick-borne encephalitis. *Infect Dis Clin N Am.* 2008; 22 (3): 561-75.
3. Kraigher A, Klavs I, Sočan M, et al. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2009 [internet]. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije; 2010 [citirano 2012 Sep 23]. Dosegljivo na: <http://www.ivz.si>
4. Kraigher A, Sočan M, Klavs I, et al. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2010 [internet]. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije [citirano 2012 Sep 23]. Dosegljivo na: <http://www.ivz.si>
5. Strašek Smrdel K, Petrovec M, Lotrič - Furlan S, et al. The sequences of groESL operon of *Anaplasma phagocytophilum* among human patients in Slovenia. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012; 64 (1): 123-5.
6. Lotric - Furlan S, Rojko T, Petrovec M, et al. Epidemiological, clinical and laboratory characteristics of patients with human granulocytic anaplasmosis in Slovenia. *Wien Klin Wochenschr.* 2006; 118 (21-22): 708-13.
7. Süß J. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine.* 2003; 21 Suppl 1: 19-35.
8. Durmišič E, Knap N, Saksida A, et al. Prevalence and molecular characterisation of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovenia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011; 11 (6): 659-64.
9. Zore A. Dokazovanje bakterije *Borrelia burgdorferi* sensu lato v gostiteljih in prenašalcih z verižno reakcijo s polimerazo [magistrsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta; 1998.
10. Petrovec M, Sumner JW, Nicholson WL, et al. Identity of ehrlichial DNA sequences derived from *Ixodes ricinus* ticks with those obtained from patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. *J Clin Microbiol.* 1999; 37 (1): 209-10.
11. Cerar D, Sočan M, Avšič - Županc T, et al. Vročica Q v Sloveniji. In: Beovič B, Strle F, Čizman M, eds. Infektološki simpozij 2008; 2008 Mar 24-25; Ljubljana. Ljubljana: Sekcija za kemoterapijo SZD: Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center: Katedra za infekcijske bolezni in epidemiologijo MF; 2008. p. 157-66.
12. Lotric - Furlan S, Petrovec M, Avsic - Zupanc T, et al. Prospective assessment of the etiology of acute febrile illness after a tick bite in Slovenia. *Clin Infect Dis.* 2001; 33 (4): 503-10.
13. Rojko T. Okužbe z babezijami pri ljudeh z ohranjeno imunostjo v Sloveniji [doktorsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2007.
14. Arnez M, Lužnik - Bufon T, Avšič - Županc T, et al. Causes of febrile illness after a tick bite in Slovenian children. *Pediatr Infect Dis J.* 2003; 22 (12): 1078-83.
15. Logar M, Ružič - Sabljic E, Maraspin V, et al. Comparison of erythema migrans caused by *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*. *Infection.* 2004; 32 (1): 15-9.
16. Lotrič - Furlan S, Petrovec M, Avšič - Županc T, et al. Epidemiological, clinical and laboratory distinction between human granulocytic ehrlichiosis and the initial phase of tick-borne encephalitis. *Wien Klin Wochenschr.* 2002; 114 (13-14): 636-40.
17. Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10 (12): 1108-32.

Miša Korva¹, Tjaša Cerar², Katja Strašek - Smrdel³,
Eva Ružič - Sabljic⁴, Tatjana Avšič - Županc⁵

Novosti v mikrobiološki diagnostiki klopno prenosljivih mikroorganizmov

Update on Microbiological Diagnostics of Tick-Borne Pathogens

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: lymska borelioz, klopni meningoencefalitis, humana granulocitna anaplazmoza, mikrobiološka diagnostika

Klopi prenašajo številne porajajoče se patogene mikroorganizme, ki povzročajo bolezni tako pri ljudeh kot tudi živalih. Najpogostejše klopno prenosljive bolezni v Sloveniji so lymska borelioz, klopni meningoencefalitis in humana granulocitna anaplazmoza. Pri vseh treh boleznih je klinična slika in etiologija vboda klopa pogosto nezadostna za dokončno postavitev klinične diagnoze, zato je razvoj novih sodobnih mikrobioloških pristopov nujno potreben. Čeprav je hitra diagnostika še vedno odvisna od dokaza specifičnih protiteles, ima uporaba seroloških metod tudi slabe plati. Zato pridobiva razvoj občutljivih in standardiziranih molekularnih metod vedno večjo veljavo predvsem pri diferencialni diagnostiki vročinskih bolezni na področjih, kjer je endemičnih več klopno prenosljivih bolezni.

ABSTRACT

KEY WORDS: Lyme borreliosis, tick-borne encephalitis, granulocytic anaplasmosis, microbiological diagnosis

Tick-borne diseases are common occurrences in both medical and veterinary clinical settings. Besides impossible control and prevention of these diseases, there are also a lot of constraints related to their diagnosis and clinical management. In Slovenia, the most important tick-transmitted diseases are Lyme borreliosis, tick-borne encephalitis and granulocytic anaplasmosis. In all three diseases, the actual diagnosis must be established in the laboratory since non-specific clinical features are present. The early diagnosis still depends on the detection of specific IgM and IgG antibodies in clinical samples, yet there are also several drawbacks. With the development of more specific and standardized molecular techniques, the latter are gaining value in differential diagnosis of fevers after tick bites in endemic areas.

¹ Dr. Miša Korva, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

² Dr. Tjaša Cerar, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Katja Strašek - Smrdel, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁴ Prof. dr. Eva Ružič - Sabljic, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; eva.ruzic-sablji@mf.uni-lj.si

⁵ Prof. dr. Tatjana Avšič - Županc, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; tatjana.avsic@mf.uni-lj.si

UVOD

Klopi so bili prvi členonožci, pri katerih so dokazali, da prenašajo patogene mikroorganizme. Poleg komarjev so najpomembnejši prenašalci (vektorji) številnih mikroorganizmov (1). V zadnjih dveh desetletjih se je pojavnost bolezni, katerih povzročitelje prenašajo klopi, povsod povečala. Poleg tega odkrivajo v klopih tudi številne nove povzročitelje bolezni (2). Pri večini zoonoz je človek naključni gostitelj, ki se lahko okuži preko prenašalca, okuženega okolja ali s stikom z okuženo živaljo. V Evropi je najpomembnejši prenašalec mikroorganizmov klop vrste *Ixodes ricinus*, ki predstavlja kar 95 % populacije klopov. Poleg klopov iz rodu *Ixodes* spp. so medicinsko pomembni še rodovi *Dermacentor* spp., *Haemaphysalis* spp. in *Rhipicephalus* spp. Klopi se s patogeni okužijo med sesanjem krvi okužene živali, ki je naravni gostitelj mikroorganizma, nato s slino prenesejo mikroorganizme na naslednjega gostitelja.

Klopi prenašajo številne porajajoče se patogene, med katerimi so v Sloveniji najpogostejši: *Borrelia burgdorferi* sensu lato, virus klopnega meningoencefalitisa in *Anaplasma phagocytophilum* (3-5). Pri vseh treh povzročiteljih je klinična slika in etiologija vbođa klopa pogosto nezadostna za dokončno postavitev klinične diagnoze, zato je sodobna mikrobiološka diagnostika nujno potrebna.

KLOPNI MENINGOENCEFALITIS

Virus klopnega meningoencefalitisa povzroča klopni meningoencefalitis (KME), ki je v Evropi najpomembnejša virusna okužba osrednjega živčevja. Klopi so prenašalci in tudi naravni rezervoar virusa, zato je endemično območje KME tesno povezano z življenjskim prostorom in biologijo klopov. V Sloveniji je KME prepoznan že od leta 1953, obvezno prijavljanje bolezni pa je bilo uvedeno leta 1977. Kljub temu da poteka večina okužb z virusom KME asimptomatsko, zbolil v Sloveniji vsako leto od 200 do 300 ljudi. S povprečno stopnjo incidence 13,5/100.000 prebivalcev sodi Slovenija v sam vrh obolenosti s KME v Evropi (6).

Pri dveh tretjinah bolnikov, ki kažejo prizadetost osrednjega živčevja, je potek bolezni dvofazen. Viremična faza bolezni nastopi po 7-14-dnevni inkubaciji in traja en teden.

Značilni so nespecifični znaki: vročina, glavobol, slabo počutje, utrujenost, bruhanje in prehlad.

Sledi asimptomatsko obdobje, ki traja približno teden dni, nato nenadno nastopi druga faza bolezni s kliničnimi znaki meningitisa, meningoencefalitisa ali meningoencefalomielitisa. Značilni znaki druge faze bolezni so: močan glavobol, slabost, bruhanje, otrdelost vratu in kognitivne motnje. Akutna faza bolezni lahko traja tudi več tednov. Večina bolnikov si po dolgotrajnem okrevanju opomore, vseeno je smrtnost 1-5 % (7).

Okužbo z virusom KME je mogoče natančno potrditi le z mikrobiološkimi metodami, saj so klinični znaki bolezni pogosto neznačilni in nezadostni za postavitev diagnoze. Glede na dvofazni potek bolezni poiščejo bolniki zdravniško pomoč, ko nastopijo prvi nevrološki simptomi. Ker takrat virus ni več prisoten v krvnem obtoku, je neposreden dokaz okužbe omejen (8). Kljub temu lahko z metodo obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (angl. *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, RT-PCR) v realnem času v prvi fazi bolezni, ko bolnik še nima protiteles, virus KME neposredno dokažemo v vzorcih krvi in seruma. Največji pomen RT-PCR v realnem času je v diferencialni diagnostiki; za dokazovanje okužb z virusom KME pri bolnikih z nepojasnenim vročinskim stanjem po vbođu klopa, a brez izraženih znakov meningitisa, ter pri tistih, ki tudi po nastopu nevroloških simptomov ne razvijejo protiteles (8, 9).

V nasprotju s tem v dnevni diagnostiki najpogosteje uporabimo encimski imunski test (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), ki temelji na dokazovanju specifičnih protiteles razreda IgM in IgG v serumu ali likvorju bolnika (10). Protitelesa se v serumu pojavijo že v začetku druge faze bolezni (11). Specifična protitelesa razreda IgM lahko v serumu dokažemo že po šestih dneh po nastopu nevroloških znakov bolezni, protitelesa razreda IgG pa nekoliko kasneje. Poleg seruma lahko specifična protitelesa proti virusu KME dokažemo tudi v likvorju, vendar nekoliko kasneje in v nižjih koncentracijah kot v serumu (10). Okužbo z virusom KME potrdimo s prisotnostjo protiteles razreda IgM in IgG v serumu bolnika ali z dokazom intrate-

kalne tvorbe specifičnih protiteles (12). Kljub temu moramo pri interpretaciji seroloških rezultatov upoštevati določena dejstva, kot npr. okužbe z ostalimi flavivirusi (npr. virus denga, virus rumene mrzlice ali virus zahodnega Nila) ali cepljenje, ki lahko povzročita nastanek navzkrižno reaktivnih protiteles. Predvsem moramo biti pozorni na podatek o morebitnem cepljenju proti virusu KME, saj so protitelesa razreda IgM v serumu prisotna še nekaj mesecev po cepljenju (13). Prav zato je dobra anamneza bolnika in kvalitetna komunikacija med mikrobiologom in infektologom ključna za pravilno tolmačenje rezultatov. Eden od obetavnejših načinov za razločevanje med navzkrižno reaktivnostjo protiteles razreda IgM in akutno okužbo z virusom KME je kvantitativna inačica metode ELISA. Rezultati nedavne študije kažejo, da imajo bolniki, ki so okuženi z virusom KME visoke vrednosti protiteles razreda IgM (> 500 AU (angl. *arbitrary unit*)) za razliko od tistih, ki so cepljeni ali imajo protitelesa proti ostalim flavivirusom (14). Mikrobiološko najzahtevnejši je dokaz okužbe z virusom KME pri bolnikih, ki so bili predhodno cepljeni proti virusu KME, a so vseeno zboleli (t. i. *vaccination breakthroughs*). Poleg nepopolnega cepljenja sta še dva razloga za nezadostno zaščito po cepljenju, in sicer: slab odziv na cepivo ali hiter propad protiteles razreda IgG po končanem cepljenju. Okužbo z virusom KME dokazujemo v takih primerih z avidnostjo protiteles razreda IgG, saj pričakujemo visoko avidnost protiteles razreda IgG in zakasnel razvoj protiteles razreda IgM (12, 14).

HUMANA GRANULOCITNA ANAPLAZMOZA

Humana granulocitna anaplazmoza je porajajoča se klopno prenosljiva bolezen, ki jo povzroča bakterija *Anaplasma phagocytophilum* (15). Ljudje se večinoma okužijo z vbodom klopa, ki prenese bakterijo v krvni obtok, kjer se le-ta nato razmnožuje. Opisali so tudi okužbe s transfuzijo s kontaminirano krvjo ter perinatalni prenos bakterije z okužene matere na otroka (16–18). Po inkubacijski dobi (7–10 dni) se lahko pojavijo klinični znaki, podobni gripi; visoka vročina (> 39 °C), mrazenje, glavobol in bolečine v mišicah in skle-

pih. Pojavi se lahko tudi suh kašelj, znaki atipične pljučnice in gastrointestinalne težave (17). Redko se razvije kožni izpuščaj na mestu vboda klopa, kar zahteva diferencialno diagnostiko z lymsko boreliozo (16).

Za dokaz okužbe pregledujemo bele krvne celice in serum bolnika. V kliničnih laboratorijskih testih imajo bolniki pogosto levkopenijo, trombocitopenijo, spremenjene vrednosti jetrnih encimov in povišane vrednosti C-reaktivnega proteina (CRP). Za uspešno mikrobiološko diagnostiko je zelo pomembna pravilna izbira metode, saj je občutljivost metod v veliki meri odvisna od dneva odvzema kliničnega vzorca (19). V prvih dneh po okužbi je pregled krvnega razmaza, obarvanega z Giemso, najhitrejša diagnostična metoda. V preparatu iščemo značilne, temno modro do vijolično obarvane bakterije, ki se nahajajo v citoplazmi in tvorijo t. i. morule. Za direktni razmaz je treba vzeti bolniku kri pred začetkom antibiotičnega zdravljenja (20).

Ker bolniki večinoma ne poiščejo zdravniške pomoči takoj, v prvih dneh po nastopu kliničnih znakov, za dokaz okužbe pogosteje uporabljamo metodo posredne imunofluorescence (angl. *indirect immunofluorescence assay*, IFA). Protitelesa se v serumu bolnika pojavijo 1–2 tedna po pojavu kliničnih znakov okužbe (21). Za potrditev diagnoze potrebujemo parni serum (na začetku bolezni in po 15–21 dneh), da lahko spremljamo spreminjanje titra protiteles razreda IgG. Akutna okužba z bakterijo *A. phagocytophilum* je potrjena, če dokažemo štirikratni porast titra specifičnih protiteles razreda IgG oz. serokonverzijo (20). Metoda IFT je za dokazovanje protiteles razreda IgG zelo občutljiva (82–100%) in precej manj za dokazovanje protiteles razreda IgM (27–37%). Slabost metode je tudi navzkrižna reaktivnost med posameznimi vrstami erlihij, npr. *Ehrlichia chaffeensis*. Protitelesa proti *A. phagocytophilum* ostanejo v krvi bolnika še več let po preboleli okužbi, zato je treba rezultate tolmačiti skladno z ostalimi kazalci klinične okužbe (20).

Trenutno najbolj občutljivejša metoda v diagnostiki granulocitne anaplazmoze je dokaz DNA z metodo PCR, kjer pomnožujemo različne tarčne odseke genoma bakterije (groESL, 16S rRNA). Ob koncu prvega tedna bolezni bakterij običajno ni več v krvi, kar omeji

učinkovitost metode PCR (20). Sicer je občutljivost metode odvisna tudi od izbire gena in začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje, poleg tega moramo rezultate PCR potrditi tudi z določitvijo nukleotidnega zaporedja (19, 22).

LYMSKA BORELIOZA

Lymska borelioz, ki jo povzroča *Borrelia burgdorferi* sensu lato, se najpogosteje izraža kot kožni izpuščaj, imenovan *erythema migrans*. Med okužbo se borelije lahko razsejejo v druge organe ali tkiva, kot so osrednje živčevje, mišice, srce in sklepi (23). Klinična diagnoza lymške borelioze je enostavna ob prisotnosti značilnega *erythema migrans*, pri vseh drugih kliničnih slikah pa je težavna zaradi neznačilnih znakov in simptomov. Mikrobiološka diagnostika je tako potrebna pri vseh kliničnih slikah lymške borelioze z izjemo *erythema migrans* (23). Za laboratorijsko potrditve borelijske okužbe uporabljamo številne mikrobiološke metode, kot so: dokaz specifičnih protiteles, dokaz molekule DNA borelij in/ali osamitev *B. burgdorferi* sensu lato. Metode lahko združujemo glede na potek bolezni in trajanje težav, vedno jih vrednotimo v povezavi s klinično sliko bolnika.

Dokazovanje specifičnih protiteles v kužninah bolnikov (kri, likvor, sinovijska tekočina) je najpogostejši način potrjevanja borelijske okužbe. Specifična protitelesa nastanejo tri tedne do več mesecev po okužbi in so lahko prisotna tudi več let po okužbi. Serološke metode razlikujemo glede na uporabljen antigen (različne vrste borelij in različni sevi znotraj vrste) in metode (posredni imunofluorescenčni, encimski imunski, kemiluminiscenčni test ali imunoblot). Veliko število borelijskih antigenov nadomeščajo rekombinatni antigeni, tako je v zadnjih letih vse pogostejša uporaba rekombinantne beljakovine VlsE, v kombinaciji z beljakovino OspC. Posebno vrednost imajo serološki testi, ki lahko podajo informacijo o morebitni intratekalni tvorbi specifičnih protiteles, ki potrjujejo okužbo osrednjega živčevja (24). Klasične serološke metode vse pogosteje nadomeščajo z avtomatizirani testi, ki zmanjšujejo verjetnost človeške napake. Trenutne raziskave usmerjajo k različnim vnetnim dejavnikom (interlevkini IL-6, IL-8,

IL-12, IL-18, interferon γ , kemokina CXCL12 in CXCL13), ki jih dokazujemo v krvi in likvorju bolnikov z različnimi kliničnimi slikami lymške borelioze (25). Najbolj obetaven je kemokin CXCL 13, katerega povišane koncentracije v likvorju lahko zaznamo dneve pred intratekalno tvorbo protiteles in ki bi lahko bil pokazatelj zgodnje okužbe osrednjega živčevja (26).

PCR uporabljamo v neposredni diagnostiki borelijske okužbe, ker je neprimerno hitrejša od metode kultivacije (1–2 dni v primerjavi z devetimi tedni). DNA borelij lahko dokažemo v različnih kliničnih vzorcih: v koži, krvi, likvorju ali sklepnih tekočinah. Za pridobitev zanesljivih rezultatov PCR je bistvena uporaba primernih postopkov izbire in odvzema vzorcev, prenosa v laboratorij in osamitve DNA, saj je število spirohet v kliničnih vzorcih majhno. Občutljivost metode PCR v vzorcih kože je med 36 in 88 % za *erythema migrans*, 54–100 % za *acrodermatitis chronica atrophicans*, 10 % občutljivost v vzorcih krvi in 23 % občutljivosti v primeru likvorja (27). Najpogosteje uporabljamo metodo klasične vgnezdene reakcije PCR, ki poveča občutljivost metode. Tarčna regija je gen za zunanjo površinsko beljakovino OspA ali medgenski odsek 5S-23S rRNK. Izbira tarčnega odseka vpliva na občutljivost in specifičnost. Tudi v molekularni diagnostiki vse pogosteje klasične metode nadomeščajo z avtomatiziranimi metodami; avtomatizirani in s tem bolj standardizirani so osamitev DNA iz vzorca, pomnoževanje DNA in analiza pridelka pomnoževanja.

Borelije lahko osamimo iz različnih kliničnih materialov bolnika (koža, likvor, kri, sinovijska tekočina, drugi) tako pri vseh oblikah okužbe (zgodnjih in kroničnih). Osamitev borelij iz kliničnih vzorcev je dolgotrajna (9–12 tednov), cenovno neugodna, zaradi majhnega števila borelij v vzorcih ima metoda nizko občutljivost, predvsem pri kliničnih vzorcih telesnih tekočin. Prednost metode je visoka specifičnost in pridobitev živih borelij, zato je metoda zlati standard (27). Borelije najpogosteje osamimo iz kože bolnikov s klinično sliko *erythema migrans* (70 % in več), veliko manj so uspešne osamitve iz krvi, likvorja, sklepne tekočine (manj kot 10 %) pri drugih kliničnih slikah.

LITERATURA

1. Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology*. 2004; 129 Suppl: S3–14.
2. Randolph SE. The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001; 356 (1411): 1045–56.
3. Strle F, Stantic-Pavlinic M. Lyme disease in Europe. *N Engl J Med*. 1996; 334 (12): 803.
4. Lotric - Furlan S, Petrovec M, Avsic - Zupanc T, et al. Prospective assessment of the etiology of acute febrile illness after a tick bite in Slovenia. *Clin Infect Dis*. 2001; 33 (4): 503–10.
5. Arnez M, Luznik - Bufon T, Avsic - Zupanc T, et al. Causes of febrile illnesses after a tick bite in Slovenian children. *Pediatr Infect Dis J*. 2003; 22 (12): 1078–83.
6. Donoso Mantke O, Schadler R, Niedrig M. A survey on cases of tick-borne encephalitis in European countries. *Euro Surveill*. 2008; 13 (17). pii: 18848.
7. Bogovic P, Lotric - Furlan S, Strle F. What tick-borne encephalitis may look like: clinical signs and symptoms. *Travel Med Infect Dis*. 2010; 8 (4): 246–50.
8. Saksida A, Duh D, Lotric-Furlan S, et al. The importance of tick-borne encephalitis virus RNA detection for early differential diagnosis of tick-borne encephalitis. *J Clin Virol*. 2005; 33 (4): 331–5.
9. Arnez M, Avsic - Zupanc T. Tick-borne encephalitis in children: an update on epidemiology and diagnosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009; 7 (10): 1251–60.
10. Holzmann H. Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine*. 2003; 21 Suppl 1: S36–40.
11. Venturi G, Martelli P, Mazzolini E, et al. Humoral immunity in natural infection by tick-borne encephalitis virus. *J Med Virol*. 2009; 81 (4): 665–71.
12. Grgic - Vitek M, Avsic - Zupanc T, Klavs I. Tick-borne encephalitis after vaccination: vaccine failure or misdiagnosis. *Vaccine*. 2010; 28 (46): 7396–400.
13. Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet*. 2008; 371 (9627): 1861–71.
14. Stiasny K, Aberle JH, Chmelik V, et al. Quantitative determination of IgM antibodies reduces the pitfalls in the serodiagnosis of tick-borne encephalitis. *J Clin Virol*. 2012; 54 (2): 115–20.
15. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001; 51 (Pt 6): 2145–65.
16. Blanco JR, Oteo JA. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2002; 8 (12): 763–72.
17. Grzeszczuk A, Barat N, Bakken J, et al. Anaplasmosis in humans. In: Parola P, Raoult D, eds. *Rickettsial diseases old and new*. Taylor & Francis Group; 2007. p. 223–36.
18. Jereb M, Pecavar B, Tomazic J, et al. Severe human granulocytic anaplasmosis transmitted by blood transfusion. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18 (8): 1354–7.
19. Dumler JS, Brouqui p. Molecular diagnosis of human granulocytic anaplasmosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2004; 4 (4): 559–69.
20. Thomas RJ, Dumler JS, Carlyon JA. Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and Ehrlichia ewingii ehrlichiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009; 7 (6): 709–22.
21. Lotric - Furlan S, Petrovec M, Zupanc TA, et al. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe: clinical and laboratory findings for four patients from Slovenia. *Clin Infect Dis*. 1998; 27 (3): 424–8.
22. Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2004; 10 (12): 1108–32.
23. Stanek G, Wormser GP, Gray J, et al. Lyme borreliosis. *Lancet*. 2012; 379 (9814): 461–73.
24. Ljostad U, Skarpaas T, Mygland A. Clinical usefulness of intrathecal antibody testing in acute Lyme neuroborreliosis. *Eur J Neurol*. 2007; 14 (8): 873–6.
25. Rupprecht TA, Koedel U, Fingerle V, et al. The pathogenesis of lyme neuroborreliosis: from infection to inflammation. *Mol Med*. 2008; 14 (3–4): 205–12.
26. Rupprecht T, Plate A, Adam M, et al. The chemokine CXCL13 is a key regulator of B cell recruitment to the cerebrospinal fluid in acute Lyme neuroborreliosis. *J Neuroinflammation*. 2009; 6: 42.
27. Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, et al. Diagnosis of lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18 (3): 484–509.

Nataša Knap¹, Tatjana Avšič - Županc²

Dejavniki, ki vplivajo na pojavnost klopne meningoencefalitisa v Sloveniji

Factors Affecting the Incidence of Tick-Borne Encephalitis in Slovenia

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: klopni meningoencefalitis, incidenca, klopi, mali sesalci, divjad, podnebni dejavniki, antropogeni dejavniki

Klopni meningoencefalitis je virusna bolezen, ki se pojavlja na omejenih endemskih območjih. Za oblikovanje endemskega območja je potrebna kombinacija več dejavnikov: prenašalec, primerni gostitelji in habitat. Zaradi pojava novih endemskih področij in povečanja števila primerov klopne meningoencefalitisa v Evropi so študije, ki raziskujejo vzroke za pojavnost bolezni, zelo pomembne. V naših raziskavah smo proučevali pojavnost klopne meningoencefalitisa v povezavi s številnimi dejavniki ter vplivom človeka na pojavljanje bolezni. Raziskave so pokazale, da sezonska aktivnost in prekuženost klopov vrste *Ixodes ricinus* neposredno vplivata na incidenco bolezni, na klope pa pomembno vpliva podnebje. Ugotovili smo, da na pojavljanje bolezni vpliva tudi prisotnost in številčnost gostiteljev klopov, tako malih sesalcev kot divjadi, predvsem jelenjadi. Prikazali smo, da lahko uporabimo stopnjo prekuženosti malih sesalcev in njihovo prostorsko razporeditev za napoved endemskih območij. S proučevanjem antropogenih dejavnikov, ki so odraz posegov človeka v naravo in tako spreminjanja biotskega okolja, in tistih, ki vplivajo neposredno na možnost stika med klopom in človekom, smo dokazali njihov pomen za samo intenziteto posameznega endemskega območja. Raziskave raznolikih dejavnikov pripomorejo k spoznavanju okoliščin, ki vplivajo na pojavnost bolezni v Sloveniji in drugod po Evropi. Potrebne so še dodatne raziskave, ki bodo omogočile razumevanje kompleksnih dejavnikov, ki vplivajo na pojavnost in intenziteto endemskih področij.

ABSTRACT

KEY WORDS: tick-borne encephalitis, incidence, ticks, small mammals, deer, climate factors, anthropogenic factors

Tick-borne encephalitis is a viral disease that occurs in limited endemic areas. A combination of several factors is necessary for an area to become endemic: a carrier, a suitable host and an appropriate habitat. Due to the emergence of new endemic areas and an increase in the number of tick-borne encephalitis cases in Europe, studies that explore the impact of individual factors on the incidence of the disease are very important. Our research focused on the incidence of tick-borne encephalitis in conjunction with several factors and the impact of humans on the occurrence of the disease. Seasonal activity of *Ixodes ricinus* ticks and the prevalence of the infection affect the incidence of the disease. Climate has a significant effect on tick species. Presence and abundance of tick hosts, small mammals and deer also affect the occurrence of the disease. The prevalence rate of tick-borne encephalitis in small mammals can be used to predict endemic areas. Anthropogenic factors, which correspond to human

¹ Dr. Nataša Knap, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; nataša.knap@mf.uni-lj.si

² Prof. dr. Tatjana Avšič - Županc, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

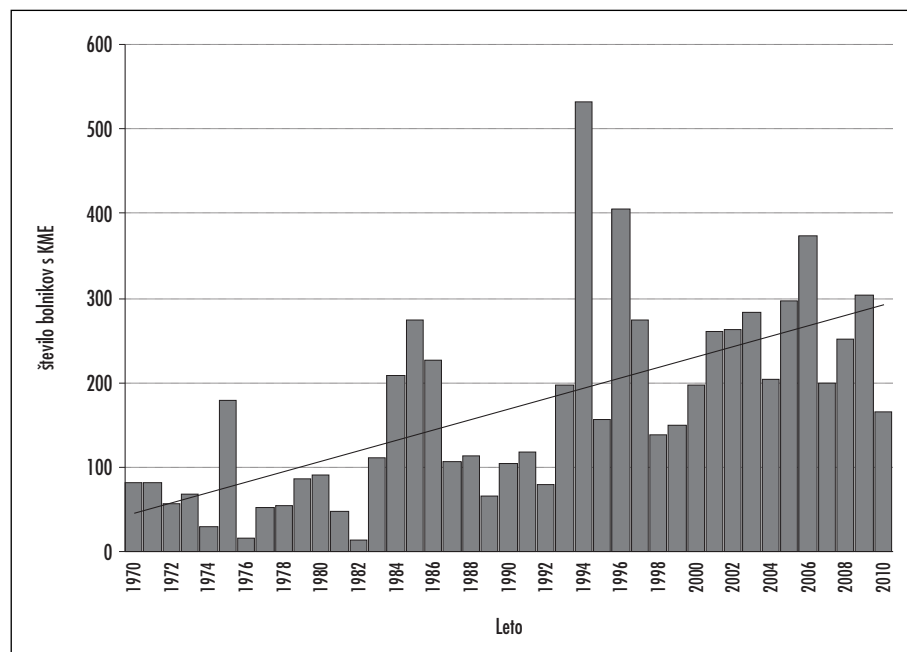
interference in nature and his affect on biotic habitat and the interaction between humans and ticks, are important for the intensity of tick-borne encephalitis foci in nature. Studies of various factors contribute to the knowledge of virus circulation in nature. Additional studies are needed to provide an understanding of complex factors that influence the incidence and the intensity of endemic areas.

UVOD

Klopni meningoencefalitis (KME) je najpomembnejša klopno prenosljiva bolezen v Evropi, ki prizadene osrednje živčevje. Povzroča jo virus klopnega meningoencefalitisa, ki spada v skupino flavivirusov (1). Bolezen so v Evropi dokazovali že od tridesetih let prejšnjega stoletja; prve primere v Sloveniji so prepoznali že leta 1946 (1, 2). Virus so v Sovjetski zvezi zgodaj osamili iz vzorcev bolnikov, miši in klopov vrste *Ixodes persulcatus*, kasneje so ga v osrednji Evropi osamili tudi iz klopov vrste *Ixodes ricinus* (3, 4). Ti dve vrsti klopa prenašata tri različne podtipse virusa: *I. ricinus* prenaša evropski podtip virusa, razširjen v osrednji, vzhodni in severni Evropi, *I. persulca-*

tus pa sibirski (sever Rusije in Finske) in daljnovzhodni podtip (Rusija, sever Kitajske in Japonska) (5, 6). V Evropi letno potrdijo okrog 3.000 primerov bolezni, vendar incidenca močno niha po letih in pokrajinah (7). V zadnjih dveh desetletjih je prišlo do velikega porasta števila primerov v Evropi; letno zabeležijo tudi do 8.000 primerov (8, 9). Pojavila so se nova žarišča bolezni v Italiji, Nemčiji in Švici. Bolezen so zaznali tudi na višjih nadmorskih višinah in zemljepisnih širinah (8, 10, 11).

Slovenija je ena izmed držav v Evropi, ki imajo najvišje incidence KME. Letno zabeležimo od 200 do 300 primerov. Endemsko območje se razteza čez celoten severni del Slovenije od Jesenic do Šentilja, se nato nadalju-



Slika 1. Število bolnikov s klopnim meningoencefalitisom v Sloveniji v letih od 1970 do 2010. KME – klopni meningoencefalitis.

je po Celjski kotlini in Savinjski dolini čez Ljubljansko kotlino na Gorenjsko, proti jugu naprej vse do Cerknice in Postojne ter Kočevja (12). V zadnjih desetletjih so se pojavila nova žarišča v okolici Nove Gorice (13). Incidenca močno niha iz leta v leto, vendar je kljub temu opazen trend naraščanja (slika 1) (13).

V zadnjih letih so raziskovalci objavili številne študije, ki pripisujejo ključno vlogo za spremembe v pojavnosti KME po eni strani podnebnim spremembam, po drugi strani spremembam v socialno-ekonomskih razmerah in številnim drugim zelo raznolikim dejavnikom (14–16). Zaradi kompleksnosti dejavnikov, ki vplivajo na pojavnost bolezni, so študije raznovrstnih dejavnikov zelo zahtevne. Veliko ugotovitev temelji le na posrednih podatkih.

V naši študiji smo proučevali pojavnost KME v povezavi s številnimi biotskimi in abiot-skimi dejavniki ter vplivom človeka na pojavljanje bolezni. Opisali smo vlogo večjega števila dejavnikov v kroženju virusa KME, predvsem, kako in ali sploh vplivajo na prenašalce in gostitelje in ali imajo posledično vpliv na incidenco KME.

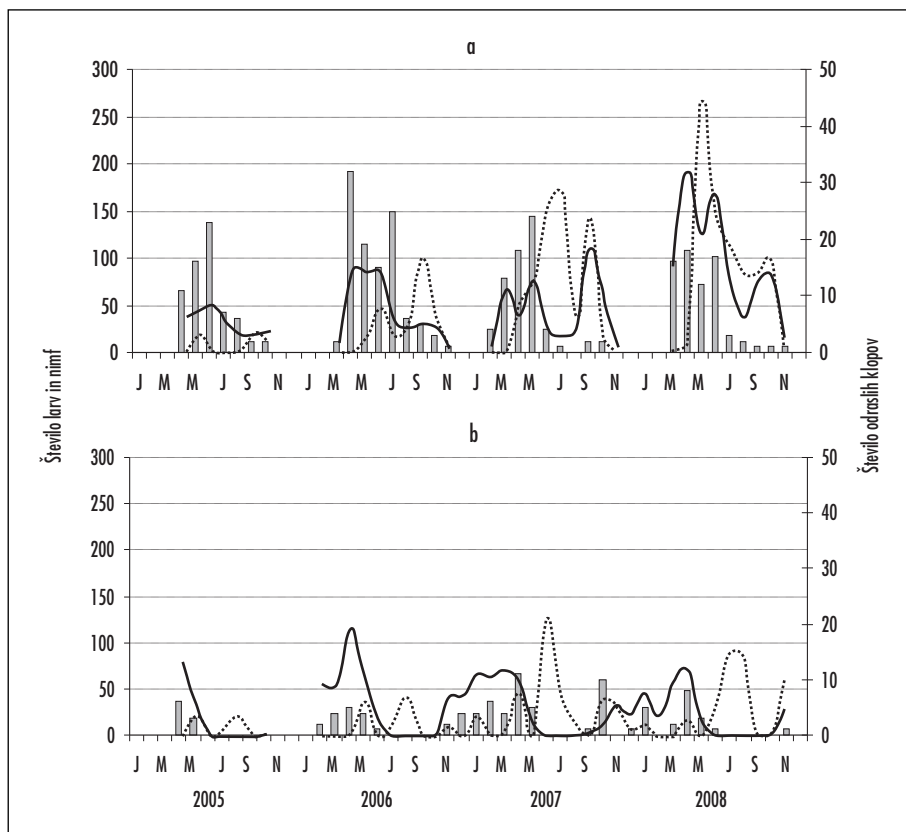
POMEN PRENAŠALCEV – KLOPOV ZA PRISOTNOST VIRUSA V NARAVI

Ixodes ricinus (navadni gozdni klop) je prenašalec virusa KME v Evropi. Razvojni krog klopa traja od dve do šest let in obsega štiri razvojne stopnje: jajčece, larvo, nimfo in odraslo žival. Larva, nimfa in odrasla žival so aktivne, zajedavske stopnje klopa. Za svoj razvoj v naslednjo stopnjo (larve v nimfe in nimfe v odraslo žival) oziroma za tvorbo jajčec (odrasla samica) se mora klop enkrat hraniti na ustreznem gostitelju (17). Klope vrste *I. ricinus* najdemo povsod po Evropi, vključno z Anglijo in Irsko. Na jugu je vrsta razširjena do severa Afrike (Alžirija, Tunizija), na severu po Skandinaviji, na vzhodu do Volge in vse do Bližnjega vzhoda (18, 19). Kljub temu je evropski podtip virusa KME razširjen le po omejenem območju v osrednji, vzhodni in severni Evropi (6). Klop se lahko okuži z virusom KME na več načinov: viremičen način (zaužitje krvi viremične živali), transovarialni prenos (prenos z okužene samice na jajče-

ca) in neviremičen prenos, do katerega pride med sočasnim hranjenjem nezrelih stadijev klopa na gostitelju (20, 21).

KME je sezonska bolezen, ki se pojavlja predvsem v pomladnih in jesenskih mesecih, kar je posledica biološke aktivnosti kloпов (3). Ker se večina ljudi okuži z virusom KME z vbodom okuženega klopa, redkeje z zaužitjem toplotno neobdelanega mleka oziroma mlečnih izdelkov viremične živali, je pomembno, da dobro poznamo njihove sezonske aktivnosti in druge dejavnike, ki vplivajo na prekuženost kloпов z virusom KME.

Slovenija je sicer majhno področje, vendar je raznolikost tako vremenskih pogojev kot tipov habitatov v različnih regijah zelo velika in posledično so življenjski pogoji za klope zelo variabilni in pogojujejo različne vzorce sezonske aktivnosti. To smo potrdili, ko smo v obdobju od aprila 2005 do novembra 2008 mesečno vzorčili klope na več lokacijah v Sloveniji (22). V celinski Sloveniji imajo klope vrste *I. ricinus* značilen dvofazni ali bimodalni sezonski vzorec z dvema vrhoma aktivnosti; prvi vrh aktivnosti je v pomladanskih mesecih (april, maj, junij), drugi vrh nastopi v jesenskih mesecih (september, oktober) (slika 2a). Klope začnejo iskati gostitelje, takoj ko se stali sneg in maksimalne dnevne temperature presežejo 4 °C (odrasli klope) oziroma 7 °C (nimfe) (23). V poletnih mesecih klope niso tako številni kot spomladi in jeseni, saj zaradi visokih temperatur in nizke vlage ne zmorejo dolgo iskati gostiteljev. Klope iščejo gostitelje tako, da splezajo na rastlinje in čakajo. Pri tem so izpostavljeni okoljskim dejavnikom in so še posebej občutljivi na izsušitev, ki nastopi, ko je relativna vlažnost pod 80 % (24). Saturacijski deficit, ki predstavlja integrirano mero moči izsuševanja atmosfere in ga izračunamo na podlagi temperature in vlage, kaže, da sta ta dva dejavnika kritična in odgovorna, da klopov ne najdemo v poletnih mesecih na odprtih območjih (22). Primorska regija ima submediteransko podnebje, z vročimi, suhimi in dolgimi poletji ter s kratkimi, suhimi in hladnimi zimami. Tu je sezonska aktivnost kloпов nekoliko drugačna kot drugod po Sloveniji (slika 2b). Klope so aktivni čez celo zimo, vrh aktivnosti se je pojavil v zgodnjih pomladnih mesecih (marec). Nimf ne najdemo čez poletje.



Slika 2. Sezonska aktivnost larv, nimf in odraslih klopov od leta 2005 do 2008 na dveh lokacijah: Mozirje (a) in Črni Kal (b). Meseci si sledijo po vrsti: označeni so januar, marec, maj, julij, september, november. Stolpci predstavljajo odrasle klope, prekinjena črta larve, polna črta nimfe.

Tukaj je vzorec aktivnosti enofazen ali unimodalen. Nizka vlaga in visoka temperatura sta tista dejavnika, ki tak vzorec narekujeta (22). Spremenjen vzorec aktivnosti vpliva na stopnjo okužbe z virusom KME.

Po Evropi so v dosedanjih študijah okužbo z virusom KME dokazali pri 0–5% klopov vrste *I. ricinus*, odvisno od območja in načina dokazovanja prisotnosti virusa (25–27). Slovenija je država z eno najvišjih incidenc KME v Evropi. Vendar incidenca KME ni enaka po vsej državi. Povprečna stopnja okužbe klopov z virusom KME v Sloveniji je glede na štiriletno študijo okrog 0,3%; odstotek okuženih klopov se spreminja glede na lokacijo vzorčenja ter po letih vzorčenja, od 2% na cerkniškem območju do 0% na primorskem (28, 29). Klopi so v najvišjem odstotku oku-

ženi tam, kjer je tudi največ bolnikov s KME, območja, kjer virusa pri klopih nismo dokazali, so tista, kjer je incidenca KME najnižja oziroma ni bolnikov s KME (28).

Odstotek okuženih klopov vrste *I. persulcatus* je nekoliko višji, občasno so virus dokazali tudi v drugih vrstah klopov, kot je *Dermacentor reticulatus*, klopih iz rodu *Haemaphysalis* in drugih (30, 31). V klopih vrste *D. reticulatus* in *Haemaphysalis concinna*, ki smo jih našli v Prekmurju, virusa z molekularnimi metodami nismo dokazali (28, 29). Ti dve vrsti klopov imata nekoliko drugačen model sezonske aktivnosti kot *I. ricinus* po Sloveniji. Sezonska aktivnost, kot jo ima *I. ricinus* v celinskem delu Slovenije, zagotavlja, da nimfe in larve v istem obdobju iščejo gostitelje. Zato obstaja možnost, da se hrani na isti živali več klo-

pov hkrati in je večja verjetnost prenosa virusa med sočasnim hranjenjem z okuženimi nimf na neokužene larve (32, 33). Tak način prenosa virusa med klopi je izredno pomemben za ohranjanje virusa v naravi in takšno sezonsko sinhronijo nimf in larv v Sloveniji vidimo na območjih, kjer je KME prisoten. Ni je na Primorskem, kjer tudi virusa KME nismo dokazali v klopah (slika 2).

Tveganje ljudi in živali, da zbolijo za klopno prenosljivimi boleznimi, kot je KME, je neposredno povezano z aktivnostjo klopov vrste *I. ricinus*. Odstotek klopov, okuženih z virusom KME, je dober pokazatelj za prisotnost virusa KME ter za oceno tveganja na nekem območju. Zato je pomembno prepoznati povezavo med številčnostjo in sezonsko aktivnostjo klopov in podnebnimi dejavniki.

POMEN GOSTITELJEV ZA KROŽENJE VIRUSA KLOPNEGA MENINGOENCEFALITISA

Pomemben dejavnik za oblikovanje naravnega žarišča so tudi gostitelji virusa (34). Dosedanje raziskave so omenjale veliko različnih vretenčarjev v povezavi s kroženjem virusa KME v naravi. Pomembna gostitelja nedoraslih stopenj klopov sta rumenogrla miš, *Apodemus flavicollis*, in gozdna voluharica, *Myodes glareolus*. Obe vrsti najdemo na območjih, kjer je KME prisoten, in zdi se, da sta nujno potrebni tako za viremičen prenos virusa na klope, saj razvijeta dovolj visoko viremijo, kot tudi za neviremičen prenos virusa z nimf na larve (32, 35). Mali glodavci razvijejo protitelesa le nekaj dni po okužbi z virusom KME in ta se ohranijo vse življenje, vendar tudi te živali omogočajo prenos virusa med sočasnim hranjenjem (36).

V Sloveniji smo protitelesa proti virusu KME dokazali v 5,53 % serumov malih sesalcev. Stopnja okužbe se je razlikovala glede na vrsto in območje ulova malih sesalcev. Dokaz specifičnih protiteles proti virusu KME v serumih malih sesalcev je dober pokazatelj prisotnosti virusa na nekem območju. Študije z dovolj velikim številom analiziranih živali pokažejo tudi intenziteto naravnega žarišča (37).

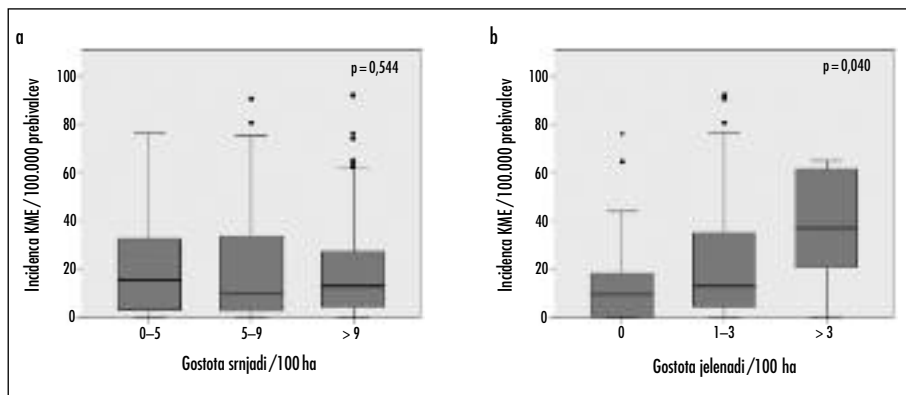
V najvišjem odstotku so okužene gozdne voluharice, v nekoliko nižjem odstotku miši

iz rodu *Apodemus* (37, 38). Številne živali, pri katerih so prisotna protitelesa proti virusu KME, so še vedno v viremični fazi oziroma je virus še prisoten v organih (37, 39, 40). V študijah, ki so jih izvajali pred časom, so za dokaz prisotnosti virusa KME uporabljali metodo osamitve virusa. Z novejšo, občutljivejšo in natančnejšo metodo obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (angl. *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, RT-PCR) v realnem času lažje dokažemo virus ali RNA virusa. Nova odkritja v zadnjih letih kažejo, da je viremična faza daljša, kot so predvidevali pred leti (37, 39, 40). Rezultati teh študij nakazujejo, da igrajo mali sesalci pomembno vlogo v kroženju virusa KME v naravi ne le kot gostitelji klopov, temveč tudi kot gostitelji virusa.

Druga pomembna skupina gostiteljev so veliki gostitelji. Veliki gostitelji, kot so jelenjad, govedo in druge večje živali, so pomembni, ker se na njih prehranjujejo predvsem odrasli klopi. Divjad ne razvije dovolj visoke viremije, da bi omogočala prenos virusa nazaj na klope (41). Dosedanje študije odvisnosti divjadi in številčnosti klopov niso dale nedvoumnih dokazov o neposredni povezavi med tema dvema dejavnikoma. Medtem ko so nekatere študije podprle teorijo o močni linearni odvisnosti med številčnostjo klopov in divjadjo, druge študije te povezave niso našle (42–44). Študije, opravljene v Italiji, so potrdile, da gostota srnjadi vpliva neposredno na incidenco KME (10, 45). Odstranitev srnjadi na večjem območju tako vodi v znižanje koncentracije virusa ali njegovo izkoreninjenje (46, 47).

Tudi v Sloveniji smo dokazali povezavo med številčnostjo divjadi in številom bolnikov s KME (29). Številčnost obeh skupin divjadi narašča v zadnjih štirih desetletjih, prav tako tudi incidenca KME. Ker so tovrstne povezave, ki se pokažejo skozi čas, lahko posledica drugih dejavnikov, je smiselno analizirati podatke tudi s prostorsko študijo. Le-ta je pokazala, da gostota srnjadi ni povezana z incidenco KME, obstaja pa značilna povezava med gostoto jelenjadi in incidenco KME. Na območjih z nizko gostoto jelenjadi zbolijo veliko manj ljudi za KME kot na območjih z visoko gostoto jelenjadi (slika 3).

Nekaj študij se je nanašalo tudi na pomen drugih gostiteljev za kroženje virusa KME;



Slika 3. Incidenca klopnega meningoencefalitisa na območjih Slovenije glede na gostoto srnjadi (a) in jelenjadi (b). KME – klopni meningoencefalitis.

takšno študijo so naredili na Švedskem in opisuje pomen plenilcev, kot sta lisica (*Vulpes vulpes*) in ameriški nerc (*Mustela vison*) za pojavnost virusa KME v naravi (48, 49). Tovrstnih študij ni veliko in so izvedene v zelo omejenem obsegu. Potrebne so še številne raziskave, ki bodo določile pomen posamezne vrste gostitelja najprej za kroženje virusa KME v naravi in ne nazadnje tudi za klope, prenašalce virusa.

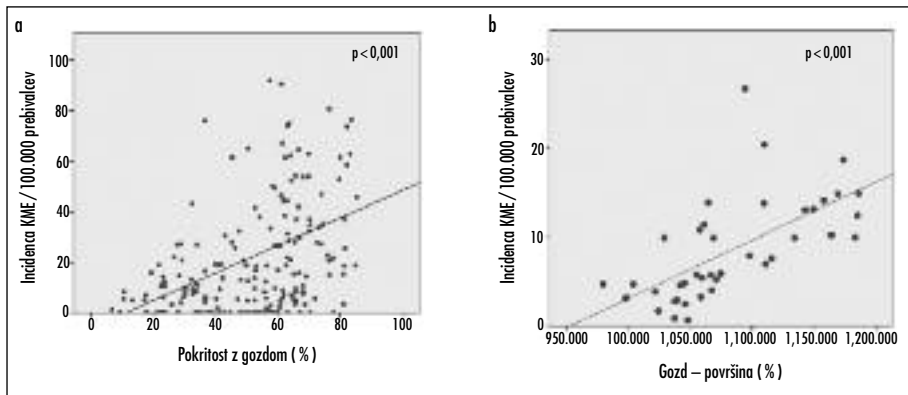
VPLIV ČLOVEKA NA POJAVNOST KLOPNEGA MENINGOENCEFALITISA

Višja incidenca KME je posledica dveh skupin vzrokov: najprej takih, ki vplivajo na povišanje potenciala virusa za prenos na gostitelje, in nato takih, ki vplivajo na relativno povišanje tveganja, se pravi povečano verjetnost za stik med človekom in okuženim klopom (50).

Na obe skupini vzrokov vpliva človek s svojimi posegi v naravo ter s samo aktivnostjo v naravi. Posegi človeka v naravo imajo lahko za posledico zaraščanje gozdov ali zmanjševanje kmetijskih površin. Take spremembe vplivajo na dostopnost in številčnost živali, se pravi gostiteljev. V baltskih državah je zaradi opuščanja velikih kmetij prišlo do zaraščanja obdelovalnih zemljišč z grmovjem in mladim drevjem. Tovrstni habitati so zelo primerni za glodavce, le-ti pomembno vplivajo na kroženje virusa KME v naravi (50, 51). Tudi v Sloveniji se površina gozdov večja že vse od

leta 1970; hkrati lahko dokažemo večje število bolnikov s KME v občinah, ki so v večjem odstotku pokrite z gozdom (slika 4). Večja površina gozdov zagotavlja primerno okolje za prenašalce virusa KME – klope. Hkrati s površino gozda raste tudi ustrezno okolje za velike in male gostitelje klopov. Jelenjad in srnjad ter miši *Apodemus* sp., gozdne voluharice (*M. glareolus*) in drugi mali sesalci so nujno potrebni gostitelji za klope; nekateri so primerni tudi za nesistemski in sistemski prenos virusa (29).

Druga skupina dejavnikov so dejavniki, ki vplivajo na povečanje tveganja za okužbo s KME zaradi povečane verjetnosti za stik med okuženim klopom in naivnim gostiteljem, človekom. To so dejavniki, ki vplivajo na aktivnost v naravi oziroma predvsem v gozdu. Ti so lahko posledica socialno-ekonomskih dejavnikov, ki kažejo, da sta povišana brezposelnost in revščina lahko vzroka za večji obisk gozda (52). Vreme je drugi dejavnik, ki lahko spodbudi človeka h gibanju v naravi. Študija, opravljena tako v Sloveniji kot drugod po Evropi, kaže, da se v obdobjih z lepim vremenom aktivnost ljudi v naravi izrazito poveča, kar posledično vodi v večje število stikov med klopi in človekom in ne nazadnje v povečano število bolnikov s KME (53). Prepoznavanje skupin ljudi, ki so izpostavljene večjemu tveganju, je izredno pomembno, saj lahko tako usmerimo naše ukrepe za preprečevanje KME, kot je cepljenje ter obveščanje ljudi o tveganem obnašanju, ki ga je treba omejiti.



Slika 4. Odvisnost incidence klopnega meningoencefalitisa od gozdnih površin: (a) prostorska povezava občin, (b) časovna povezava (29). KME – klopni meningoencefalitis.

ZAKLJUČEK

Raziskave, opravljene v Sloveniji, znatno prispevajo k znanju o vzrokih tako za pojavnost KME kot tudi za spremembe v incidenci KME v Sloveniji, ugotovitve lahko razširimo tudi na endemska območja KME drugod v Evropi. Klopi vrste *Ixodes ricinus*, ki so razširjeni po vsej Sloveniji, so v manj kot enem odstotku okuženi z virusom KME, vendar se stopnja okužbe močno razlikuje po različnih območjih v Sloveniji in tako neposredno vpliva na incidenco KME. Številčnost klopov je odvisna od temperature in vlage. Ta dva dejavnika vplivata na vzorec sezonske aktivnosti klopov in s tem na sinhroni pojav larv in nimf. S tem je omogočeno sočasno hranjenje teh stadijev na gostiteljih in nesistemski prenos virusa.

Manj raziskan je pomen gostiteljev. V Sloveniji so specifična protitelesa proti virusu KME prisotna pri nekaj več kot pet odstotkih malih sesalcev. Prostorska študija je pokazala, da so tovrstne raziskave primerne za dokazovanje prisotnosti virusa na nekem območju. Novejše raziskave kažejo, da so mali gostitelji pomembni tudi pri ohranjanju virusa

KME na nekem območju. Tudi prisotnost velikih gostiteljev, to je jelenjadi in srnjadi, vpliva na spreminjanje incidence KME. V Sloveniji je gostota jelenjadi tista, ki značilno vpliva na incidenco KME. Treba je preveriti tudi ostale potencialne gostitelje in njihov vpliv na pojavnost KME.

Zadnja skupina dejavnikov, ki je pomembna za spremembe v pojavnosti KME, so dejavniki, na katere vpliva človek. Poseganje človeka v naravo, kot je na primer krčenje ali zaraščanje gozda, je pomembno, saj zagotavlja primeren teren za klope in gostitelje klopov. Človek vpliva na samo incidenco tudi s svojo aktivnostjo v naravi, ki omogoča stik med okuženim klopom in človekom. Na aktivnost v naravi vplivata tudi socialno-ekonomsko stanje prebivalstva in primerno vreme.

Veliko število dejavnikov, ki vpliva na prisotnost in intenziteto endemskih območij KME, kaže na to, kako kompleksni so dejavniki, potrebni za oblikovanje žarišča KME. Potrebne so nadaljnje raziskave, ki bodo omogočile natančno razumevanje življenjskega kroga virusa KME v naravi.

LITERATURA

1. Kunz C, Heinz FX. Tick-borne encephalitis. *Vaccine*. 2003; 21 Suppl 1: S1–2.
2. Bedjanic M, Rus S, Kmet J, et al. Virus meningo-encephalitis in Slovenia. *Bull World Health Organ*. 1955; 12 (4): 503–12.
3. Grešnikova M, Calisher CH. Tick-borne encephalitis. In: Monath T, ed. *The arboviruses: epidemiology and ecology*. Vol. 4. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1989. p. 177–202.

4. Nuttall P, Labuda M. Tick-borne encephalitis subgroup. In: Sonenshine DE, Mather TN, eds. Ecological dynamics of tick-borne zoonoses. New York/Oxford: Oxford University Press; 1994. p. 351-91.
5. Golovljova I, Katargina O, Geller J, et al. Unique signature amino acid substitution in Baltic tick-borne encephalitis virus (TBEV) strains within the Siberian TBEV subtype. *Int J Med Microbiol.* 2008; 298 Suppl. 1: 108-20.
6. Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet.* 2008; 371 (9627): 1861-71.
7. Donoso Mantke O, Schadler R, Niedrig M. A survey on cases of tick-borne encephalitis in European countries. *Euro Surveill.* 2008; 13 (17): pii: 18848.
8. Randolph S, Šumilo D. Tick-borne encephalitis in Europe: dynamics of changing risk. In: Takken W, Knols BGJ, eds. Emerging pests and vector-borne diseases in Europe: Wageningen: Wageningen Academic; 2007. p. 187-206.
9. Süss J. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond – the epidemiological situation as of 2007. *Euro Surveill.* 2008; 13 (26): pii: 18916.
10. Carpi G, Cagnacci F, Neteler M, et al. Tick infestation on roe deer in relation to geographic and remotely sensed climatic variables in a tick-borne encephalitis endemic area. *Epidemiol Infect.* 2008; 136 (10): 1416-24.
11. Süss J. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine.* 2003; 21 Suppl 1: S19-35.
12. Avšič Županc T, Knap N, Korva M, et al. Z vektorji preneseni virusni povzročitelji okužb osrednega živčevja. *Med Razgl.* 2009; 48 Suppl 5: 61-5.
13. Grgič - Vitek M, Klavs I. High burden of tick-borne encephalitis in Slovenia – challenge for vaccination policy. *Vaccine.* 2012; 29 (32): 5178-83.
14. Lindgren E, Gustafson R. Tick-borne encephalitis in Sweden and climate change. *Lancet.* 2001; 358 (9275): 16-8.
15. Randolph SE. The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001; 356 (1411): 1045-56.
16. Šumilo D, Bormane A, Vasilenko V, et al. Upsurge of tick-borne encephalitis in the Baltic States at the time of political transition, independent of changes in public health practices. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15 (1): 75-80.
17. Sonenshine DE. Biology of ticks. New York/Oxford: Oxford University Press; 1991. p. 2.
18. Korenberg EI, Kovalevskii YV. Main features of tick-borne encephalitis eco-epidemiology in Russia. *Zentralbl Bakteriol.* 1999; 289 (5-7): 525-39.
19. Lindgren E, Tälleklint L, Polfeldt T. Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environ Health Perspect.* 2000; 108 (2): 119-23.
20. Danielová V, Holubová J, Pejcoch M, et al. Potential significance of transovarial transmission in the circulation of tick-borne encephalitis virus. *Folia Parasitol (Praha).* 2002; 49 (4): 323-5.
21. Labuda M, Nuttall PA, Kozuch O, et al. Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature. *Experientia.* 1993; 49 (9): 802-5.
22. Knap N, Durmišič E, Saksida A, et al. Influence of climatic factors on dynamics of questing *Ixodes ricinus* ticks in Slovenia. *Vet Parasitol.* 2009; 164 (2-4): 275-81.
23. Gray J. The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. *Rev Med Vet Entomol.* 1991; 79 (6): 323-33.
24. Randolph SE, Storey K. Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission. *J Med Entomol.* 1999; 36 (6): 741-8.
25. Carpi G, Bertolotti L, Rosati S, et al. Prevalence and genetic variability of tick-borne encephalitis virus in host-seeking *Ixodes ricinus* in northern Italy. *J Gen Virol.* 2009; 90 (Pt 12): 2877-83.
26. Oehme R, Hartelt K, Backe H, et al. Foci of tick-borne diseases in southwest Germany. *Int J Med Microbiol.* 2002; 291 Suppl. 33: S22-9.
27. Süss J, Klaus C, Diller R, et al. TBE incidence versus virus prevalence and increased prevalence of the TBE virus in *Ixodes ricinus* removed from humans. *Int J Med Microbiol.* 2006; 296 Suppl 40: 63-8.
28. Durmišič E, Knap N, Saksida A, et al. Prevalence and molecular characterization of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovenia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011; 11 (6): 659-64.
29. Knap N. Poglavitni biotski, abiotski in antropogeni dejavniki za spremembe v incidenci klopnega meningoencefalitisa v Sloveniji [doktorska disertacija]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2011.
30. Kozuch O, Nosek J. Experimental transmission of tick-borne encephalitis (TBE) virus by *Haemaphysalis concinna* ticks. *Acta Virol.* 1980; 24 (5): 377.
31. Nosek J, Korolev MB, Chunikhin SP, et al. The replication and eclipse-phase of the tick-borne encephalitis virus in *Dermacentor reticulatus*. *Folia Parasitol (Praha).* 1984; 31 (2): 187-9.
32. Labuda M, Austyn JM, Zuffova E, et al. Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology.* 1996; 219 (2): 357-66.
33. Randolph SE, Green RM, Peacey MF, et al. Seasonal synchrony: the key to tick-borne encephalitis foci identified by satellite data. *Parasitology.* 2000; 121 (Pt 1): 15-23.

34. Pavlovsky EN. Natural nidality of transmissible diseases in relation to landscape epidemiology of zoonanthroposes. In: Buck C, Ilopis A, Najera E, et al., eds. *The challenge of epidemiology: issues and selected readings*. Washington: Pan American Health Organization; 1964. p. 401–5.
35. Randolph S, Chemini C, Furlanello C, et al. The ecology of tick-borne infections in wildlife reservoirs. In: Hudson PJ, Rizzoli A, Grenfell BT, eds. *The ecology of wildlife diseases*. New York: Oxford University Press; 2002. p. 119–38.
36. Labuda M, Kozuch O, Zuffová E, et al. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology*. 1997; 235 (1): 138–43.
37. Knap N, Korva M, Dolinsek V, et al. Patterns of tick-borne encephalitis virus infection in rodents in Slovenia. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2012; 12 (3): 236–42.
38. Weidmann M, Schmidt P, Hufert FT, et al. Tick-borne encephalitis virus in *Clethrionomys glareolus* in the Czech Republic. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2006; 6 (4): 379–81.
39. Achazi K, Nitsche A, Patel P, et al. Detection and differentiation of tick-borne encephalitis virus subtypes by a reverse transcription quantitative real-time PCR and pyrosequencing. *J Virol Methods*. 2011; 171 (1): 34–9.
40. Tonteri E, Jääskeläinen AE, Tikkaakoski T, et al. Tick-borne encephalitis virus in wild rodents in winter, Finland, 2008–2009. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17 (1): 72–5.
41. Labuda M, Elecková E, Licková M, et al. Tick-borne encephalitis virus foci in Slovakia. *Int J Med Microbiol*. 2002; 291 Suppl 33: S43–7.
42. Ostfeld RS, Canham CD, Oggenfuss K, et al. Climate, deer, rodents, and acorns as determinants of variation in lyme-disease risk. *PLoS Biol*. 2006; 4 (6): e145.
43. Vor T, Kiffner C, Hagedorn P, et al. Tick burden on European roe deer (*Capreolus capreolus*). *Exp Appl Acarol*. 2010; 51 (4): 405–17.
44. Jordan RA, Schulze TL, Jahn MB. Effects of reduced deer density on the abundance of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) and Lyme disease incidence in a northern New Jersey endemic area. *J Med Entomol*. 2007; 44 (5): 752–7.
45. Rizzoli A, Hauffe HC, Tagliapietra V, et al. Forest structure and roe deer abundance predict tick-borne encephalitis risk in Italy. *PLoS ONE*. 2009; 4 (2): e4336.
46. Perkins SE, Cattadori IM, Tagliapietra V, et al. Localized deer absence leads to tick amplification. *Ecology*. 2006; 87 (8): 1981–6.
47. Dobson A, Randolph S. Modelling the effects of recent changes in climate, host density and acaricide treatments on population dynamics of *Ixodes ricinus* in the UK. *J Appl Ecol*. 2011; 48 (4): 1029–37.
48. Haemig PD, Sjöstedt de Luna S, Grafström A, et al. Forecasting risk of tick-borne encephalitis (TBE): using data from wildlife and climate to predict next year's number of human victims. *Scand J Infect Dis*. 2011; 43 (5): 366–72.
49. Haemig PD, Lithner S, Sjöstedt De Luna S, et al. Red fox and tick-borne encephalitis (TBE) in humans: can predators influence public health? *Scand J Infect Dis*. 2008; 40 (6–7): 527–32.
50. Sumilo D, Asokliene L, Bormane A, et al. Climate change cannot explain the upsurge of tick-borne encephalitis in the baltics. *PLoS ONE*. 2007; 2 (6): e500.
51. Šumilo D, Bormane A, Asokliene L, et al. Socio-economic factors in the differential upsurge of tick-borne encephalitis in central and Eastern Europe. *Rev Med Virol*. 2008; 18 (2): 81–95.
52. Randolph SE. Tick-borne encephalitis incidence in Central and Eastern Europe: consequences of political transition. *Microbes Infect*. 2008; 10 (3): 209–16.
53. Randolph SE, Asokliene L, Avsic - Zupanc T, et al. Variable spikes in tick-borne encephalitis incidence in 2006 independent of variable tick abundance but related to weather. *Parasit Vectors*. 2008; 1 (1): 44.

Mateja Pate¹, Manca Žolnir - Dovč², Matjaž Ocepek³

Tuberkuloza kot zoonoza: pomen in diagnostika

Tuberculosis as a Zoonosis: Importance and Diagnostics

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: mikobakterije, ljudje, živali, okolje, prenos

Tuberkuloza pri ljudeh je še vedno ena od najpogostejših nalezljivih boleznih. Velja ocena, da sta z bacili tuberkuloze okuženi približno dve milijardi ljudi. Divje živali imajo pomembno vlogo v epidemiologiji tuberkuloze, ker predstavljajo naravni rezervoar bacilov tuberkuloze in vir okužbe za domače živali, bolezen pa se lahko (bodisi neposredno ali posredno) preneša z živali na ljudi, redkeje tudi obratno. V prispevku omenjamo nekaj vrst mikobakterij, ki so pomembne z vidika zoonoz (*Mycobacterium bovis*, *M. caprae*, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. marinum* in *M. genavense*), in podajamo pregled o teh vrstah pri ljudeh in živalih v Sloveniji. Ker še zdaleč ne poznamo vseh mikobakterij, ki nas obkrožajo in potencialno ogrožajo zdravje ljudi, domačih in divjih živali, se bo seznam mikobakterij, ki povzročajo zoonoze, v prihodnosti zagotovo še dopolnjeval. Na koncu prispevka podajamo tudi kratek opis laboratorijskih diagnostičnih metod za odkrivanje in identifikacijo omenjenih vrst mikobakterij.

ABSTRACT

KEY WORDS: mycobacteria, humans, animals, environment, transmission

Tuberculosis in humans is still one of the most frequent infectious diseases. Approximately two billion people are estimated to be infected with tubercle bacilli. Wildlife plays an important role in the epidemiology of tuberculosis, as it represents a natural reservoir of tubercle bacilli and a source of infection for domestic animals. Tuberculosis may directly or indirectly be transmitted from animals to humans, yet rarely vice versa. In this paper, some of the mycobacterial species which are important from the viewpoint of zoonoses are listed (*Mycobacterium bovis*, *M. caprae*, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. marinum* and *M. genavense*). An overview of these species in humans and animals in Slovenia is given. Our knowledge of mycobacteria, which are found in the environment and may potentially threaten the health of humans, domestic and wild animals, is limited. Therefore, we believe that the list of mycobacteria which may act as zoonotic agents will grow in the future. The paper ends with a short description of laboratory diagnostic methods for detection and identification of the aforementioned mycobacterial species.

¹ Dr. Mateja Pate, dr. vet. med., Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, 1000 Ljubljana

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

³ Dr. Matjaž Ocepek, dr. vet. med., Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, 1000 Ljubljana; matjaz.ocepek@vf.uni-lj.si

UVOD

Tuberkuloza (TB), ki jo povzročajo mikobakterije sklopa *Mycobacterium tuberculosis* (angl. *Mycobacterium tuberculosis complex*), je resna kronična bolezen ljudi in živali. V sklop *M. tuberculosis* sodijo vrste *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG (bacil Calmette-Guérin), *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. pinnipedii* in *M. caprae*. Divje živali imajo pomembno vlogo v epidemiologiji TB, ker marsikdaj predstavljajo naravni rezervoar bacilov TB in vir okužbe za domače živali, bolezen pa se lahko bodisi neposredno ali posredno prenese z živali na ljudi, redkeje tudi obratno.

Dovzetnost za mikobakterije omenjenega sklopa je pri različnih gostiteljih odvisna od načina izpostavljenosti, vrste mikobakterij, doze mikrobov in virulence seva. Ljudje, primati in morski prašički so zelo dovzetni za okužbo z mikobakterijami vrste *M. tuberculosis*. Po doslej znanih podatkih ta vrsta nima živalskega rezervoarja v naravi. Divji parkljarji so v splošnem dovzetni za okužbo z mikobakterijami vrste *M. bovis* in tako predstavljajo pomemben naravni (neposredni ali posredni) rezervoar za človeka. Poročila o okužbi divjih parkljarjev z mikobakterijami vrste *M. tuberculosis* so redka. Domače govedo, zajci in mačke so dovzetni za okužbo z mikobakterijami vrste *M. bovis* in precej odporni proti okužbi z mikobakterijami vrste *M. tuberculosis*. Prašiči in psi so dovzetni za okužbo tako z mikobakterijami vrste *M. bovis* kot z mikobakterijami vrste *M. tuberculosis* (1).

Mikobakterije vrste *M. caprae* so bile prvič izolirane pri kozah pred dobrim desetletjem (2). Odslej so jih ugotovili pri različnih živalih (govedo, jelenjad, domači in divji prašiči, bizoni, tigri, pume, kamele) in pri ljudeh. Sodeč po retrospektivnih raziskavah nekaterih izolatov iz ljudi in živali iz časa še pred opisom te vrste, ki so bili naknadno identificirani kot *M. caprae*, je možno, da so bile mikobakterije te vrste že v preteklosti pogosto povzročiteljice goveje TB, vendar zaradi pomanjkljivega znanja in laboratorijske diagnostike niso bile pravilno identificirane. Z mikobakterijami sklopa *M. tuberculosis* se lahko okužijo tudi živali v živalskih vrtovih (primati, sloni, eksotični parkljarji, mesojedi, morski sesalci, papi-

ge), ki bi naj bile dovzетnejše za takšno okužbo kot prosto živeče divje živali (3–5).

Med mikobakterijskimi vrstami, ki so pomembne s stališča zoonoz, je treba omeniti vsaj še tiste, ki povzročajo TB pri pticah in ribah. TB pri pticah po do sedaj znanih podatkih v večini povzročajo mikobakterije vrst *M. avium* in *M. genavense*, redkeje pa tudi vrste *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* ali *M. fortuitum* (6). Mikobakterije teh vrst prek okuženih ptic prehajajo v okolje (voda, zemlja), to pa predstavlja pomemben vir okužbe za človeka (predvsem za osebe z oslabljenim imunskim sistemom). Tuberkulozo pri ribah povzročajo mikobakterije vrste *M. marinum*, ki predstavljajo posredni ali neposredni vir okužbe za človeka. Namen našega prispevka je podati pregled mikobakterijskih vrst, ki lahko po doslej znanih podatkih neposredno ali posredno povzročajo zoonoze pri človeku, ter na kratko opisati metode laboratorijske diagnostike teh vrst mikobakterij.

MYCOBACTERIUM BOVIS IN MYCOBACTERIUM CAPRAE

Mikobakterije vrst *M. bovis* in *M. caprae* povzročajo govejo TB, ki je razširjena po vsem svetu in še vedno povzroča znatne ekonomske izgube v državah, v katerih ni izkoreninjena. Goveja TB je pomembna s socialno-ekonomskega vidika in z vidika javnega zdravja, vpliva pa tudi na mednarodni promet z živalmi in njihovimi proizvodi. Večina razvitih držav je zato uvedla programe za izkoreninjenje bolezni oziroma za nadzor nad širjenjem okužbe, katerih uspešnost je različna. Incidenca goveje TB se je po končanih programih v večini srednjeevropskih držav močno znižala. Ker pa so za okužbo z mikobakterijami vrst *M. bovis* in *M. caprae* dovzетne tudi druge vrste domačih in divjih živali, širok spekter gostiteljev otežuje prizadevanja za nadzor in izkoreninjenje bolezni pri govedu (7).

V Sloveniji smo pogoje za status države proste goveje TB dosegli tako rekoč že leta 1973. Od takrat delež v tuberkulinskem testu pozitivnih čred oziroma živali ni bil večji od 0,8% oziroma 0,7%. Uradno pa je naša država, zaradi v preteklosti neustreznega označevanja živali, prosta goveje TB šele od leta 2009. V zadnjih dveh desetletjih je bil

z bakteriološko preiskavo potrjen le en primer goveje TB pri govedu slovenskega izvora. Vendar se tako ugodna situacija lahko že v kratkem spremeni, saj so bile z vstopom v Evropsko unijo (EU) odpravljene karantene ob uvozu živali. Za primerno zdravstveno stanje uvoženih živali jamči prodajalec. Tako v letošnjem letu že beležimo primer TB, povzročene z bacili *M. caprae* v reji, ki jo sestavljajo izključno živali, uvožene iz novejšje članice EU, v kateri imajo visoko prevalenco goveje TB.

Tuberkuloza pri ljudeh je še vedno ena od najpogostejših nalezljivih bolezní. Velja oceniti, da sta z bacili TB okuženi približno dve milijardi ljudi, ki so pomemben rezervoar aktivne oblike bolezní. Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) je bilo v letu 2010 na svetu med 8,5 in 9,2 milijona bolnikov s TB, zaradi te bolezní pa je umrlo od 1,2 do 1,5 milijona oseb (8). To je še vedno veliko, saj je TB v večini primerov ozdravljiva

bolezen, če jo odkrijemo dovolj zgodaj. TB pri ljudeh največkrat povzročajo mikobakterije vrste *M. tuberculosis*, redkeje pa mikobakterije vrst *M. africanum*, *M. canetti*, *M. bovis* in *M. caprae*, zlasti v državah v razvoju, v katerih je goveja TB prisotna v večjem obsegu in v katerih je veliko ljudi, okuženih z virusom humane imunske pomanjkljivosti (angl. *human immunodeficiency virus*, HIV). Tako so v Sloveniji v obdobju 1990–2010 TB pri ljudeh v 99,89% povzročili bacili *M. tuberculosis* in samo pri sedmih bolnikih (0,11%) druge mikobakterije sklopa *M. tuberculosis* (tabela 1). Mikobakterije vrste *M. caprae* so povzročile TB pri štirih bolnikih in vrste *M. bovis* samo pri enem bolniku (v letu 1992). Vsi ti bolniki so bili ob diagnozi stari preko 80 let in so se z bacili goveje TB verjetno okužili v mladosti, ko je bila goveja TB še pogostejša. V dveh primerih so TB pri ljudeh v omenjenem obdobju povzročile mikobakterije vrste

Tabela 1. Tuberkuloza, potrjena s kultivacijo pri bolnikih v Sloveniji v obdobju 1990–2010 glede na vrsto mikobakterij iz sklopa *M. tuberculosis*. BCG – bacil Calmette-Guérin, NN – neznan število.

Leto	Diagnoza tuberkuloza, potrjena s kultivacijo				
	Število bolnikov	Vrsta mikobakterij			
		<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. caprae</i>	<i>M. bovis</i> BCG
1990	419	419	0	0	NN
1991	363	363	0	0	NN
1992	388	387	1	0	NN
1993	420	420	0	0	NN
1994	334	334	0	0	NN
1995	345	345	0	0	NN
1996	423	423	0	0	0
1997	356	356	0	0	0
1998	346	346	0	0	0
1999	352	352	0	0	0
2000	320	320	0	0	0
2001	308	307	0	1	0
2002	292	292	0	0	0
2003	259	258	0	0	1
2004	231	231	0	0	0
2005	245	245	0	0	0
2006	184	183	0	1	0
2007	189	187	0	2	0
2008	201	201	0	0	0
2009	179	179	0	0	0
2010	155	155	0	0	0
Skupno število (%)	6.310 (100,00)	6.303 (99,89)	1 (0,02)	4 (0,06)	1 (0,015)

M. bovis BCG. Pasterizacija mlečnih izdelkov, stremenje k izkoreninjenju goveje TB ter nadzor okužb divjih živali so najpomembnejši ukrepi za varovanje zdravja ljudi pred govejo TB.

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Mikobakterije vrste *M. tuberculosis* sicer primarno povzročajo TB pri ljudeh (v Sloveniji v 99,89%), vendar so opisani tudi številni primeri okužb in celo bolezni pri različnih domačih in divjih živalih. V večini primerov gre za živali, ki dolgo časa živijo v tesnem stiku z obolelimi osebami, čeprav je bila okužba z mikobakterijami vrste *M. tuberculosis* opisana tudi pri prosto živčih divjih živalih (3, 9). Mikobakterije vrste *M. tuberculosis* naj med živalmi ne bi imele primarnega gostitelja ali rezervoarja; živali, ki se okužijo, so najverjetneje naključni gostitelji (10). Zato danes velja, da naj bi ljudje z aktivno TB predstavljali glavni vir okužbe za živali, pri katerih se občasno lahko razvije klasična oblika TB (10).

Med domačimi živalmi je bila okužba z mikobakterijami vrste *M. tuberculosis* največkrat opisana pri govedu (10). Še zlasti veliko tovrstnih okužb živali je v državah z visoko incidenco človeške TB, npr. na Kitajskem (11). Neposreden dokaz prenosa bolezni med obolelim lastnikom živali in govedom, ki je temeljil na moderni genotipizacijski metodi, smo kot prvi v svetu opisali v Sloveniji ob odličnem sodelovanju strokovnjakov z medicinskega in veterinarskega področja (12).

Med domačimi živalmi so zlasti znani primeri okužb psov. V nedavnem poročilu iz Južne Afrike, kjer je pogostost TB pri ljudeh med najvišjimi v svetu (600/100.000), navajajo, da so pri 1% preiskanih psov, ki so živeli z osebami, obolelimi za TB, ugotovili klinično zaznavno TB, pri kar 50% psov pa so v imunološkem testu dokazali okužbo z bacili TB (13). Opisan je tudi prenos okužbe z mikobakterijami vrste *M. tuberculosis* s psa na ljudi, ki se je zgodil med obdukcijo živali z diseminirano TB (14). Še bolj zanimiv pa je primer, pri katerem se je TB prek psa, ki se je okužil z mikobakterijami vrste *M. tuberculosis* pri prejšnjem lastniku, prenesla na otroka novih lastnikov živali (15). Znano je, da se lahko z mikobak-

terijami vrste *M. tuberculosis* okužijo tudi papige, vendar pa v takih primerih povratna okužba ljudi še ni bila opisana. Med divjimi živalmi pa so za okužbe z mikobakterijami vrste *M. tuberculosis* močno dovzetni sloni v živalskih vrtovih (3).

MYCOBACTERIUM MARINUM

Tuberkuloza rib, ki jo povzročajo mikobakterije vrste *M. marinum*, je pogosto spregledana in podcenjena zoonoza, ki se pojavlja predvsem pri ljudeh, ki imajo ljubiteljsko ali poklicno opraviti z ribami, npr. pri akvaristih, ribičih, kopalcih v morju, rekah, jezerih, ipd. (16). V večini primerov okužb z mikobakterijami vrste *M. marinum* nastanejo po določenem času kožne spremembe na mestih predhodno poškodovane kože (največkrat okončin), ki se razvijejo v t. i. kožno mikobakteriozo. Lahko se pojavijo tudi sekundarne lezije vzdolž limfnih poti, tendosinovitis in osteomielitis. Zdravljenje poteka s kombinacijo več antibiotikov, v primeru prizadetosti globljih tkiv pa je potreben kirurški poseg.

V Sloveniji vsako leto dokažemo nekaj primerov mikobakterioz, povzročenih z mikobakterijami vrste *M. marinum*, pri ljudeh. Za večino od njih je značilna dolga pot do postavitve končne diagnoze in ozdravitve, kar pomeni, da o možnosti te mikobakterioze še pre malo razmišljamo. Eden takšnih slovenskih primerov je podrobno opisan (17). V nedavno končani raziskavi o prisotnosti mikobakterij pri akvarijskih ribah v Sloveniji smo mikobakterije vrste *M. marinum* ugotovili pri 10 od 102 preiskanih ribah, medtem ko smo pred leti poročali, da je bila približno petina preiskanih rib (6/29) okužena z omenjeno vrsto (18).

MYCOBACTERIUM AVIUM

Mikobakterije vrste *M. avium* lahko živijo prosto v naravi in se tam tudi razmnožujejo: zemlja, voda, stelja in krmila predstavljajo možen vir okužbe za različne vrste živali ter za ljudi (19). Pri domači perutnini in drugih pticah mikobakterije vrste *M. avium* povzročajo aviarno TB, druga obolenja – mikobakterioze – pa pri številnih drugih vrstah divjih in domačih živali. Pri prašičih okužbe z mikobakterijami vrste *M. avium* predstavljajo veli-

ko večino vseh okužb z mikobakterijami, pri ljudeh pa so – med pogojno patogenimi mikobakterijami – najpomembnejši vzrok mikobakterioz. Kot vir okužbe za ljudi navajajo predvsem vodo, pa tudi zemljo in živali, predvsem ptice in prašiče (20).

V razvitih državah sveta in tudi v Sloveniji, kjer se pogostost TB zmanjšuje, se povečuje število mikobakterioz, ki jih povzročajo netuberkulozne mikobakterije. Vzrokov za to je več, najpomembnejši pa je zagotovo naraščanje števila oseb z oslabljenim imunskim sistemom (21). V naši državi so tako v obdobju 2000–2011 klinično pomembne mikobakterioze najpogosteje povzročili bacili vrste *M. kansasii*, sledita pa vrsti *M. avium* in *M. intracellulare* (22). Delež mikobakterioz, povzročen z mikobakterijami vrste *M. avium*, v naši državi narašča predvsem zaradi novega pojava bezgavčnih mikobakterioz pri otrocih. Vzrok za to je pričakovan, saj smo leta 2005 ukinili obvezno cepljenje novorojenčkov s cepivom BCG (22).

Pri živalih so bile mikobakterije vrste *M. avium* v obdobju 2000–2011 daleč največkrat izolirane pri domačih prašičih ($n = 157$, večina do leta 2003, ko je bil ukinjen obvezen pregled črevesnih bezgavk prašičev na TB), sledijo govedo ($n = 10$), kokoši ($n = 5$) in papige ($n = 4$). V zadnjih dveh letih beležimo posamezne okužbe pri različnih vrstah domačih in divjih živali (gos, udav, slon, damjak, jelen).

MYCOBACTERIUM GENAVENSE

Ta vrsta je bila opisana šele leta 1993. Prvi primer (in nato še precej podobnih) je bil opisan pri bolnikih z aidsom, pozneje tudi pri bolnikih s presajenimi organi, pri katerih ta mikobakterija najpogosteje povzroči diseminirano obliko bolezni. V istem letu so bili objavljeni tudi prvi dokazi o tem, da lahko ta vrsta povzroči tudi TB pri pticah – domačih ljubljenceh (23). Zanimivo je, da mikobakterija ne raste na trdih gojiščih, pač pa zahteva obogatena tekoča gojišča, kar je verjetno tudi najpomembnejši vzrok, da je bila odkrita tako pozno.

Danes je nesporno jasno, da mikobakterije vrste *M. genavense* najdemo v okolju (voda, zemlja, iztrebki ptic) in da zanesljivo poleg drugih vrst mikobakterij povzroča TB pri

pticah. Še posebno pogosta bi naj bila pri pticah – hišnih ljubljenceh, pri katerih povzroča večino mikobakterijskih okužb (tudi do 80%). Tudi pri pticah lahko povzroči diseminirano obliko bolezni, ki jo na podlagi morfoloških patohistoloških preiskav ne moremo ločiti od sprememb, povzročenih z mikobakterijami vrste *M. avium*. V literaturi so opisani tudi primeri okužbe drugih hišnih ljubljencev (pes, mačka) (6).

Prvi klinično pomemben izolat vrste *M. genavense* pri ljudeh smo v letošnjem letu osamili tudi v Laboratoriju za mikobakterije Klinike Golnik, in sicer pri bolniku z aidsom. Mikobakterija je porasla iz kostnega mozga. Pri živalih mikobakterij omenjene vrste v Sloveniji za zdaj še nismo ugotovili.

DIAGNOSTIKA

Humana medicina loči med okužbo z bacili TB (latentna TB) in boleznijo (aktivna TB). Sodobna gama interferonska testa QuantiFERON TB Gold (Cellestis, Victoria, Avstralija) in T-SPOT. TB (Oxford Immunotec, Oxford, Velika Britanija) sta v zadnjih letih povsem zamenjala več kot 100 let star tuberkulinski kožni test za ugotavljanje latentne TB. Za dokazovanje aktivne TB in ostalih mikobakterioz pa tudi v 21. stoletju ostaja zlati standard kultura na različnih gojiščih (tekočih in trdih, inkubacija gojišč pri različnih temperaturah). Pri najbolj kužnih bolnikih bakterije še vedno odkrijemo z mikroskopskim pregledom, pa tudi s testi pomnoževanja nukleinskih kislin (24).

Učinkovit nadzor goveje TB pri živih živalih temelji na ugotavljanju okužbe v zgodnjem stadiju z uporabo občutljivih imunodiagnostičnih testov. Trenutno se v EU uporabljata dva testa: *in vivo* tuberkulinski (kožni) test in *in vitro* test, ki temelji na interferonu gama. S prvim odkrivamo reakcijo pozne preobčutljivosti na vbrižgani tuberkulin pri živali, z drugim pa z encimskim imunskim testom (angl. *enzyme linked immunosorbent assay*, ELISA) ugotavljamo sproščanje interferona gama kot posledico stimulacije limfocitov s tuberkulinom.

Klasična posmrtna diagnostika goveje TB kot tudi ugotavljanje drugih vrst mikobakterij temeljita na osamitvi povzročitelja na

umetnih gojiščih. Poleg ugotavljanja morfoloških in biokemijskih lastnosti izolatov so nam že skoraj dve desetletji tako v humani kot veterinarski medicini v veliko pomoč različni molekularni testi. Z njimi neposredno dokazujemo bacile TB v kužninah, si pomagamo pri hitrejšem odkrivanju in identifikaciji mikobakterijskih vrst, pri testiranju občutljivosti ter na področju molekularne epidemiologije (spremljanje prenosa bacilov med bolniki).

ZAKLJUČEK

Seznam mikobakterij, ki povzročajo boleznitako pri človeku kot pri živalih in jih zato lah-

ko štejejo med povzročiteljice zoonoz, je vedno daljši. Vzrokov za to je več. Po eni strani znanstveniki vsako leto odkrijejo nekaj novih vrst mikobakterij, po drugi strani pa zaradi napredka medicine in veterine narašča število imunsko oslabljenih ljudi in živali, bolj dovzetnih za pogojno patogene mikrobe. Poleg tega še zdaleč ne poznamo vseh mikobakterij, ki nas obkrožajo in lahko ogrožajo zdravje ljudi, domačih in divjih živali. Zato se bo seznam mikobakterij, ki povzročajo zoonoze, v prihodnosti zagotovo še dopolnjeval.

LITERATURA

1. LoBue PA, Enarson DA, Thoen CO. Tuberculosis in humans and animals: an overview. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2010; 14 (9): 1075-8.
2. Aranaz A, Cousins D, Mateos A, et al. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003; 53 (Pt 6): 1785-9.
3. Montali RJ, Mikota SK, Cheng LI. *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species. *Rev Sci Tech.* 2001; 20 (1): 291-303.
4. Pavlik I, Trcka I, Parmova I, et al. Detection of bovine and human tuberculosis in cattle and other animals in six central European countries during the years 2000-2004. *Vet Med Czech.* 2005; 50: 291-9.
5. Thoen CO, Steele JH, Gilsdor MJ. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. 2nd ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing; 2006. p. 329.
6. Dhama K, Mahendran M, Tiwari R, et al. Tuberculosis in birds: insights into the *Mycobacterium avium* infections. *Vet Med Int.* 2011; 2011: 712369.
7. Cousins DV. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev Sci Tech.* 2001; 20 (1): 71-85.
8. World Health Organization. WHO report 2011: global tuberculosis control. WHO: Geneva; 2011.
9. Alexander KA, Pleydell E, Williams MC, et al. *Mycobacterium tuberculosis*: an emerging disease of free-ranging wildlife. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8 (6): 598-601.
10. Steele JH. Human tuberculosis in animals. In: Steele JH, ed. CRC handbook series in zoonoses. Section A: bacterial, rickettsial and mycotic diseases. Vol. 2. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc; 1979. p. 141-159.
11. Chen Y, Chao Y, Deng Q, et al. Potential challenges to the Stop TB Plan for humans in China; cattle maintain *M. bovis* and *M. tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb).* 2009; 89 (1): 95-100.
12. Ocepek M, Pate M, Zolnir-Dovc M, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from human to cattle. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (7): 3555-7.
13. Parsons SD, Warren RM, Ottenhoff TH, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in dogs in a high-risk setting. *Res Vet Sci.* 2012; 92 (3): 414-9.
14. Posthaus H, Bodmer T, Alves L, et al. Accidental infection of veterinary personnel with *Mycobacterium tuberculosis* at necropsy: a case study. *Vet Microbiol.* 2011; 149 (3-4): 374-80.
15. Vela AI, Simarro I, de Juan L, et al. A propósito de un caso de tuberculosis canina. *Prof Vet.* 2001; 49: 48-53.
16. Ang P, Rattana-Apiromyakij N, Goh CL. Retrospective study of *Mycobacterium marinum* skin infections. *Int J Dermatol.* 2000; 39 (5): 343-7.
17. Dolenc - Voljč M, Žolnir - Dovč M. Delayed diagnosis of *Mycobacterium marinum* infection: A case report and review of the literature. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.* 2010; 19 (2): 35-9.
18. Pate M, Jenčič V, Žolnir - Dovč M, et al. Detection of mycobacteria in aquarium fish in Slovenia by culture and molecular methods. *Dis Aquat Organ.* 2005; 64 (1): 29-35.
19. Kazda J. The principles of the ecology of mycobacteria. In: Ratledge C, Stanford JL, eds. *The biology of the mycobacteria.* Vol. 1. London: Academic Press; 1983. p. 53-94.

20. Inderlied CB, Kemper CA, Bermudez LE. The *Mycobacterium avium* complex. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6 (3): 266-310.
21. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175 (4): 367-416.
22. Žolnir - Dovč M, Fajtar N, Petrovič Ž, et al. Nontuberculous mycobacteria in Slovenia – before and after stopping mandatory BCG vaccination. In: Niemann S, ed. ESM 2012. Scientific Program including Abstracts of the 33rd Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology; 2012 July 1-4; Brasov, Romania. Werne: Agentur Konsens; 2012. p. 92.
23. Bottger EC, Hirschel B, Coyle MB. *Mycobacterium genavense* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1993; 43 (4): 841-3.
24. Žolnir - Dovč M, Bidovec - Stojković U. Laboratorijska diagnostika in molekularna epidemiologija tuberkuloze. In: Beović B, Strle F, Tomažič J, eds. Okužbe pri starostnikih: novosti. Infektološki simpozij; 2010 Mar 26-27; Ljubljana, Slovenija. Ljubljana: Sekcija za protimikrobno zdravljenje SZD: Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center: Katedra za infekcijske bolezni in epidemiologijo MF; 2010. p. 197-203.

Emil Pal¹

Klinična obravnava bolnika s sumom na leptospirozo ali hemoragično mrzlico z renalnim sindromom

*Clinical Approach to Patients with Suspected Leptospirosis
or Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome*

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: leptospiroza, hemoragična mrzlica z renalnim sindromom, virus Puumala, virus Dobrava, diagnoza

Hemoragična mrzlica z renalnim sindromom in leptospiroza sta pomembni bolezni, ki sta prisotni v Sloveniji. Zaradi pestrosti kliničnih simptomov in znakov sta pogosto spregledani. Dobro poznavanje epidemioloških podatkov, klinične slike in ustrezno zdravljenje lahko pomembno vplivajo na izhod bolezni. Zgodnje zdravljenje z antibiotiki lahko prepreči težji potek leptospiroze.

ABSTRACT

KEY WORDS: leptospirosis, hemorrhagic fever with renal syndrome, Puumala virus, Dobrava virus, diagnosis

Hemorrhagic fever with renal syndrome and leptospirosis are important diseases. They are also present in Slovenia. However, due to their diverse clinical symptoms and signs, they are often overlooked. Good knowledge of epidemiological data, clinical picture and appropriate treatment may significantly affect the outcome of the disease. Early treatment with antibiotics can prevent a severe course of leptospirosis.

¹ Mag. Emil Pal, dr. med., Splošna bolnišnica Murska Sobota, Ulica dr. Vrbnjaka 6, 9000 Murska Sobota; emilpal9@gmail.com

UVOD

Leptospiroza in hemoragična mrzlica z renalnim sindromom (HMRS) sta zoonozi, ki se endemsko pojavljata v Sloveniji (1–3). Obe boleznii imata lahko zelo podoben potek in epidemiološke značilnosti (1, 3, 4–6). Okužbe s hantavirusi pri ljudeh beležimo po vsej državi, največ v endemskih področjih Ljubljane z okolico, Dolenjske in Prekmurja (Avšič - Županc, Korva, neobjavljeni podatki). Tri četrtine slovenskih bolnikov z leptospirozo prihaja iz Pomurja (2).

V Sloveniji HMRS povzročata virusa Puumala (PUU) in Dobrava (DOB) (1, 7–9). Blažje oblike boleznii so običajno posledica okužb z virusom PUU, medtem ko je potek boleznii po okužbi z virusom DOB navadno težji s smrtnostjo okoli 8% (1, 9–11). Obe boleznii se pojavljata spomladi, poleti in v zgodnji jeseni (1, 2, 12). V letu 2012 smo zabeležili do sedaj največjo epidemijo HMRS v Sloveniji. Zbolelo je več kot 150 bolnikov (Avšič - Županc, Korva, neobjavljeni podatki, julij 2012). Epidemije HMRS se pojavljajo ob porastu populacije malih glodavcev. Dejavniki tveganja za okužbo so povezani s poklicem in življenjskim slogom. Najpogosteje zbole vajo osebe, ki so pri svojem delu izpostavljene glodavcem in njihovim izločkom (1, 2). Človek se okuži z vdihovanjem kužnega aerosola izločkov glodavcev (hantavirusi) ali z neposrednim oziroma s posrednim stikom z okuženo živaljo in njenimi izločki (leptospiromi). V vodi in zemlji lahko leptospire preživijo tudi več tednov (13). Leptospiromi pri neposrednem stiku vstopijo v telo skozi poškodovano (izjemoma tudi skozi nepoškodovano) kožo ali prodrejo skozi sluznico očesne veznice (2, 14). Opisani so tudi primeri dvojnih okužb s hantavirusi in z leptospirami (15, 16). Pri patogenezi HMRS in leptospiroz ima pomembno vlogo okvara endotelijskih celic (10, 17, 18).

KLINIČNE ZNAČILNOSTI LEPTOSPIROZ

Klinična slika leptospiroz je pri ljudeh zelo pestra. Večina okužb poteka brez simptomov kot kratkotrajno vročinsko stanje (18). Od 85 do 90% primerov boleznii je blagih in izzveni spontano. Možen je tudi težji klinični potek

z zlatenico, akutno ledvično odpovedjo, prizadetostjo pljuč, krvavitvami in večorgansko odpovedjo (Weilov sindrom) (2, 19–23).

Leptospiroza ima običajno dve fazi. Inkubacija traja večinoma 1–2 tedna, z razponom od 2–26 dni (2). Akutni septikemični fazi, ki traja teden dni, sledi imunska faza boleznii, s pojavom protiteles v krvi in izločanjem leptospir v seču (2, 18, 20, 24). Imunska faza traja 1–30 dni (25). Le manjši delež okužb z leptospirami, a večina prepoznanih, nastopi nenadno, z močno povišano telesno temperaturo z mrzlicami, splošno prizadetostjo, glavobolom, bolečinami v trebuhu, retrobulbarno in s fotofobijo. Bolečine v mišicah in sklepih so lahko zelo močne. Najizrazitejše so v mečih, stegnih in ledveno (2, 14, 18). Episkleralno injiciranost oči so opisovali pri 40–97% obolelih, v Pomurju v 40% (13, 18). Pogosto so pridruženi slabost, bruhanje, bolečine v trebuhu in driska. Bolniki lahko tudi kašljajo.

V drugi fazi leptospiroze, ki običajno nastopi v drugi polovici prvega tedna boleznii, se pojavijo znaki prizadetosti različnih organov. Najpogosteje so prizadeta jetra, ledvice, možganske ovojnice, mišice, srce, pljuča, koža in ožilje. Po naših izkušnjah ima približno polovica bolnikov z leptospirozo serozni meningitis (13, 14). Ta se najpogosteje pojavi od 5. do 6. dne boleznii (z razponom od 1. do 29. dne). Znaki meningitisa so lahko jasno izraženi z glavobolom, bruhanjem, vročino, otrplostjo tilnika ali pa so prisotni samo posamezni znaki. Povečane vrednosti levkocitov v likvorju lahko ugotovimo tudi v odsotnosti znakov meningitisa (2, 13). Izpuščaji, ki so lahko makulozni, papulozni, podobni koprivnici ali hemoragični, se pri večini bolnikov pojavijo od 4. do 7. dneva boleznii (13). Običajno izzvenijo v 24 urah (18). Krvavitve se lahko pojavijo v različnih organih ali telesnih votlinah, običajno po 5. dnevu boleznii, redkeje tudi v obdobju okrevanja (2, 13, 18).

V laboratorijskih izvidih so prisotni znaki jetrne in ledvične okvare s povečanimi vrednostmi bilirubina, transaminaz in kreatinina v serumu (hepatorenalni sindrom). V seču ugotovimo prisotnost beljakovin, levkocitov, eritrocitov, hialinih oz. granuliranih cilindrov. Število levkocitov v krvi je lahko normalno, povečano ali zmanjšano. Prevladujejo nevtrofilci. Hitrost sedimentacije eritrocitov je pos-

pešena (2). Vrednosti prokalcitonina in C-reaktivnega proteina so povečane (26). Značilna je trombocitopenija. Prisotna je v polovici primerov leptospiroze in sovпада s pojavom prizadetosti ledvic (20). Akutna ledvična odpoved je prisotna v 16–40% primerov. Večinoma je neoligurična (20). Pri znakih prizadetosti osrednjega živčevja ugotavljamo v likvorju blago povišane vrednosti celic s prevlado limfocitov in običajno normalne vrednosti sladkorja in beljakovin (2).

Pljučno obliko leptospiroze opisujejo v 20–70% primerov bolezni. Kaže se s kašljem, dispnejo, bolečinami v prsnem košu, hemoptizami. V ospredju so znaki krvavitve v pljučih. Lahko je hitro napredujoča z znaki dihalne stiske, spremembami v plinski analizi arterijske krvi (respiratorna alkalozna, hipoksemija, metabolna acidoza). Večinoma teža pljučne prizadetosti ni v sorazmerju s stopnjo zlatenice (25).

Zlatenična oblika leptospiroze (Weilov sindrom) poteka s težjo klinično sliko in lahko hitro napreduje, s smrtnostjo od 5 do 20% (18, 23). Vrednosti bilirubina v krvi so lahko tudi 10–20-krat nad normalno. Ob izraziti zlatenici, ki ni posledica nekroze hepatocitov, so vrednosti transaminaz le zmerno povečane (13). Zapleti kažejo sistemsko naravo bolezni. Leptospiroza lahko v nosečnosti povzroči okužbo ploda in znotrajmaternično smrt (23).

Bolezen je treba potrditi z mikrobiološkimi preiskavami. Najpogosteje uporabljamo test mikroaglutinacije z živimi leptospirami. Izvidi testa so ob prvem stiku z bolnikom pogosto negativni. Za potrditev diagnoze je treba odvzeti parna seruma v razmiku 10–14 dni. Protitelesa v krvi se pričnejo pojavljati 5.–7. dan po pojavu simptomov bolezni. Z začetkom drugega tedna bolezni lahko poskušamo leptospire osamiti iz seča. Pozitiven izvid osamitve leptospir iz krvi lahko prejmemo, še preden nam uspe potrditi okužbo s serološkimi metodami. V primeru težjega poteka z zgodnjim smrtnim izhodom so pozitivne osamitve iz krvi lahko edini dokaz okužbe. Za hitro diagnostiko leptospiroze lahko uporabimo metodo verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) (2, 27).

Zdravilo izbora za zdravljenje leptospiroze je penicilin. Na začetku bolezni ni mogoče napovedati, v kakšni obliki bo leptospiroza

potekala. Zato priporočajo pri vseh bolnikih zdravljenje z 12 milijoni IE penicilina, razdeljenega v šest odmerkov, sedem dni, ne glede na čas, ki je pretekel od začetka bolezni. S takšnimi odmerki dosežemo nagel padec vročine in izboljšanje splošnega stanja. Preprečimo tudi nastanek meningitisa in pozne zaplete na očeh, ki jih neposredno povzročajo leptospire. Pričakujemo tudi zmanjšanje ali preprečitev poznih, verjetno avtoimunskih zapletov. Pri bolnikih, ki so preobčutljivi za penicilin, priporočamo zdravljenje s tetraciklini (13). Ceftriakson se je v raziskavah izkazal za enakovrednega penicilinu (28, 29).

KLINIČNI POTEK HEMORAGIČNE MRZLICE Z RENALNIM SINDROMOM

Hemoragična mrzlica z renalnim sindromom se običajno kaže kot večsistemska bolezen. V patogenezi sodeluje imunski odziv gostitelja, moteno delovanje trombocitov in okvarjena funkcija endotelija. Preučevali so vlogo CD8+ T celic, dejavnika tumorske nekroze α (angl. *tumor necrosis factor α* , TNF- α), vnetnih citokinov, β 3-integrinov, viremije, aktivacije komplementnega sistema, disfunkcije trombocitov, tkivnih antigenov, humanih levkocitnih antigenov (HLA) (10, 11). Izsledki raziskav so si bili večkrat nasprotujoči. Pri HMRS je primarno mesto razmnoževanja virusa žilni endotelij malih krvnih žil (30). Velika večina okužb je asimptomatskih ali z blago izraženimi bolezenskimi znaki (1).

Inkubacijska doba je običajno 2–4 tedne, lahko pa vse od nekaj dni do dveh mesecev. Hemoragična mrzlica z renalnim sindromom značilno poteka v petih fazah (vročinska, hipotenzivna, oligurična, poliurična in faza okrevanja), ki pa niso vedno vse klinično izražene (tabela 1) (9, 31).

Za prvo, vročinsko fazo so značilni znaki splošne prizadetosti, ki ji sledijo znaki prizadetosti ledvic in drugih organov oziroma organskih sistemov (jetra, dihala, prebavila, osrednje živčevje) (4). Bolezen nastopi nenadno, z gripi podobnimi znaki, z močno povišano telesno temperaturo, mrzlicami, splošno prizadetostjo, glavobolom, zaspanostjo. Bolniki imajo močne bolečine ledveno, v hrbtu in trebuhu. Že prve dni bolezni ugotovimo

injicirane konjunktive, rdečino lic, vratu in zgornjega dela trupa. Ostali znaki krvavitve, ki so v prvi fazi običajno blagi, nastopijo 3.–5. dan bolezni (4). Kažejo se v obliki petehij, manjših krvavitve iz prebavil, sluznic in hematurije. V tej fazi so pomemben znak bolezni motnje vida z akutno miopijo (1). Po drugem dnevu bolezni se pridružijo znaki prizadetosti prebavil z bolečinami v spodnjem delu trebuha, slabostjo, bruhanjem in drisko. Trajajo 3–7 dni. Polovica bolnikov ima znake prizadetosti dihal (izcedek iz nosu, blažje bolečine v žrelu, suh kašelj, hripavost) (4). V laboratorijskih izvidih izstopajo trombocitopenija, proteinurija, eritrociturija in cilindri v sedimentu seča. Najnižje vrednosti trombocitov opažamo ob koncu vročinske faze (32).

Hipotenzivna faza nastopi hitro s padcem krvnega tlaka in traja od nekaj ur do dva dni. V hujših primerih bolezni lahko nastopijo znaki šoka, tudi smrt. V krvni sliki se pojavi levkocitoza s pomikom v levo. Naraščajo vrednosti sečnine in kreatinina. Patološki so jetrni testi, predvsem alanin aminotransferaze (ALT). Povečane so tudi vrednosti prokalcitonina (33). Spremljajo jih trombocitopenija in proteinurija, ki sta se pojavili že prej. Osnovni mehanizem je okvara endotelija s povečano prepustnostjo žilja (angl. *vascular leak syndrome*). Prisotna je hemokonzentracija z znižanimi vrednostmi hematokrita (30).

Po 3–4 dneh (običajno v začetku drugega tedna bolezni) se pojavi oligurična faza bolezni. Prevladujejo znaki odpovedi ledvic z oligurijo, anurijo. Vrednosti kreatinina dosežejo najvišje vrednosti. Pri bolnikih s težjim

potekom bolezni je potrebno začasno nadomestno zdravljenje s hemodializo. Bolniki imajo hude bolečine po celem telesu, najizrazitejše v hrbtu in trebuhu. Pojavijo se motnje elektrolitskega, tekočinskega in kislinsko-bazičnega ravnovesja. Lahko nastopijo blažje krvavitve, ki se kažejo kot petehije po koži in sluznicah, subkonjunktivalne krvavitve ter tudi obsežne krvavitve (hemoptize, hematemeza, melena, hematurija, možganske krvavitve). Opažamo zaplete v osrednjem živčevju (dezorientacija, somnolenca, halucinacije, epileptični napadi, nemir) in pljučih (plevralni izliv, pljučni edem, sekundarne bakterijske okužbe) (4, 34). Pri 41 % (7/17) bolnikov v Pomurju, okuženih s PUU, smo ugotovili sinusno bradikardijo, ki se je pojavila v oligurični fazi HMRS (1).

Sledi poliurična (diuretična) faza, kjer se ledvična funkcija postopoma izboljšuje. Bolniki izločajo obilne količine seča (tudi do 15 litrov dnevno) z nizko specifično težo. Klinični znaki bolezni so v izzvenenju. Izvidi laboratorijskih preiskav se normalizirajo.

Faza okrevanja (rekonvalescence) lahko traja nekaj tednov ali celo mesecev (31). Bolezen večinoma mine brez trajnih posledic.

Okužbo s hantavirusi je treba dokazati z mikrobiološkimi preiskavami. Najpogosteje uporabljamo posredne serološke metode, kjer dokazujemo specifična protitelesa razredov IgM in IgG (metode posredne imunofluorescence, encimski imunski test). Diagnostika temelji na dokazu protiteles razreda IgM, ki se pojavijo že v prvih dneh po okužbi ali porastu titra specifičnih protiteles razreda IgG

Tabela 1. Faze hemoragične mrzlice z renalnim sindromom z značilnostmi.

Faza	Febrična faza	Hipotenzivna faza	Oligurična faza	Poliurična faza	Faza okrevanja
Trajanje	3–6 dni	od nekaj ur do 2 dni	3–5 dni	7–14 dni	3–6 tednov
Značilnosti	nenaden nastop, visoka vročina, mrzlica, glavobol, bolečine ledveno, v trebuhu, driska, akutna miopija, rdečina obraza, vratu, zgornjega dela trupa, konjunktivalna injekcija, trombocitopenija, proteinurija, eritrociturija	hiter padec krvnega tlaka, šok, hemokonzentracija, okvara ledvične funkcije, sindrom žilne prepustnosti	oligurija, hemodializa, motnje elektrolitov, bolečine v trebuhu, hrbtu, krvavitve, prizadetost osrednjega živčevja, metabolne spremembe, akutni pljučni edem	izločanje tudi do 15 litrov seča dnevno, seč nizke specifične teže	ponavadi brez trajnih posledic

Tabela 2. Najpomembnejše razlike med bolniki z leptospirozo in s hemoragično mrzlico z renalnim sindromom (4). HMRS – hemoragična mrzlica z renalnim sindromom.

Značilnosti	Leptospiroza	HMRS
Pojavljanje	poleti, jeseni	spomladi, poleti
Najizrazitejše bolečine v mišicah	v mečih	ledveno
Motnje vida	ne	relativno pogosto
Zlatenica	da (v težjih oblikah)	ne
Respiratorni simptomi	redko	relativno pogosto
Hemoragije	redkeje	pogosteje
Trombocitopenija	redko	zelo pogosto
Pospesena sedimentacija eritrocitov	skoraj vedno	redkeje

(potrebna sta dva vzorca). Vedno več se uporabljajo tudi molekularne metode (PCR) (35). Zdravljenje je simptomatsko.

LEPTOSPIROZA ALI HEMORAGIČNA MRZLICA Z RENALNIM SINDROMOM?

Klinični potek in epidemiološke značilnosti leptospiroze oziroma HMRS so zelo podobne. Pojavljata se na istih geografskih področjih, najpogosteje poleti in jeseni. Okužbe s PUU se večinoma pojavljajo že v spomladanskih mesecih. Največkrat zbolijo mlajši moški, ki so pri delu izpostavljeni izločkom glodavcev. Začetek bolezni pri obeh okužbah je zelo podoben gripi. Pomembno je lokalno spremljanje pojavnosti gripe, ki se najpogosteje pojavlja v poznih jesenskih in zimskih mesecih.

Pri ljudeh so možne dvojne okužbe z leptospirami in s hantavirusi, kjer lahko pričakujemo težji potek bolezni. O prevalenci dvojnih okužb pri glodavcih ni podatkov (16). Pri obeh boleznih lahko v laboratorijskih izvidih ugotovimo levkocitozo z nevtrofilijo, znake okvare ledvic in jeter (hepatorenalni sindrom), trombocitopenijo, proteinurijo s piurijo ter cilindre v sedimentu seča. Čeprav HMRS povzročajo virusi, so izvidi laboratorijskih preiskav podobni bakterijskim okužbam z levkocitozo, nevtrofilijo, s pomikom v levo v diferencialni krvni sliki, z visokimi vrednostmi C-reaktivnega proteina in prokalcitonina. V naših krajih v diferencialni diagnostiki pomislimo na sepsa, okužbe sečil, prebavil, hepatitis, serokonverzijo pri okužbi z virusom humane imunске

pomanjkljivosti, različne serozne meningitise, okužbe z Epstein-Barrovim virusom, citomegalovirusom, na anaplazmozo ali prvo fazo klopnega meningitisa. Pri potnikih dodatno posumimo na malarijo, rikecioze, okužbe z arbovirusi (denga, rumena mrzlica itd.) (20).

Pri istočasnem serološkem testiranju na leptospirozo in hantaviruse v zgodnji fazi bolezni občasno ugotovimo lažno pozitivna protitelesa proti hantavirusom. Priporočamo ponovno serološko testiranje na hantaviruse in leptospirozo čez 10–14 dni (izvidi prvih seroloških preiskav na leptospirozo so praviloma negativni) oziroma uporabo molekularnih metod (Pal, neobjavljeni podatki) (5).

Pri razlikovanju leptospiroze in HMRS nam lahko pomagajo nekatere podrobnosti, ki so navedene v tabeli 2. Za HMRS so značilnejše močne bolečine ledveno in spodnjem delu trebuha, motnje vida (akutna miopija), nagnjenje h krvavitvam in izrazita trombocitopenija v začetku bolezni. Pri leptospirozi izstopajo bolečine v mečih, zlatenica in pospešena sedimentacija eritrocitov (4).

ZAKLJUČEK

Hemoragična mrzlica z renalnim sindromom in leptospiroza sta pomembni bolezni, ki sta prisotni v Sloveniji. Zaradi pestrosti kliničnih simptomov in znakov sta leptospiroza in HMRS pogosto spregledani. Dobro poznavanje epidemioloških podatkov, klinične slike in ustrezno zdravljenje lahko pomembno vplivajo na izhod bolezni. Zgodnje zdravljenje z antibiotiki lahko prepreči težji potek leptospiroze.

LITERATURA

1. Pal E, Strle F, Avsic - Zupanc T. Hemorrhagic fever with renal syndrome in the Pomurje region of Slovenian 18-year survey. *Wien Klin Wochenschr.* 2005; 117 (11-12): 398-405.
2. Pal E, Prelog I. Prikaz bolnikov z leptospirozo, zdravljenih na Oddelku za infekcijske bolezni in vročinska stanja Splošne bolnišnice Murska Sobota v letu 2002 – pomen hemokultur pri njeni diagnostiki. *Zdrav Vestn.* 2003; 72 (5): 275-7.
3. Bedernjak J. Leptospirosis in Pomurje and Slovenia. *Orv Hetil.* 1994; 135 (8): 409-11.
4. Kuzman I. Clinical picture of hemorrhagic fever with renal syndrome in Croatia. *Acta Med Croatica.* 2003; 57 (5): 393-7.
5. Golubić D, Markotić A. Leptospirosis and hemorrhagic fever with renal syndrome in northwestern Croatia. *Acta Med Croatica.* 2003; 57 (5): 369-72.
6. Clement J, Neild G, Hinrichsen SL, et al. Urban leptospirosis versus urban hantavirus infection in Brazil. *Lancet.* 1999; 354 (9194): 2003-4.
7. Avsic Zupanc T, Likar M, Novaković S, et al. Evidence of the presence of two hantaviruses in Slovenia, Yugoslavia. *Arch Virol.* 1990; Suppl 1: 87-94.
8. Avsic - Zupanc T, Cizman B, Gligic A, et al. Evidence for Hantavirus disease in Slovenia, Yugoslavia. *Acta Virol.* 1989; 33 (4): 327-37.
9. Avsic - Zupanc T, Petrovec M, Furlan P, et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome in the Dolenjska region of Slovenia 10-year survey. *Clin Infect Dis.* 1999; 28 (4): 860-5.
10. Korva M, Saksida A, Kunilo S, et al. HLA-associated hemorrhagic fever with renal syndrome disease progression in slovenian patients. *Clin Vaccine Immunol.* 2011; 18 (9): 1435-40.
11. Saksida A, Duh D, Korva M, et al. Dobrava virus RNA load in patients who have hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis.* 2008; 197 (5): 681-5.
12. Kraigher A, Frelih T, Korva M, et al. Increased number of cases of haemorrhagic fever with renal syndrome in Slovenia, January to April 2012. *Euro Surveill.* 2012; 17 (21).
13. Bedernjak J. Zdravljenje leptospiroz. *Med Razgl.* 1995; 34 (4): 529-34.
14. Bedernjak J. Leptospiroze pri nas in v svetu. Murska sobota: Pomurska založba; 1993.
15. Kudesia G, Christie P, Walker E, et al. Dual infection with leptospira and hantavirus. *Lancet.* 1988; 1 (8599): 1397.
16. Cvetko L, Turk N, Markotić A, et al. Short report: dual infections with Puumala virus and *Leptospira interrogans* serovar lora in a bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 74 (4): 612-4.
17. Saksida A, Wraber B, Avsic - Zupanc T. Serum levels of inflammatory and regulatory cytokines in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *BMC Infect Dis.* 2011; 11: 142.
18. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14 (2): 296-326.
19. Lim VK. Leptospirosis: a re-emerging infection. *Malays J Pathol.* 2011; 33 (1): 1-5.
20. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3 (12): 757-71.
21. Toyokawa T, Ohnishi M, Koizumi N. Diagnosis of acute leptospirosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011; 9 (1): 111-21.
22. Slack A. Leptospirosis. *Aust Fam Physician.* 2010; 39 (6): 495-8.
23. Adler B, de la Pena Moctezuma A. Leptospira and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2010; 140 (3-4): 287-96.
24. Levett PN, Branch SL, Whittington CU, et al. Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001; 8 (2): 349-51.
25. Marchiori E, Lourenco S, Setubal S, et al. Clinical and imaging manifestations of hemorrhagic pulmonary leptospirosis: a state-of-the-art review. *Lung.* 2011; 189 (1): 1-9.
26. Crouzet J, Faucher JF, Toubin M, et al. Serum C-reactive protein (CRP) and procalcitonin (PCT) levels and kinetics in patients with leptospirosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011; 30 (2): 299-302.
27. Turk N, Milas Z, Mojcic V, et al. Molecular analysis of *Leptospira* spp. isolated from humans by restriction fragment length polymorphism, real-time PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 300 (2): 174-9.
28. Brett-Major DM, Coldren R. Antibiotics for leptospirosis. 2012 Feb 15 [citirano 2012 Sep 4]. In: The Cochrane Database of Systematic Reviews [internet]. 370K. Številka vpisa: CD008264.
29. Panaphut T, Domrongkitchaiporn S, Vibhagool A, et al. Ceftriaxone compared with sodium penicillin g for treatment of severe leptospirosis. *Clin Infect Dis.* 2003; 36 (12): 1507-13.
30. Mackow ER, Gavrilovskaya IN. Hantavirus regulation of endothelial cell functions. *Thromb Haemost.* 2009; 102 (6): 1030-41.
31. Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist A, et al. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3 (10): 653-61.
32. Denecke B, Bigalke B, Haap M, et al. Hantavirus infection: a neglected diagnosis in thrombocytopenia and fever? *Mayo Clin Proc.* 2010; 85 (11): 1016-20.

33. Jereb M, Lunaček NK, Kotar T, et al. Procalcitonin in hantavirus infections. *Scand J Clin Lab Invest.* 2011; 71 (4): 287–91.
34. Cerar D, Avsic - Zupanc T, Jereb M, et al. Case report: severe neurological manifestation of Dobrava hantavirus infection. *J Med Virol.* 2007; 79 (12): 1841–3.
35. Avšič - Županc T. Mikrobiološka diagnostika okužb s hantavirusi. In: Poljak M, Petrovec M, eds. *Medicinska virologija.* Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011. p. 175.

Eva Ružič - Sabljic¹, Daša Podgoršek², Tjaša Cerar³

Pomen mikrobiološke diagnostike leptospiroze

The Importance of Microbiological Diagnosis of Leptospirosis

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: leptospiroza, mikrobiološka diagnoza, izolacija, leptospirina DNA, serologija

Leptospiroza je najbolj razširjena zoonoza na svetu, opisana je tudi v Sloveniji. Glavni rezervoar leptospir predstavljajo glodavci, okužene so tudi številne druge domače in prostoživeče živali, ki bakterije izločajo s sečem v okolje. V okuženem okolju (polja, travniki, stoječe in tekoče vode) lahko leptospire preživijo več mesecev. Človek se z leptospirami okuži ob stiku s krvjo, sečem in organi okužene živali ali preko kontaminiranega okolja. Pri večini bolnikov se okužba pozdravi spontano, pri nekaterih pride do težjega kliničnega poteka z zlatenico, akutno ledvično odpovedjo, krvavitvami in večorgansko odpovedjo. Pri diagnostiki leptospiroze je zelo pomembna epidemiološka anamneza. V zgodnji fazi okužbe lahko leptospire izoliramo iz bolnikovih vzorcev ali dokažemo leptospirino DNA; protitelesa v tej fazi okužbe še niso prisotna. V drugi fazi okužbe pride do tvorbe specifičnih protiteles, kar pripomore k odstranjevanju leptospir iz telesa. Mikrobiološka diagnoza okužbe ima bistveno vlogo pri opredelitvi zgodnjega antibiotičnega zdravljenja.

ABSTRACT

KEY WORDS: leptospirosis, microbiological diagnosis, isolation, DNA detection, serology

Leptospirosis is the most widespread zoonosis in the world. It is also present in Slovenia. Rodents represent the main reservoir of leptospira, but many other domestic and wild animals are also infected; infected animals secrete bacteria into the environment through urine. In contaminated environments (fields, pastures, standing and running water), leptospira can survive for several months. Humans can be infected through contact with blood, urine, organs of infected animals, and contaminated environment. In most patients, the infection heals spontaneously, while in others the infection results in a serious clinical course with jaundice, acute renal failure, bleeding and multiple organ failure. Epidemiological history is very important for the diagnosis of leptospirosis. In the early stage of the infection, leptospira can be isolated from patient samples, or may be confirmed by evidence of leptospira's DNA; at this stage of the infection, antibodies are not yet present. In the second stage of the infection, specific antibodies help remove leptospira from the body; they can be detected with different serological tests. Microbiological diagnosis of the infection plays a crucial role in early antibiotic treatment of the infection.

¹ Prof. dr. Eva Ružič - Sabljic, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; eva.ruzic-sablji@mf.uni-lj.si

² Daša Podgoršek, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Asist. dr. Tjaša Cerar, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

UVOD

Leptospirozo povzročajo zelo gibljive spirohete z značilno kljukasto zakrivljenimi konci, ki jih imenujemo *Leptospira interrogans* sensu lato. Leptospiroza je najbolj razširjena zoonoza na svetu, v Sloveniji endemična v Pomurju; letno se okuži od 0 do 30 oseb (1, 2). Glavni rezervoar leptospir v naravi so glodavci, okužene so tudi številne druge domače in prostoživeče živali, ki bakterije izločajo s sečem v okolje. Kontaminirana so polja, travniki, stoječe in tekoče vode, kjer lahko leptospire preživijo več mesecev (3).

Človek je naključni gostitelj. Z leptospirami se lahko okuži ob stiku s krvjo, sečem in organi okužene živali ali preko kontaminiranega okolja (3, 4). Posebej so ogrožene osebe, zaposlene v kmetijstvu, delavci pri kopanju jarkov, vodovodni delavci, delavci na riževih poljih, rudarji, delavci v klavnicah, veterinarji in vojaki, pogosto obolevajo tudi otroci in mladostniki, ki se kopajo v jezerih, potokih in rekah (4). Tretjina obolenj je poklicnega izvora, dve tretjini okužb pa lahko pripišemo rekreaciji (5).

Klinična slika leptospiroze je zelo pestra in spremenljiva (4–6). Pri večini bolnikov se okužba pozdravi spontano, pri nekaterih pa pride do težjega kliničnega poteka z zlatenico, akutno ledvično odpovedjo, krvavitvami in večorgansko odpovedjo (Weilov sindrom) (5). Klinična slika bolezni ni odvisna od serovara, ki je okužbo povzročil (5).

Pri diagnostiki leptospiroze je zelo pomembna epidemiološka anamneza: poznavanje razširjenosti leptospir in možnost izpostavitve bolnika okužbi (5, 6). Epidemiološki podatki so pomembni pri izključitvi drugih bolezni, ki ravno tako potekajo z vročino: malarija, tifus, rumena mrzlica, denga, drugo (4, 7). Leptospirozo dokažemo z osamitvijo bakterije iz telesnih tekočin, z dokazom zvišanja titra specifičnih protiteles ali z dokazom DNA leptospir v bolnikovih kužninah (5, 6).

Zgodnje antibiotično zdravljenje leptospiroze igra bistveno vlogo pri ozdravitvi. Leptospire so zelo občutljive za penicilin in tetracikline. Pomembno je tudi sprotno simptomatsko zdravljenje in redno spremljanje bolnikovega stanja (5).

Leptospiroze ne moremo popolnoma izkoreniniti, lahko pa s cepljenjem preprečimo bolezen pri živalih in posledično tudi izločanje leptospir v okolje (3). Za preprečevanje leptospiroze je zelo pomembna redna deratizacija, sprotna drenaža urina v hlevih in izločanje bolnih živali iz hlevov; človek se lahko zaščiti z nošenjem zaščitne obleke in obuvala, zaželeno je izogibanje plavanju v potokih, jezerih in rekah, ki so lahko kontaminirane (5).

MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA LEPTOSPIROZE

Okužbo z leptospiro lahko dokažemo z osamitvijo bakterije, dokazom specifičnih protiteles ali z dokazom DNA leptospir, odvisno od faze bolezni (5, 6). V prvi (akutni ali septični) fazi, ki traja približno teden dni, lahko leptospire osamimo iz bolnikove krvi in/ali likvorja ali dokažemo leptospirino DNA v omejenih vzorcih. Protitelesa v tej fazi okužbe še niso prisotna. V drugi, imunski fazi pride do tvorbe specifičnih protiteles, kar pripomore k odstranjevanju leptospir iz telesa. Leptospire se zadržijo v ledvicah, predvsem če bolnik ni bil zdravljen z antibiotiki, zato lahko pride do izločanja leptospir z urinom. V tej fazi okužbe lahko leptospire osamimo iz urina ali v urinu dokažemo njihovo DNA, hkrati lahko dokažemo specifična protitelesa v krvi bolnika (5).

Posredna mikrobiološka diagnostika

V rutinski laboratorijski diagnostiki se uporabljajo predvsem serološke metode, s katerimi dokazujemo specifična protitelesa proti leptospiram, ki se v krvi bolnika pričnejo pojavljati šele 7–10 dni po pojavu simptomov ali kasneje. Primerne kužnine za serološko diagnostiko so polna kri, plazma in serum. Protitelesa so specifična za serovar leptospir, ki je okužbo povzročil. Pomemben je odvzem parnih serumov v razmiku 10–14 dni, saj na ta način ovržemo možnost stare okužbe (5, 6). Nivo protiteles narašča nekaj tednov, nato začne počasi padati. V telesnih tekočinah lahko protitelesa ostanejo prisotna tudi več let po okužbi (5).

Testi, ki določajo protitelesa proti leptospiram, so lahko specifični za rod ali za posa-

mezni serovar (5). Za rod specifični testi naj bi bili pozitivni ne glede na to, kateri serovar je okužbo povzročil, saj vsebujejo antigene, ki so skupni mnogim leptospiram, medtem ko je za serovar specifične teste značilno, da protitelesa iz seruma bolnikov reagirajo le s serovari iste serološke skupine, ki je povzročila okužbo. Pri testih, ki vključujejo posamezne serovare, je pomembno, da poznamo najpogostejše serovare na določenem geografskem področju in jih vključimo v test (5). Zaradi navzkrižnih reakcij lahko zaznamo protitelesa, usmerjena proti večjemu številu serovarov, vendar v različnih titrih. Poznamo številne metode za dokazovanje protiteles: mikroaglutinacijski test, encimski imunski testi, indirektni hemaglutinacijski test, lateksni aglutinacijski test, makroaglutinacijski test, imunofluorescenčni test in imunokromatografski test na membrani.

Mikroaglutinacijski test

Referenčni serološki test za dokazovanje okužbe z leptospirami je mikroaglutinacijski test, kjer serum bolnika inkubiramo s svežo kulturo leptospir. Katere serovare bomo vključili v test, je odvisno od epidemiološke slike določenega geografskega področja. Običajno vključimo 8–16 serovarov, ki so prisotni na določenem geografskem področju. Inkubaciji sledi mikroskopiranje kapljice suspenzije. V primeru, da so v serumu bolnika prisotna protitelesa, pride do aglutinacije ali lize leptospir, kar se z mikroskopiranjem v temnem polju zelo lepo vidi v primerjavi s kulturo.

Mikroaglutinacijski test določa celokupna protitelesa, je precej drag, njegova izvedba pa zapletena, dolgotrajna ter dokaj subjektivna, poleg tega zahteva stalno zalogo in vzdrževanje kultur leptospir, zaradi česar so možne okužbe laboratorijskih delavcev, pri prevelikem številu kliničnih vzorcev pa sta vprašljiva tudi sama izvedba in natančnost testa (6). Slabost testa je tudi v tem, da je bolnik lahko okužen s serovarom, ki v test ni vključen, posledično pride do lažno negativnih rezultatov ali nizkih titrov protiteles (7). Takšni primeri so pogosti, kadar se bolniki okužijo na potovanjih po različnih delih sveta, testirajo pa se v svoji državi po vrnitvi domov.

Test indirektne hemaglutinacije

Za izvedbo testa indirektne hemaglutinacije se uporabljajo človeški eritrociti skupine 0, ki so senzibilizirani s specifičnimi antigeni *L. biflexa* sensu lato, sev Patoc I (sev nepatogene leptospire), ki naj bi vseboval večino antigenov, ki jih imajo tudi patogene leptospire, in bil tako primeren za izvedbo testa. Z indirektno hemaglutinacijo dokazujemo celokupna protitelesa in ne protiteles posameznega razreda (8).

Encimski imunski test

Encimski imunski test izvedemo tako, da izbrani bakterijski antigen vežemo na trden nosilec ter dodamo bolnikov serum. Test poleg protiteles IgG dokaj hitro in zanesljivo določi tudi protitelesa IgM, ki so pomemben pokazatelj akutne okužbe (5). Slaba stran testa je, tako kot pri hemaglutinacijskem testu, možnost lažno negativnih rezultatov, saj je v testu zajet le en sev, navadno Patoc I, ki včasih ne veže vseh specifičnih protiteles, ki nastanejo pri okužbi z drugimi serovari (6). Drugi problem je morebitna prisotnost revmatoidnega faktorja, ki lahko ovira dokaz specifičnih protiteles IgM, saj tudi sam največkrat sodi v razred protiteles IgM. Množica avtoimunskih protiteles lahko privede do bodisi lažno negativnih bodisi lažno pozitivnih rezultatov.

Lateksni aglutinacijski test

Z lateksnim aglutinacijskim testom določamo specifična celokupna protitelesa proti leptospirnim antigenom v človeškem serumu. Na testni listič so pritrjeni modri lateksni delčki, kamor je vezan leptospirin antigen, sev Patoc I (9). Test je hiter in enostaven, določa celokupna protitelesa.

Makroaglutinacijski test

Makroaglutinacijski test določa celokupna protitelesa. Za izvedbo se uporabljajo mrtve leptospire, inaktivirane s formalinom. Rezultate lahko odčitamo s prostim očesom, zato je ta metoda manj občutljiva od mikroaglutinacijskega testa, poleg tega so nižji tudi aglutinacijski titri (10). Test je zahteven za uporabo in se ga vse pogosteje nadomešča z enostavnejšimi tehnikami.

Imunokromatografski test

Imunokromatografski test se izvede na testni membrani, ki je vgrajena v plastično ploščico. Test določa le protitelesa razreda IgM. V primeru, da so v vzorcu prisotna protitelesa IgM, le-ta reagirajo z za rod specifičnimi leptospirinimi antigeni, vezanimi na membrano. Test je hiter in razmeroma enostaven.

Molekularna diagnostika leptospiroze

V zadnjem času se v dnevni laboratorijski diagnostiki vse pogosteje uporablja dokazovanje leptospirine DNA z verižno reakcijo s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR), ki ima pomembno vlogo pri zgodnjem odkrivanju leptospiroze, preden pride do nastanka specifičnih protiteles, ko so leptospire prisotne v bolnikovi krvi (5, 11). Metoda je v primerjavi z osamitvijo leptospir zelo hitra, saj so rezultati na voljo v 24 urah, kar igra pomembno vlogo pri potrditvi okužbe in nadaljnjem antibiotičnem zdravljenju bolnika. Če je metoda dobro zasnovana, je visoko občutljiva in specifična; slabost se kaže v zahtevnosti in visoki ceni, pa tudi v nezmožnosti identifikacije serovara, ki je povzročil okužbo.

Dokazovanje leptospirine DNA s PCR poteka v treh zaporedno izvedenih korakih: izolacija DNA iz kužnine, pomnoževanje zaželenega odseka leptospirine DNA in potrditev produkta PCR. Mnogi laboratoriji uporabljajo hkrati dva testa: prvi del je enostopenjska klasična PCR-reakcija, ki pomnožuje DNA patogenih in nepatogenih leptospir, drugi del je t. i. vgneženi (angl. *nested*) test, ki poveča občutljivost testa in poteka v dveh stopnjah z dvema paroma začetnih oligonukleotidov, s katerima dokazujemo specifične dele DNA patogenih leptospir. Oba testa morata biti pozitivna, da potrdimo prisotnost leptospirine DNA v kužnini.

V zadnjem času se v molekularni mikrobiološki diagnostiki leptospiroze pojavlja še hitrejša PCR-metoda, PCR v realnem času. Pomnoževanje tarčnega odseka in analiza nastalega produkta potekata sočasno v zaprtem homolognem sistemu, kar zmanjša možnost kontaminacije (12). Poročila o občutljivosti in specifičnosti metode so zelo različna.

Zaradi nizke koncentracije leptospir v kužnini ima prednost vgnežena PCR-metoda. Vsekakor negativni rezultat PCR-testa ne izključuje leptospiroze. Izvajajo se intenzivne raziskave, katerih cilj je poiskati čim bolj občutljiv in specifičen PCR-test za dokaz okužbe z leptospirami.

Osamitev leptospir

Osamitev leptospir iz kužnine velja za zlati standard v diagnostiki leptospiroze. Vzorci za osamitev leptospir morajo biti odvzeti pred antibiotičnim zdravljenjem in kultivirani v za to posebej pripravljenem gojišču (npr. EMJH, Korthoffovo gojišče, Fletcher). V prvi fazi bolezni sta ustrezna vzorca kri in likvor, v drugi fazi bolezni pa lahko leptospire osamimo iz bolnikovega seča, ampak le v primeru, da bolnik ni bil zdravljen z antibiotiki (5). Kužnino inkubiramo vsaj šest tednov pri 28 °C. Cepiti moramo čim več vzorcev iste kužnine. Enkrat tedensko kapljico gojišča z dodano kužnino pregledamo z mikroskopiranjem v temnem polju, izolirane leptospire pa shranjujemo v tekočem dušiku (13).

Osamitev leptospir se zaradi nekaterih pomanjkljivosti, kot so zahtevnost, nizka občutljivost in časovna zamudnost, le redko uporablja v klinični diagnostiki, pomembno vlogo pa igra pri epidemioloških študijah o razširjenosti leptospir, pri preučevanju samega povzročitelja (vrsta, sev, virulenčni dejavniki), kakor tudi pri preučevanju patogeneze okužbe. Zaželeno je, da se v mikroaglutinacijski test vključujejo sevi leptospir, osamljeni iz kliničnih vzorcev, saj je imunski odziv bolnika usmerjen proti antigenom serovara, s katerim je bolnik okužen, zato je lokalni izolat primerno vključevati v teste za dokaz specifičnih protiteles (13).

Leptospire lahko osamimo tudi iz telesnih tekočin živali (npr. seča). Živali, okužene z leptospirami, največkrat okužbo preživijo. Trajanje izločanja leptospir s sečem pri okuženi živali je odvisno od gostitelja in od serovara, ki je okužbo povzročil – domače živali lahko izločajo leptospire v okolje več mesecev, glodavci pa tudi več kot eno leto. Leptospire lahko osamimo iz površinskih voda, kamor jih izločajo okužene živali. V nevtralnih in rahlo alkalnih vodah lahko leptospire preživijo več mesecev (3).

Opredelevitev izoliranih leptospir nam poda informacije o tem, kateri sevi so prisotni na določenem geografskem področju, katere seve je treba vključiti v test mikroaglutinacije, in morebitno povezanost sevov leptospir s klinično sliko bolnikov. Za opredelitev leptospir so na voljo serotipizacijske identifikacijske metode, s katerimi opredelimo serovar in serološko skupino ter genotipizacijske identifikacijske metode, ki omogočajo opredelitev do nivoja vrste (5).

Serotipizacija temelji na analizi antigen-skih lastnosti seva. Leptospire so antigensko precej heterogene, lahko jih uvrstimo v 230 različnih serovarov in 23 seroloških skupin. Najbolj uporabljana genotipizacijska metoda za opredelitev serovarov leptospir je gelska pulzna elektroforeza (angl. *pulsed field gel electrophoresis*, PFGE) po rezanju celokupne leptospirine DNA, za katero je značilna dobra

ponovljivost in sposobnost razlikovanja sevov. Slabosti metode sta draga oprema in časovna zamudnost, poleg tega lahko izolirana DNA propade, zaradi česar rezultate izgubimo (14, 15). V zadnjem času je zato na voljo vse več novih metod za genotipizacijo, določanje vrste in sorodnosti leptospir: PCR v realnem času, analiza temperature taljenja, tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij (angl. *multilocus sequence typing*, MLST), amplifikacije določenega značilnega gena, hkratna analiza večjega števila lokusov z variabilnim številom tandemskih ponovitev (angl. *multiple locus variable number of tandem repeats analysis*, MLVA) in polimorfizem dolžin restriktcijskih fragmentov (angl. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP). Vendar pa je te metode treba še oceniti in ugotoviti, katera bi bila najprimernejša tako za izvedbo kot tudi za podajanje ustreznih informacij.

LITERATURA

1. Kraigher A, Sočar M, Klavs I, et al. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2010 [internet]. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja; 2011 [citirano 2012 Jun 22]. Dosegljivo na: http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5&_5_FileName=4112.pdf&_5_MediaId=4112&_5_AutoResize=false&pl=105-5.3.
2. Bedernjak J. Leptospiroze pri nas in v svetu. Murska Sobota: Pomurska založba; 1993.
3. Adler B, de la Pena Moctezuma A. Leptospira and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2010; 140 (3-4): 287-96.
4. Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes Infect.* 2000; 2 (10): 1265-76.
5. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14 (2): 296-326.
6. Toyokawa T, Ohnishi M, Koizumi N. Diagnosis of acute leptospirosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011; 9 (1): 111-21.
7. Levett PN, Whittington CU. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 1998; 36 (1): 11-4.
8. Effler PV, Domen HY, Bragg SL, et al. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis in Hawaii. *J Clin Microbiol.* 2000; 38 (3): 1081-4.
9. Smits HL, van der Hoorn MA, Goris MG, et al. Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 2000; 38 (3): 1272-5.
10. Palmer MF. Laboratory diagnosis of leptospirosis. *Med Lab Sci.* 1988; 45 (2): 174-8.
11. Ooteman MC, Vago AR, Koury MC. Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis. *J Microbiol Methods.* 2006; 65 (2): 247-57.
12. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10 (3): 190-212.
13. Wuthiekanun V, Chierakul W, Limmathurotsakul D, et al. Optimization of culture of *Leptospira* from humans with leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 2007; 45 (4): 1363-5.
14. Postic D, Riquelme-Sertour N, Merien F, et al. Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between *Leptospira* collections: application to *L. meyeri*. *Res Microbiol.* 2000; 151 (5): 333-41.
15. 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.

Miša Korva¹, Katarina Resman², Luka Fajs³, Tomi Trilar⁴, Tatjana Avšič - Županc⁵

Epidemiologija in ekologija hantavirusov v Sloveniji

Hantavirus Epidemiology and Ecology in Slovenia

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: hantavirusi, glodavci, Dobrava, Puumala, Tula, Seewis, Saaremaa, epidemiologija

Na svetu je trenutno znanih preko 20 za človeka patogenih hantavirusov ter še trikrat toliko nepatogenih hantavirusov. Razvijali so se skupaj s svojimi naravnimi gostitelji in se prilagajali okoljskim spremembam, zato danes ugotavljamo med njimi veliko genetsko raznolikost. Za razliko od ostalih virusov v družini *Bunyaviridae* hantavirusi nimajo znanega členonožnega prenašalca in krožijo v naravi med trajno okuženimi glodavci in žuškojedimi sesalci. Pri naravnih gostiteljih povzročajo trajno okužbo, brez razvoja klinične slike. Ljudje so naključni gostitelji hantavirusov in se z njimi okužijo z vdihovanjem aerosoliziranih kužnih izločkov glodavcev. V Sloveniji kroži pet hantavirusov: Puumala, Dobrava, Saaremaa, Tula in Seewis, tako med glodavci kot tudi med žuškojedimi gostitelji. Kljub raznovrstni ekologiji hantavirusov v Sloveniji pa povzročata hemoragično mrzlico z renalnim sindromom le virusa Puumala in Dobrava. Virus Puumala povzroča blažjo obliko bolezni, okužba z virusom Dobrava pa povzroči težjo obliko bolezni ter lahko doseže do 12 % smrtnost. Posamezni primeri bolezni se večinoma pojavijo pozno spomladi in poleti ter ob jesenski ohladitvi. Takrat je človek dejavnejši v naravi in je verjetnost stika z naravnimi gostitelji večja, hkrati pa se zaradi prihajajoče zime glodavci selijo v naselja, kjer je hrane v izobilju.

ABSTRACT

KEY WORDS: hantavirus, rodents, Dobrava, Puumala, Tula, Seewis, Saaremaa, epidemiology

Over the past few decades, understanding and recognizing hantavirus infections has greatly improved worldwide, yet both the amplitude and the magnitude of hantavirus outbreaks have been increasing. In contrast with other bunyaviruses, hantaviruses are not transmitted by an arthropod vector, but are carried by persistently infected rodent or insectivore hosts. In general, it is accepted that the infection of a natural host is not apparent and does not produce a disease. Humans are not the natural hosts of hantaviruses, and an infection normally occurs accidentally by inhalation of virus-containing aerosols from rodent excretions such as urine, faeces, and saliva. The co-existence of five different hantaviruses – Puumala, Dobrava, Saaremaa, Tula and Seewis – in a single endemic region in Slovenia has been demonstrated,

¹ Dr. Miša Korva, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; misa.korva@mf.uni-lj.si

² Katarina Resman, univ. dipl. bioteh., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Luka Fajs, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁴ Dr. Tomi Trilar, univ. dipl. biol., Prirodoslovni muzej Slovenije, Prešernova cesta 20, 1000 Ljubljana

⁵ Prof. dr. Tatjana Avšič - Županc, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; tatjana.avsic@mf.uni-lj.si

but despite that only Puumala and Dobrava hantaviruses cause haemorrhagic fever with renal syndrome in humans. The severity of the disease caused by Puumala virus is usually lower than that of Dobrava virus, which can exceed the fatality rate of 12%. Most of the cases are usually recorded during late spring, summer and during autumn chills, when humans spend more time in nature.

UVOD

Hantavirusi so razširjeni po vsem svetu in so domnevno prisotni v našem okolju že stoletja. Razvijali so se skupaj s svojimi naravnimi gostitelji in se prilagajali okoljskim spremembam, zato danes ugotovljamo med njimi veliko genetsko raznolikost. Za razliko od ostalih virusov v družini *Bunyaviridae* hantavirusi nimajo znanega členonožnega prenašalca in krožijo v naravi med trajno okuženimi malimi sesalci (1).

Pri naravnih gostiteljih hantavirusi povzročajo trajno okužbo brez razvoja klinične slike (2). Kljub temu da poteka okužba v naravnem gostitelju brez opaznih bolezenskih znakov, so nekatere študije pokazale, da virus zmanjša preživetje gostitelja čez zimo ter upočasnjuje rast in razvoj okužene živali (3–5). Po okužbi gostitelja sledi kratkotrajna viremija, nato pa razsoj virusa v skoraj vse notranje organe, kjer se virus trajno razmnožuje vse življenje, tudi po razvoju specifičnih protiteles (6, 7). Okuženi glodavci izločajo virus v slini, fecesu in urinu tudi mesec dni po okužbi (8, 9). Poleg tega so hantavirusi zelo obstojni v okolju, zato posredni prenos virusa preko okuženih izločkov na naključnega gostitelja ni presenetljiv (10). Med naključne gostitelje hantavirusov štejemo lisice, domače mačke in pse (11–13). Vendar je naključno gostiteljstvo le prehodne narave in ne predstavlja resničnega tveganja za okužbo ali ohranjanje virusa v naravi.

Tudi človek je naključni gostitelj v kroženju hantavirusov v naravi. S hantavirusi se lahko okuži na dva načina: najpogostejša pot vnosa virusa je vdihavanje kužnih aerosolov iz izločkov glodavcev, ali neposredno, z ugrizom okužene podgane (14). Prenos virusa s človeka na človeka je zelo redek in so ga opisali le pri virusu Andes (AND), ki velja za enega najbolj patogenih hantavirusov (15, 16).

Teorija o koevoluciji hantavirusov pravi, da se ohranja v naravi vsak hantavirus v točno določenem glodavcu, zato lahko pri filogenetskih analizah hantavirusov opazimo koevolucijo virusa in gostitelja. To se odraža tudi v zemljepisni razširjenosti virusov, ki sovpa da z ekološko nišo njihovih gostiteljev (17). Kljub temu da filogenetske analize odražajo vez med naravnim gostiteljem in evolucijo hantavirusov, so pri podrobnejših analizah opazili določene »nepravilnosti«, ki nakazujejo, da je med hantavirusno evolucijo prišlo do zamenjav gostitelja (18, 19). Danes vemo, da je ekologija hantavirusov mnogo kompleksnejša, kot so sprva predvidevali, saj ne le glodavci, temveč tudi žužkojedi (rovke in krti) lahko služijo kot naravni rezervoar virusa, s čimer je virus pridobil mnogo širšo ekološko nišo. K temu sodi tudi odkritje, da so hantavirusi poleg v Aziji, Evropi in Ameriki razširjeni tudi v Afriki (20, 21). Nedavno so z molekularnimi metodami dokazali hantavirusni genom tudi v vzorcih netopirjev, ujetih v Sierra Leone in na Slonokoščeni obali (22, 23). Prav ugotovitev, da so hantavirusi, ki so jih dokazali v vzorcih netopirjev, filogenetsko oddaljeni od ostalih evropskih in azijskih hantavirusov, nakazuje na možnost, da so netopirji pravi in ne le naključni gostitelji hantavirusov.

Na svetu je trenutno znanih preko 20 za človeka patogenih hantavirusov ter še trikrat toliko nepatogenih hantavirusov. Pri ljudeh hantavirusi povzročajo dva bolezenska sindroma: hemoragično mrzlico z renalnim sindromom (HMRS) (angl. *hemorrhagic fever with renal syndrome*) v Evropi in Aziji, ter hantavirusni srčno-pljučni sindrom (angl. *hantavirus cardio-pulmonary syndrome*, HCPS) v Ameriki (2, 24). Letno poročajo o okoli 150.000 primerih HMRS po svetu, pri čemer je večina bolnikov s Kitajske. V Evropi večino okužb povzročata hantavirusa Puumala (PUU) in

Dobrava (DOB), ki se ohranjata v gozdni voluharici, *Myodes glareolus*, in rumenogri miši, *Apodemus flavicollis*. Bolezen se pojavlja na endemičnih območjih, in prizadene samo v Evropi več kot 10.000 posameznikov letno (25). V Severni in Južni Ameriki poročajo o približno 1.000 primerih HCPS letno, vendar pa je smrtnost kar 40% (21).

Patogeneza HMRS je nepoznana predvsem zaradi koevolucije virusa z naravnim gostiteljem in ker ni na voljo primernega živalskega modela. Večina študij je omejenih na pogoje *in vitro*, ki zahtevajo laboratorij tretje stopnje biološke varnosti. Kljub temu so z različnimi laboratorijskimi in kliničnimi raziskavami nakazali, da imata v patogenezi HMRS pomembno vlogo tudi genetski status in imunski odziv posameznika (26–30).

EKOLOGIJA HANTAVIRUSOV V SLOVENIJI

V Sloveniji krožijo hantavirusi tako med glodavci kot tudi žužkojedimi gostitelji. Med glodavci krožijo kar štiri tipi hantavirusov: PUU, DOB, Saaremaa (SAA) in Tula (TUL) (31–33). Nedavno smo v gozdni rovkvi, *Sorex araneus*,

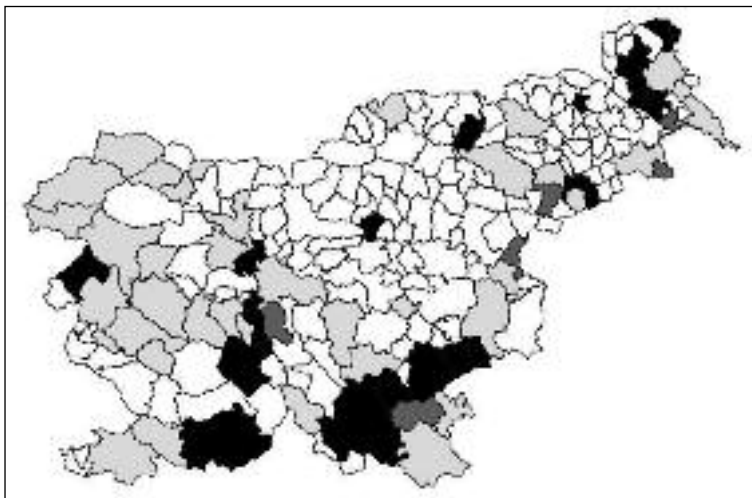
dokazali tudi hantavirus Seewis (SWS) (neobjavljeni podatki). S sodelovanjem Laboratorija za diagnostiko zoonoz, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete v Ljubljani in Prirodoslovnega muzeja Slovenije poteka aktivno spremljanje kroženja hantavirusov v naravi že od leta 1990.

Hantavirusi v glodavcih

Virus Puumala

Večino primerov HMRS v Sloveniji, tako kot po vsej Evropi, povzroča virus PUU, ki se ohranja v naravi v gozdni voluharici, *M. glareolus* (31). Virus so izolirali leta 1980 na Finskem in ga prepoznali kot povzročitelja bolezni, imenovane *nephropathia epidemica* (34).

Gozdna voluharica je razširjena po vsej Evropi, razen ob obalah Sredozemskega morja, v Grčiji in na skrajnem severu (24). V Sloveniji je razširjena po celinskem delu, od 80 do 2.000 m nadmorske višine. Njeno življenjsko okolje predstavljajo predvsem vlažni iglasti in mešani gozdovi, čeprav jo najdemo tudi v listnatem gozdu, barjanskem grmišču in gostem rastlinju ob vodah in živih mejah (35). V južnem delu Evrope so populacije gozdnih voluharic stabilne, z značilnim sezonskim



Slika 1. Zemljepisna razporeditev hantavirusov Puumala in Tula v Sloveniji. S svetlo sivo barvo so označene preiskovane lokacije. S črno barvo so označene lokacije, na katerih smo dokazali virus Puumala v naravnem gostitelju (občine Kanal ob Soči, Medvode, Brezovica, Ilirska Bistrica, Cerknica, Kočevje, Dolenjske Toplice, Novo mesto, Šentjernej, Kostanjevica na Krki, Videm, Vransko, Lovrenc na Pohorju, Benedikt, Puconci, Murska Sobota, Beltinci, Šalovci, Hodos). S temno sivo barvo so označene lokacije, na katerih smo dokazali virus Tula v naravnem gostitelju (občine Ig, Semič, Podčetrtek, Majšperk, Središče ob Dravi, Črenšovci).

gibanjem, zato večino primerov zabeležimo spomladi in poleti. Epidemije HMRS so pogostejše v letih, ko je v naravi veliko želoda in zato tudi več voluharic (24). Hantavirus PUU kroži v gozdnih voluharicah, ujetih v goriški, notranjsko-kraški, jugovzhodni, podravske in pomurski regiji (slika 1). S filogenetsko analizo smo dokazali vsaj dve genetski liniji virusa PUU, ki kažeta značilno zemljepisno združevanje v monofiletsko linijo. Prva genetska linija pokriva območje Prekmurja in sodi v t. i. alpe-adrijsko genetsko linijo, druga genetska linija pa se razteza čez veliko širše področje Slovenije – od jugovzhodne do goriške regije (31, 36, 37). Nukleotidna zaporedja virusa PUU so si, znotraj posamezne genetske linije, podobna v 93–100%. Dokazali smo tudi, da se večina bolnikov s HMRS okuži v okolici doma, saj smo potrdili povezavo v nukleotidnem zaporedju virusa, pomnoženega iz bolnika in voluharice z istega zemljepisnega območja (31).

Virus Tula

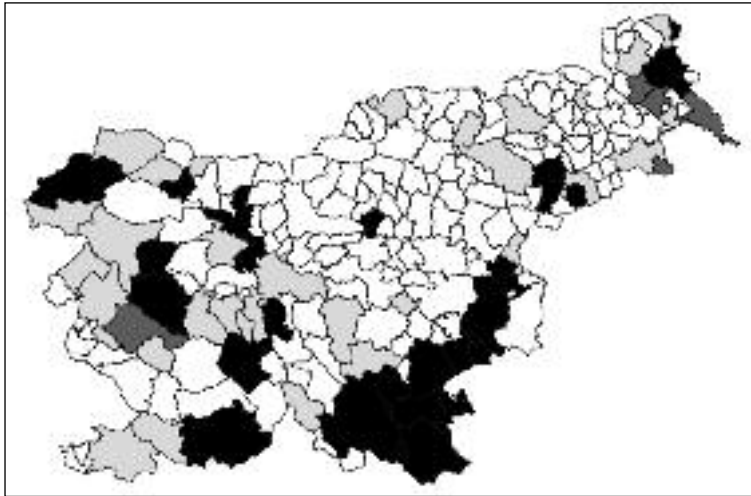
Virus TUL izvira iz Rusije in naj bi bil patogen tudi za človeka (38, 39). Naravni gostitelji virusa so voluharice iz rodu *Microtus* subsp., poddružine *Avicolinae*, ki jih najdemo širom sveta: Severna Amerika, Evropa in Azija. Virus TUL so sprva osamili iz *M. arvalis* in *M. levis* v osrednji Rusiji, kasneje pa so virus dokazali v številnih evropskih državah. Virus TUL smo dokazali v treh gostiteljih: poljski voluharici, *M. arvalis*, travniški voluharici, *M. agrestis*, in vrtni voluharici, *M. subterraneus*, ujetih v osrednjeslovenski, savinjski, podravske, jugovzhodni in pomurski regiji (slika 1). Naravno življenjsko okolje vseh treh vrst voluharic so suhi in odprti habitati, kot so alpski travniki nad gozdno mejo, pašniki, obdelovalne površine, polja in travniki (35). S filogenetsko analizo smo potrdili zemljepisno raznolikost virusa TUL tudi v Sloveniji (86,9–100% podobnost na nukleotidnem nivoju) in virus uvrstili v isto genetsko linijo s hrvaškimi in z avstrijskimi izolati (33). Kljub temu da so protitelesa proti virusu TUL dokazali v posameznih primerih HMRS, si raziskovalci še vedno niso edini, ali je virus TUL za človeka nevaren ali ne (38, 40). Tudi v Sloveniji smo virus dokazali le v naravnem gostitelju.

Virus Dobrava

V Sloveniji najbolj razširjen hantavirus je virus DOB, ki tudi izvira iz Slovenije. Odkrili so ga v rumenogrli miši, *A. flavicollis*, ujeti v vasi Dobrava na Dolenjskem (41). Virus DOB in njegovega gostitelja lahko najdemo povsod po Sloveniji, vendar večina primerov bolezni izvira predvsem iz dolenske in ljubljanske regije (slika 2) (32). Prevalenca virusa DOB v naravnem gostitelju variira 5,5–27,2%, odvisno od lokacije in endemičnega območja (32). S filogenetskimi analizami virusa, pomnoženege iz vzorcev rumenogrlih miši in bolnikov, smo dokazali, da kroži več monofiletskih skupin virusa DOB, ki se med seboj razlikujejo 0–5,8%, na nukleotidnem nivoju (32). Tako kot pri virusu PUU smo tudi pri virusu DOB dokazali zemljepisno raznolikost virusa ter visoko filogenetsko sorodnost med virusom, pomnoženim iz naravnega gostitelja, in virusom bolnika z istega območja. Kljub temu da virus kroži po celotni osrednji Evropi, je večina smrtnih izidov bolezni prav na Balkanu, zato ena od hipotez predpostavlja, da na Balkanu kroži bolj patogena različica virusa DOB (42). Kljub temu z obsežno analizo virusov, pomnoženih neposredno iz bolnikov, mutacij v nukleotidnem zaporedju virusa nismo uspeli povezati ne z višjim bremenom virusa v krvi ne s klinično raznolikim potekom bolezni (43).

Virus Saaremaa

Poleg virusa DOB kroži v naravi med dimastimi mišmi, *A. agrarius*, virus SAA. Virus so prvič odkrili v dimasti miši, ujeti na otoku Saaremaa v Estoniji, in je razširjen po osrednji in vzhodni Evropi (44, 45). Virus SAA povzroča blažjo obliko HMRS, brez znanih smrtnih primerov. O bolnikih so poročali iz Rusije, Nemčije, Estonije, Danske ter Slovaške (38, 46–51). V Sloveniji so dimaste miši razširjene predvsem v Prekmurju in na Goriškem (32). V obeh regijah so virus SAA dokazali v naravnem gostitelju, medtem ko ga iz bolnikov niso osamili (slika 2) (32). S filogenetsko analizo so ugotovili, da se virusa DOB in SAA, izolirana z istega območja, med seboj razlikujeta 12,6–13,7%, kar pomeni, da je prilagoditev virusa na gostitelja pomembneje vplivala na evolucijo virusa kot zemljepisna razporeditev vzorcev (32).



Slika 2. Zemljepisna razporeditev hantavirusov Dobrava in Saaremaa v Sloveniji. S svetlo sivo barvo so označene preiskovane lokacije. S črno barvo so označene lokacije, na katerih smo dokazali virus Dobrava v naravnem gostitelju (občine Bovec, Cerkno, Idrija, Bled, Kranj, Medvode, Ig, Cerknica, Ilirska Bistrica, Kočevje, Črnomelj, Semič, Metlika, Dolenjske Toplice, Novo mesto, Šentjernej, Kostanjevica na Krki, Krško, Kozje, Vransko, Majšperk, Kidričevo, Podlehk, Moravske Toplice, Dobrovnik, Hodoš). S temno sivo barvo so označene lokacije, na katerih smo dokazali virus Saaremaa v naravnem gostitelju (Ajdovščina, Središče ob Dravi, Beltinci, Murska Sobota, Lendava).

Hantavirusi v žužkojedih sesalcih

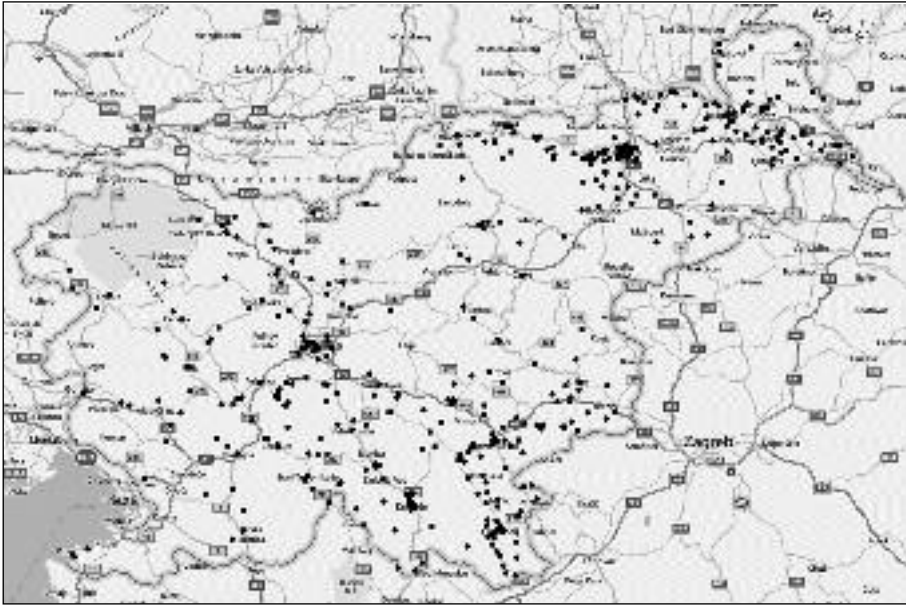
Pravzaprav je bil prvi odkriti hantavirus virus Thottapalayam (TPM), ki so ga izolirali leta 1964 iz tkiva azijske hišne rovke, *Suncus murinus*, ujeti v Indiji, vendar so ga šele desetletje kasneje uvrstili v hantavirusni rod (52, 53). Prav zato je dolgo veljalo, da je virus TPM izjema v rodu *Hantavirus*, saj virus ni povezan z glodavcem, ampak z žužkojedim rezervoarjem. Mejnik v raziskovanju hantavirusov je predstavljalo odkritje virusa Tanganya (TGN), leta 2007, ki so ga odkrili v Teresini rovk, *Crociodura theresae*, v Gvineji (54). Danes poznamo že več kot 10 žužkojedih gostiteljev, med katere spadajo tako rovke kot tudi krti. Hantaviruse, povezane z žužkojedim rezervoarjem, so odkrili povsod po svetu: virus Camp Ripley v kratkorepi rovk, *B. brevicauda*, virus Ash River v maskirani rovk, *S. cinereus*, v Severni Ameriki, virus Cao Bang (CBN) v kitajski krti rovk, *A. squamipes*, v Vietnamu, virus Asama v japonski krti rovk, *U. talpoides*, ter virus Seewis v gozdni rovk, *S. araneus*, v Švici (55–59). Prav zadnji je zemljepisno zelo razširjen v Evropi (60, 61). Kljub številnim novim odkritjem pa še ved-

no ni znano, ali so ti hantavirusi patogeni za človeka ali ne (20).

Virus Seewis

Virus SWS so prvič dokazali leta 2007 v tkivih gozdne rovke, *S. araneus*, v Švici (62). Kmalu za tem so dokazali virus SWS tudi na Finskem in Madžarskem, v Rusiji ter v državah osrednje Evrope (60, 61, 63). Gozdna rovka je razširjena v severni Evropi, vključno s Skandinavijo in Veliko Britanijo, z izjemo Irske, in v Rusiji. Zaradi agresivnih teritorialnih navad in mesojedega prehranjevanja se verjetno prenašajo hantavirusne okužbe med gostitelji preko ran (62). S filogenetskimi analizami so pokazali, da je virus SWS najbolj soroden virusu CBN in virusu TGN. Kljub temu da je virus SWS precej genetsko različen od evropskih hantavirusov, izoliranih iz glodavcev, pa je še manj soroden z virusom TPM, ki je prav tako izoliran iz žužkojede rovke (62). To pomeni, da je zemljepisna razporeditev hantavirusov bolj vplivala na evolucijo virusa kot prilagoditev na posameznega gostitelja.

V Sloveniji smo virus SWS dokazali v gozdnih rovkah, ujetih v treh slovenskih regijah: v notranjsko-kraški, goriški in podravski regiji,



Slika 3. Zemljepisna razporeditev bolnikov s hemoragično mrzlico z renalnim sindromom po Sloveniji od leta 1985 do julija 2012. Vsaka črna pika predstavlja enega bolnika.

ter dokazali dve genetski liniji virusa. Prvo genetsko linijo tvorijo zelo sorodni virusni izolati z območja Ilirske Bistrice. Druga genetska linija se razteza po vsej Sloveniji, od goriške do podravske regije, in jo tvorijo genetsko bolj raznolike različice virusa (7,8–14,6% raznolikost na nukleotidnem nivoju). Ne glede na genetsko linijo pa so slovenske različice virusa SWS najbolj sorodne virusu SWS iz Madžarske, kar samo potrjuje značilno zemljepisno raznolikost hantavirusov.

EPIDEMIOLOGIJA HEMORAGIČNE MRZLICE Z RENALNIM SINDROMOM

Bolezen je endemična na področjih, kjer ljudje sobivajo z naravnimi gostitelji virusa, do izbruha pa lahko pride zaradi nenadnega okoljskega pojava, ki prisili glodavce, da se zatečejo v človekovo bližino (21). Posamezni primeri bolezni se večinoma pojavijo pozno spomladi in poleti ter ob jesenski ohladitvi. Takrat je človek dejavnejši v naravi in je verjetnost stika z naravnimi gostitelji večja, hkrati pa se

zaradi prihajajoče zime glodavci selijo v naselja, kjer je hrane v izobilju (25).

Kljub raznovrstni ekologiji hantavirusov v Sloveniji pa povzročata HMRS le hantavirusa PUU in DOB. Virus PUU povzroča blažjo obliko bolezni, imenovano tudi *nephropathia epidemica*, ki zaradi nespecifičnih znakov pogosto spominja na vročinsko bolezen z bolečinami v trebušni votlini. Bolezen v Sloveniji ni smrtna, kljub temu pa ima virus v Evropi 2% smrtnost. Okužba z virusom DOB povzroči težjo obliko bolezni ter doseže do 12% smrtnost. Potek bolezni vključuje širok spekter kliničnih simptomov od blagega vročinskega stanja do fulminantnega hemoragičnega poteka z akutno odpovedjo ledvic in s šokom (64, 65). Prvi primer HMRS so v Sloveniji zabeležili že leta 1954 (66). Do danes je prijavljenih več kot 470 bolnikov. Kljub temu da se pojavlja HMRS v Sloveniji po vsej državi, je večina bolnikov iz štirih endemičnih regij: Ljubljana z okolico, Dolenjska, Prekmurje in Pohorje (slika 3). Poleg povečane aktivnosti v naravi je izpostavljenost hantavirusom pogosto povezana tudi s poklicnim tveganjem, predvsem pri gozdarjih in kmetovalcih (67).

LITERATURA

1. Plyusnin A, Kruger DH, Lundkvist A. Hantavirus infections in Europe. *Adv Virus Res.* 2001; 57: 105–36.
2. Klein SL, Calisher CH. Emergence and persistence of hantaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2007; 315: 217–52.
3. Kallio ER, Voutilainen L, Vapalahti O, et al. Endemic hantavirus infection impairs the winter survival of its rodent host. *Ecology.* 2007; 88 (8): 1911–6.
4. Childs JE, Glass GE, Korch GW, et al. Effects of hantaviral infection on survival, growth and fertility in wild rat (*Rattus norvegicus*) populations of Baltimore, Maryland. *J Wildl Dis.* 1989; 25 (4): 469–76.
5. Douglass RJ, Calisher CH, Wagoner KD, et al. Sin Nombre virus infection of deer mice in Montana: characteristics of newly infected mice, incidence, and temporal pattern of infection. *J Wildl Dis.* 2007; 43 (1): 12–22.
6. Gavrilovskaya IN, Apekina NS, Myasnikov Yu A, et al. Features of circulation of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) virus among small mammals in the European U.S.S.R. *Arch Virol.* 1983; 75 (4): 313–6.
7. Korva M, Duh D, Saksida A, et al. The hantaviral load in tissues of naturally infected rodents. *Microbes Infect.* 2009; 11 (3): 344–51.
8. Bernshtein AD, Apekina NS, Mikhailova TV, et al. Dynamics of Puumala hantavirus infection in naturally infected bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Arch Virol.* 1999; 144 (12): 2415–28.
9. Botten J, Mirowsky K, Ye C, et al. Shedding and intracage transmission of Sin Nombre hantavirus in the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*) model. *J Virol.* 2002; 76 (15): 7587–94.
10. Kallio ER, Klingström J, Gustafsson E, et al. Prolonged survival of Puumala hantavirus outside the host: evidence for indirect transmission via the environment. *J Gen Virol.* 2006; 87 (Pt 8): 2127–34.
11. Escutenaire S, Pastoret PP, Sjölander KB, et al. Evidence of Puumala Hantavirus infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Belgium. *Vet Rec.* 2000; 147 (13): 365–6.
12. Leighton FA, Artsob HA, Chu MC, et al. A serological survey of rural dogs and cats on the southwestern Canadian prairie for zoonotic pathogens. *Can J Public Health.* 2001; 92 (1): 67–71.
13. Malecki TM, Jillson GP, Thilsted JP, et al. Serologic survey for hantavirus infection in domestic animals and coyotes from New Mexico and northeastern Arizona. *J Am Vet Med Assoc.* 1998; 212 (7): 970–3.
14. Douron E, Moriniere B, Matheron S, et al. HFRS after a wild rodent bite in the Haute-Savoie – and risk of exposure to Hantaan-like virus in a Paris laboratory. *Lancet.* 1984; 1 (8378): 676–7.
15. Padula PJ, Edelstein A, Miguel SD, et al. Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology.* 1998; 241 (2): 323–30.
16. Wells RM, Sosa Estani S, Yadon ZE, et al. An unusual hantavirus outbreak in southern Argentina: person-to-person transmission? Hantavirus Pulmonary Syndrome Study Group for Patagonia. *Emerg Infect Dis.* 1997; 3 (2): 171–4.
17. Plyusnin A. Genetics of hantaviruses: implications to taxonomy. *Arch Virol.* 2002; 147 (4): 665–82.
18. Plyusnin A, Morzunov SP. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2001; 256: 47–75.
19. Ramsden C, Holmes EC, Charleston MA. Hantavirus evolution in relation to its rodent and insectivore hosts: no evidence for codivergence. *Mol Biol Evol.* 2009; 26 (1): 143–53.
20. Klempa B. Hantaviruses and climate change. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15 (6): 518–23.
21. Jonsson CB, Figueiredo LT, Vapalahti O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23 (2): 412–41.
22. Weiss S, Witkowski PT, Auste B, et al. Hantavirus in bat, Sierra Leone. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18 (1): 159–61.
23. Sumibcay L, Kadjo B, Gu SH, et al. Divergent lineage of a novel hantavirus in the banana pipistrelle (*Neoromicia nanus*) in Cote d'Ivoire. *Virol J.* 2012; 9 (1): 34.
24. Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist A, et al. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3 (10): 653–61.
25. Heyman P, Vaheeri A, Lundkvist A, et al. Hantavirus infections in Europe: from virus carriers to a major public-health problem. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009; 7 (2): 205–17.
26. Khaiboullina SF, St Jeor SC. Hantavirus immunology. *Viral Immunol.* 2002; 15 (4): 609–25.
27. Markotic A. Immunopathogenesis of hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. *Acta Med Croatica.* 2003; 57 (5): 407–14.
28. Schönrich G, Rang A, Lütteke N, et al. Hantavirus-induced immunity in rodent reservoirs and humans. *Immunol Rev.* 2008; 225: 163–89.
29. Saksida A, Wraber B, Avsic - Zupanc T. Serum levels of inflammatory and regulatory cytokines in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *BMC Infect Dis.* 2011; 11: 142.
30. Korva M, Saksida A, Kunilo S, et al. HLA-associated hemorrhagic fever with renal syndrome disease progression in slovenian patients. *Clin Vaccine Immunol.* 2011; 18 (9): 1435–40.
31. Avsic - Zupanc T, Petrovec M, Duh D, et al. Puumala hantavirus in Slovenia: analyses of S and M segment sequences recovered from patients and rodents. *Virus Res.* 2007; 123 (2): 204–10.
32. Avsic - Zupanc T, Nemirov K, Petrovec M, et al. Genetic analysis of wild-type Dobrava hantavirus in Slovenia: co-existence of two distinct genetic lineages within the same natural focus. *J Gen Virol.* 2000; 81 (Pt 7): 1747–55.

33. Korva M, Duh D, Puterle A, et al. First molecular evidence of Tula hantavirus in *Microtus voles* in Slovenia. *Vir Res.* 2009; 144 (1-2): 318-22.
34. Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, et al. Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. *J Infect Dis.* 1980; 141 (2): 131-4.
35. Kryštufek B. Sesalci Slovenije. Ljubljana: Prirodoslovni muzej Slovenije; 1991.
36. Plyusnina A, Aberle SW, Aberle JH, et al. Genetic analysis of Puumala hantavirus strains from Austria. *Scand J Infect Dis.* 2006; 38 (6-7): 512-9.
37. Korva M. Dokaz dveh genetskih linij hantavirusa Puumala izoliranega iz gostiteljev v Sloveniji [diplomsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2007.
38. Klempa B, Meisel H, Rath S, et al. Occurrence of renal and pulmonary syndrome in a region of northeast Germany where Tula hantavirus circulates. *J Clin Microbiol.* 2003; 41 (10): 4894-7.
39. Vapalahti O, Lundkvist A, Kukkonen SK, et al. Isolation and characterization of Tula virus, a distinct serotype in the genus *Hantavirus*, family *Bunyviridae*. *J Gen Virol.* 1996; 77 (Pt 12): 3063-7.
40. Schultze D, Lundkvist A, Blauenstein U, et al. Tula virus infection associated with fever and exanthema after a wild rodent bite. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002; 21 (4): 304-6.
41. Avsic - Zupanc T, Xiao SY, Stojanovic R, et al. Characterization of Dobrava virus: a Hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. *J Med Virol.* 1992; 38 (2): 132-7.
42. Klempa B, Schutt M, Auste B, et al. First molecular identification of human Dobrava virus infection in central Europe. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (3): 1322-5.
43. Korva M. Vpliv genetske variabilnosti v HLA lokusu in hantavirusnega tipa na patogenezo hemoragične mrzlice z renalnim sindromom [doktorska disertacija]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2011.
44. Nemirov K, Vapalahti O, Lundkvist A, et al. Isolation and characterization of Dobrava hantavirus carried by the striped field mouse (*Apodemus agrarius*) in Estonia. *The J Gen Virol.* 1999; 80 (Pt 2): 371-9.
45. Sironen T, Vaheri A, Plyusnin A. Phylogenetic evidence for the distinction of Saaremaa and Dobrava hantaviruses. *Virol J.* 2005; 2: 90.
46. Plyusnin A, Nemirov K, Apekina N, et al. Dobrava hantavirus in Russia. *Lancet.* 1999; 353 (9148): 207.
47. Garanina SB, Platonov AE, Zhuravlev VI, et al. Genetic Diversity and Geographic Distribution of Hantaviruses in Russia. *Zoonoses and public health.* 2009; 56 (6-7): 297-309.
48. Klempa B, Tkachenko EA, Dzagurova TK, et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by 2 lineages of Dobrava hantavirus, Russia. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14 (4): 617-25.
49. Golovljova I, Vasilenko V, Pruk T, et al. Puumala and Dobrava hantaviruses causing hemorrhagic fever with renal syndrome in Estonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000; 19 (12): 968-9.
50. Nemirov K, Andersen HK, Leirs H, et al. Saaremaa hantavirus in Denmark. *J Clin Virol.* 2004; 30 (3): 254-7.
51. Sibold C, Meisel H, Lundkvist A, et al. Short report: simultaneous occurrence of Dobrava, Puumala, and Tula Hantaviruses in Slovakia. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61 (3): 409-11.
52. Carey DE, Reuben R, Panicker KN, et al. Thottapalayam virus: a presumptive arbovirus isolated from a shrew in India. *Indian J Med Res.* 1971; 59 (11): 1758-60.
53. Xiao SY, Leduc JW, Chu YK, et al. Phylogenetic analyses of virus isolates in the genus *Hantavirus*, family *Bunyviridae*. *Virology.* 1994; 198 (1): 205-17.
54. Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompte E, et al. Novel hantavirus sequences in Shrew, Guinea. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13 (3): 520-2.
55. Arai S, Song JW, Sumibcay L, et al. Hantavirus in northern short-tailed shrew, United States. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13 (9): 1420-3.
56. Arai S, Bennett SN, Sumibcay L, et al. Phylogenetically distinct hantaviruses in the masked shrew (*Sorex cinereus*) and dusky shrew (*Sorex monticolus*) in the United States. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 78 (2): 348-51.
57. Song JW, Kang HJ, Song KJ, et al. Newfound hantavirus in Chinese mole shrew, Vietnam. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13 (11): 1784-7.
58. Arai S, Ohdachi SD, Asakawa M, et al. Molecular phylogeny of a newfound hantavirus in the Japanese shrew mole (*Urotrichus talpoides*). *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105 (42): 16296-301.
59. Song JW, Gu SH, Bennett SN, et al. Seewis virus, a genetically distinct hantavirus in the Eurasian common shrew (*Sorex araneus*). *Virol J.* 2007; 4: 114.
60. Yashina LN, Abramov SA, Gutorov VV, et al. Seewis virus: phylogeography of a shrew-borne hantavirus in Siberia, Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010; 10 (6): 585-91.
61. Kang HJ, Arai S, Hope AG, et al. Genetic diversity and phylogeography of Seewis virus in the Eurasian common shrew in Finland and Hungary. *Virol J.* 2009; 6: 208.
62. Song JW, Baek LJ, Schmaljohn CS, et al. Thottapalayam virus, a prototype shrewborne hantavirus. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13 (7): 980-5.
63. Schlegel M, Radosa L, Rosenfeld UM, et al. Broad geographical distribution and high genetic diversity of shrew-borne Seewis hantavirus in Central Europe. *Virus genes.* 2012; 45 (1): 48-55.

64. Avsic - Zupanc T, Petrovec M, Furlan P, et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome in the Dolenjska region of Slovenia - a 10-year survey. *Clin Infect Dis.* 1999; 28 (4): 860-5.
65. Pal E, Strle F, Avsic - Zupanc T. Hemorrhagic fever with renal syndrome in the Pomurje region of Slovenia - an 18-year survey. *Wien Klin Wochenschr.* 2005; 117 (11-12): 398-405.
66. Radosevic Z, Mohacek I. The problem of nephropathia epidemica Myhrman-Zetterholm in relation to acute interstitial nephritis. *Acta Med Scand.* 1954; 149 (3): 221-8.
67. Kraigher A, Frelj T, Korva M, et al. Increased number of cases of haemorrhagic fever with renal syndrome in Slovenia, January to April 2012. *Euro Surveill.* 2012; 17 (21). pii: 20176.

Miroslav Petrovec¹, Franc Strle²

Virus influenza – kdaj lahko pričakujemo naslednjo pandemijo?

Influenza Virus – When Can We Expect the Next Pandemic?

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: influenza A, okužbe, pandemija, patogeneza, H1N1, H5N1

Pandemije influence A se po podatkih zgodovinskih virov pojavljajo že več kot 500 let. Od leta 1510 je Zemljo obkrožilo vsaj 15 pandemij, zadnja leta 2009 s pojavom pandemskega virusa H1N1 z izvorom v prašičih. Novejše raziskave so odkrile pomembna mesta v genomu virusa, ki so ključna za pojav hude oblike bolezni z visoko smrtnostjo, in tista, ki virusu omogočajo preskok vrste gostitelja. Spremljanje okužb v živalskih rezervoarjih in pri človeku z najnovejšimi metodami molekularne biologije lahko pripomore k pravočasnemu ukrepanju ob morebitnem novem pojavu pandemije.

ABSTRACT

KEY WORDS: influenza A infections, pandemics, pathogenesis, H1N1, H5N1

Influenza A pandemics has been present in Europe for more than 500 years. From year 1510 up to these days, 15 major pandemics have been adequately described. The last pandemic occurred in 2009 with the pandemic strain of the swine H1N1 virus. Recent research revealed hot spots in the influenza virus genome associated with severity and mortality of infections as well as those required to jump host species. Strict surveillance of influenza infections with the newest molecular methods is needed both in animals and humans to assure appropriate and timely measures, should a new influenza pandemic occur.

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

² Prof. dr. Franc Strle, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana

UVOD

Influenca ali gripo povzročajo virusi influenzae, ki spadajo v družino *Orthomyxoviridae*, katerih naravni gostitelji so ptice in nekatere druge živali. V tej virusni družini je pet rodov: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Thogotovirus* in *Isavirus*. Ker je za človeka s stališča epidemij in predvsem pandemij najbolj pomemben virus influenzae A, se v tem prispevku omejujeva zgolj nanj. Samo za virus influenzae A namreč obstaja nevarnost zoonotske okužbe, zamenjave gostitelja virusa in možnost za nastanek novih pandemskih sevov virusa (1).

Za virus influenzae A je značilen segmentiran genom, sestavljen iz 8 delov negativno polarne enovijačne molekule RNA, ki kodira zapis za 11 ali 12 beljakovin. Virusi influenzae A so razdeljeni v podtippe glede na antigen ske značilnosti zunanjih glikoziliranih beljakovin hemaglutinina (HA) in nevraminidaze (NA) (1). Obstaja 17 tipov HA in 9 tipov NA. Edina živalska vrsta, ki je lahko okužena s katerim koli podtipom virusa, so divje ptice, ki so tudi naravni rezervoar virusa influenzae A.

Pri človeku so se nanj prilagojeni virusi pojavljali le pri podtipih hemaglutinina H3, H2 in H1 in podtipih nevraminidaze N1 in N2. Le izjemoma so se v preteklosti na človeka prenesli drugi podtipi virusa kot npr. virus ptičje gripe H5N1 v Aziji in H7N7 na Nizozemskem, ki pa se na človeka niso prilagodili (2, 3). Eno od najresnejših groženj predstavlja možnost, da bi se visoko patogeni tip virusa ptičje influenzae prilagodil na človeka in tako postal prenosljiv med ljudmi.

Zelo pomembna živalska vrsta so za virus influenzae tudi prašiči, ki imajo v smislu celičnega tropizma takšne biološke značilnosti, da so sprejemljivi za okužbo tako s ptičjimi kot s človeškimi virusi influenzae A. To jim omogoča posebno vlogo »mešalne posode«, ki je ključna za nastanek novih podtipov virusa, ki nastanejo ob sočasni okužbi celic z dvema različnima virusoma in izmenjavi genomskih segmentov (1). Takšno veliko preurejanje genoma imenujemo virusni premik (angl. *shift*). Novo nastali podtipi virusa kot posledica virusnega premika so podlaga za nastanek pan-

demij, saj človeštvo nima ustreznih protiteles za zaščito pred takim virusom.

Med replikacijo genoma in prenosom med gostitelji pod vplivom selekcijskega pritiska predvsem v molekuli HA nastajajo točkovne mutacije, ki zadostujejo za to, da se virus neprestano izmika imunskemu sistemu, in so podlaga za vsakoletne epidemije influenzae. Za razliko od večjega preurejanja jih imenujemo virusni odmik (angl. *drift*). Epidemije običajno zajamejo od 10 do 20% populacije. Prizadetost je lahko veliko višja v posebnih starostnih ali rizičnih skupinah populacije. Epidemije influenzae so pogost vzrok za okužbe dihal šolskih otrok in oseb v domovih za starostnike in so povezane tudi s povečano umrljivostjo. Ocenjujejo, da epidemije influenzae vsako leto zahtevajo 500.000 življenj po vsem svetu. Skupno breme epidemij med obdobji pandemij je primerljivo s tistim ob pojavu pandemije (4).

VLOGA BELJAKOVIN VIRUSA INFLUENCE A

Za razumevanje biologije, patogeneze in drugih lastnosti je nujno temeljno poznavanje osnovne zgradbe virusa influenzae A.

Hemaglutinin

Hemaglutinin ali beljakovina HA je najpomembnejši dejavnik nabora gostiteljev in patogeneze določenega seva virusa influenzae. Beljakovine HA visoko patogenih virusov vsebujejo multibazično cepilno mesto, ki ga prepoznajo ubikvitarne proteaze. To vodi v sistemsko okužbo in večorganski razsoj virusa pri pticah. Pri nizko patogenih sevih virusa ima cepilno mesto samo eno bazično aminokislino, zato nanj deluje zelo omejen nabor proteaz, ki so omejene na epitel dihal in prebavil (5). Nabor gostiteljev za določen podtip virusa določa beljakovina HA s svojo specifičnostjo vezave na receptor, ki prepoznava sialoligosaharide, zaključene z N-acetilsalicilno kislino, ki je povezana z galaktozo preko vezi alfa 2, 6 ali alfa 2, 3. Človeški virusi influenzae imajo višjo afiniteto za povezavo alfa 2, 6, ptičji virusi pa se bolje vežejo na povezavo alfa 2, 3. Epitelne celice človeškega sapnika izražajo na površini oligosaharide z vezmi alfa 2, 6, epitelne celice v črevesu rac pa alfa 2, 3.

Pomembno dejstvo je, da epitelne celice v sapniku prašičev izražajo oba tipa poveza-ve, kar zelo verjetno pojasnjuje možnost okužbe prašičev s človeškimi in ptičjimi viru-si influence.

Beljakovina PB2

Beljakovina PB2, ki predstavlja del polimera-ze RNA, je pglavlni dejavnik patogenosti virusa za sesalce. V primeru, da je na mestu 627 aminokislina lizin, to omogoča učinkovi-to razmnoževanje virusa v spodnjih in zgor-njih dihalih, kar je verjetno ključno za uspešen prenos virusa. V primeru, da je na tem mestu glutamska kislina, kot je to v primeru ptičjih virusov, se virus ne razmnožuje v zgornjih, ampak samo v spodnjih dihalih (5).

Beljakovina NS1

Beljakovina NS1 zavira delovanje z interfe-ronom pogojene protivirusne celične aktivno-sti. Ista beljakovina moti tudi aktivacijo RNAze L, ki je kritični dejavnik pri aktivaciji prirojenega imunskega odziva. NS1 zavira tudi virusno pogojeno aktivacijo RIG-I, ki je pglav-litni receptor za prepoznavo patogenov (5).

Beljakovina PB1-F2

Beljakovino PB1-F2 kodira drugi bralni okvir segmenta PB1 pri človeških in ptičjih viru-sih. Inducira pojav apoptoze z delovanjem na mitohondrijske beljakovine. Sprememba ene same aminokislina v beljakovini PB1-F2 ključ-no vpliva na virulenco visoko patogenega seva H5N1 in tudi izvornega virusa H1N1, ki je povzročil pandemijo leta 1918 (5).

ZGODOVINA PANDEMIJ INFLUENCE A

Zgodovina okužb pred letom 1918 temelji predvsem na pisnih virih in zelo malo na kon-kretnih viroloških podatkih. Kljub temu stro-kovnjaki iz pisnih virov utemeljeno sklepajo, da je moč številne zgodovinske zapise o izbru-hih boleznih pri ljudeh in živalih nedvomno pripisati pandemijam influence. Strokovnja-ki menijo, da je bilo v zadnjih 500 letih vsaj 14 pandemij. V zadnjih 120 letih so bile pan-demije v letih 1889, 1918, 1957, 1968 in 2009.

Nekateri raziskovalci med pandemije prište-vajo tudi izbruh ruske influence leta 1977 (6).

Tako kot zelo verjetno prvo pandemijo opisujejo okužbo, ki se je pojavila meseca juli-ja leta 1510 na Siciliji, kamor je prispela s tr-govskimi ladjami iz Afrike, in se bliskovito razširila po Evropi. Zanimivo je, da so se tudi v preteklosti epidemije širile po določenih zemljepisnih vzorcih. Vse tri pandemije so se v 16. stoletju začele v Sredozemlju in se po trgovskih poteh širile iz smeri jugovzhoda na severozahod. Dvesto let kasneje pa se je smer popolnoma spremenila. Pandemije, ki so naj-verjetneje nastale v Aziji v letih 1729, 1733, 1781, 1833–1836 in 1889, so se širile na zahod, preko Rusije na sever Evrope in šele kasneje na jug Evrope. Tudi v času, ko še ni bilo letal-skega prometa, so se pandemije širile z izjem-no hitrostjo. Iz opisov sodeč so tudi v daljni zgodovini nastanek večine pandemij pripiso-vali azijskemu kontinentu (6).

Pandemija španske gripe leta 1918

V letih 1918 in 1919 je svet obšla epidemija gripe, ki je zahtevala med 20 in 80 milijonov življenj, predvsem mlajših ljudi. Okužbo je povzročil virus influence A tipa H1N1. Izola-ti virusa se iz časa pandemije niso ohranili, saj takrat pravzaprav še ni bilo jasno, kaj je povzročilo pandemijo.

Leta 2005 so znanstveniki objavili rezul-tate raziskave, v kateri so s tehnikami reverz-ne genetike iz parafinskih blokov tkiv, odvze-tih bolnikom, ki so umrli zaradi influence, in tkiv, pridobljenih iz trupel pokopanih na Alja-ski v stalno zamrznjeno zemljo v letu 1918, znova sestavili vse segmente genoma virusa in virus tudi uspešno pomnožili v celicah (7). To je omogočilo natančno analizo virusa, ki je povzročil največjo pandemijo v zgodovini človeštva. Raziskovalci so potrdili, da je imel virus H1N1 svoj izvor v pticah in se je verjet-no že pred pandemijo določen čas pomnože-val v sesalcih. Znanstveniki so ugotovili, da so glavni dejavniki, ki kritično vplivajo na viru-lenco virusa influence A, beljakovina HA, replikacijski kompleks in beljakovini NS1 in PB1-F2. Zanimivo je, da pri tem virusu manj-kajo nekatera značilna zaporedja aminokislin (npr. multibazično cepilno mesto na HA in ami-nokislina lizin na mestu 627 beljakovine PB2),

ki so sicer značilna za viruse influence A z visoko patogenostjo (5).

Najbolj zanimivo je dejstvo, da je virus H1N1 iz leta 1918 ostal izhodišče, t. i. »mati« vseh pandemij v dvajsetem stoletju, saj so vsi pandemski tipi virusa potomci virusa H1N1 iz leta 1918 (8).

Azijska influenza 1957

Leta 1957 se je pojavil nov virus influence A s prerazporejenim genomom med človeškim virusom H1N1 in ptičjim virusom H2N2. Nastal je nov človeški virus H2N2, ki je vseboval dele virusa iz ptic H2 HA, N2 NA, in PB1. Virus so poimenovali azijska influenza, ki je zahtevala več kot milijon življenj po vsem svetu (8).

Influenca Hongkong 1968

Leta 1968 se je pojavil pandemski sev H3N2, ki je vseboval H3 HA- in PB1-gene ptičjega virusa v siceršnji osnovi človeškega virusa. Virus je v Združenih državah Amerike zahteval 33.800 življenj, kar je manj kot v prejšnjih pandemijah. Verjetno so k temu pripomogla protitelesa proti N2 iz prejšnje pandemije (8).

Pandemija virusa H1N1-SOIV v letu 2009

Leta 2009 se je v Mehiki v februarju začela zadnja pandemija virusa influence A, ki jo je povzročil virus H1N1-SOIV (angl. *swine origin influenza virus*, SOIV) z izvorom v svinjah. Predvidevajo, da je virus že nekaj mesecev pred izbruhom v omejenem obsegu krožil med ljudmi. Pandemske razsežnosti novega virusa so postale očitne konec meseca aprila 2009, ko je Mehiko prizadel prvi val širjenja bolezni. Virus se je bliskovito razširil po vsem svetu in 27. aprila 2009 je Svetovna zdravstvena organizacija uradno razglasila pandemijo (5).

Virus H1N1-SOIV, ki je povzročil pandemijo leta 2009, ni enak virusu H1N1, ki je pred tem povzročal vsakoletne epidemije influence pri ljudeh, čeprav imata oba virusa hemaglutinin, ki neposredno izvira iz virusa H1N1 iz leta 1918 (9). Hemaglutinin »človeškega« virusa H1N1, ki je krožil v ljudeh kot sezonski virus influence, je bil namreč več kot sedem desetletij izpostavljen antigenskemu in dru-

gim selektivnim pritiskom kroženja v istem gostitelju – človeku. Nasprotno se je virus, ki je leta 1918 med pandemijo influence preskočil na svinje in postal avtonomen virus, v svinjah razmnoževal brez evolucijskega pritiska, saj zaradi kratkega življenja svinj ni verjetna ponovna okužba te živali z istim virusom in posledičen pritisk imunskega sistema na evolucijo virusa (10). Razmeroma genetsko stabilen virus se je v svinjah razvil v t. i. virus klasične gripe svinj v Severni Ameriki in je v njih krožil vse dvajseto stoletje. Pred začetkom pandemije 2009 pa se je ta virus rekombiniral z drugimi virusi, a kljub temu zadržal 90% aminokislinsko identičnost beljakovine H s svojim virusnim predhodnikom iz leta 1918. Beljakovina H človeškega sezonskega virusa H1N1 pa se je v času od leta 1918 pod pritiskom tako spremenila, da je z izvornim virusom v aminokislinskem zaporedju podobna le še v 79%. Taka različnost v zunanji beljakovini virusa pa ne omogoča več navzkrižne zaščite s protitelesi, ki so jih ljudje pridobili v desetletjih kroženja človeškega virusa H1N1, proti novemu pandemskemu virusu, ki je nastal leta 2009. Novo nastali virus vsebuje šest segmentov (PB2, PB1, PA, HA, NP in NS) iz originalnih ptičjih, človeških in svinjskih trojno prerazporejenih virusov. Segmenta NA in M novega virusa izhajata iz evropskega »ptičjemu podobnega« virusa prašičev (10).

Večina kliničnih primerov bolezni je bila blagih in ni potrebovala bolnišničnega zdravljenja. Bolezen je izrazito prizadela mlajše ljudi in otroke ter zelo redko starejše od 60 let. Kljub temu so bili odkriti nekateri novi dejavniki, ki so vplivali na težo in smrtnost bolezni, kot sta nosečnost in debelost. Drugi dejavniki tveganja so bili astma, kronična pljučna bolezen, imunska oslABLjenost in sladkorna bolezen. Kljub temu je zaradi pandemije virusa H1N1-SOIV na svetu umrlo okrog 20.000 ljudi, mnogi med njimi brez jasnih dejavnikov tveganja za hudo bolezen (9).

DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA POJAV PANDEMIJ

Do pojava zadnje pandemije leta 2009 je veljalo dokaj trdno prepričanje, da je nujni ali vsaj prevladujoči mehanizem za pojav novega pandemskega virusa influence A preurejanje

(angl. *reassortment*) virusnega genoma (4). Danes pa je jasno, da je za pojav pandemij influence A krivo veliko število zapletenih dejavnikov, ki lahko v določenih primerih vodijo v nastanek novih virusnih sevov z velikimi možnostmi hitrega širjenja in visoke patogenosti in smrtnosti (4). Žal je večina teh dejavnikov še zelo slabo poznanih.

Pandemije so v preteklosti nastale zaradi različnih mehanizmov genske spremenljivosti virusa influence A:

- prenosa genov virusa ptičje influence v človeku prilagojen virus s preurejanjem genov (leta 1957 in leta 1968),
- prilagoditvijo drugim sesalcem prilagojenih virusov na človeka (leta 2009) in
- prilagoditvijo ptičjih virusov influence na človeka (leta 1918).

Virologi še vedno ne razumejo osnovnih mehanizmov nastanka, kako ti novi virusi nastanejo, koliko časa potrebujejo za prilagoditev na človeka in v kakšnih okoliščinah sploh nastanejo razmere za preskok na novega gostitelja (4).

NOVEJŠE RAZISKAVE O PRENOSLJIVOSTI VIRUSA H5N1

V letu 2011 sta za veliko razburjenje v strokovni in laični javnosti poskrbeli dve raziskovalni skupini, ki sta neodvisno raziskovali patogenezo okužb z virusom H5N1 (11). V teh raziskavah so poskusili natančno ugotoviti, katere genetske spremembe so potrebne, da se visoko patogeni virus, ki v osnovi ni prenosljiv preko aerosola, lahko spremeni tako, da postane prenosljiv z aerosolom. Še pred objavo rezultatov je prišlo do posredovanja ameriške Nacionalne znanstvene komisije za biološko varnost (angl. *National Science Advisory Board for Biosecurity*) in Svetovne zdravstvene organizacije. Najprej je bil sprejet celo moratorij na objavo natančnih rezultatov obeh raziskav, ki pa so ga kasneje po posvetovanjih z raziskovalci umaknili (12). Nekateri strokovnjaki so zagovarjali tezo, da je javna objava natančnih podatkov o genetskih mestih, ki se morajo spremeniti, da virus postane prenosljiv z aerosolom, podobna objavi načrta za izdelavo jedrskega orožja (13). Nasprotniki

take odločitve, vrhunski strokovnjaki s področja raziskav influence, so nasprotovali z močnimi argumenti, da je treba poznati vsa taka mesta, ki ključno prispevajo k patogenezi influence, da bi bolje razumeli patogenezo bolezni in omogočili razvoj novih cepiv in zdravil (14, 15). Spomnili so tudi, da so bile vse izmed odkritih mutacij že odkrite posamično pri t. i. divjih virusih (angl. *wild type*), osamljenih iz živali v divjini (16, 17).

ZAKLJUČKI

Čeprav se pandemije influence pojavljajo že vsaj 500 let, se klinična slika in potek okužbe z virusom influence A nista spremenila (18). Prav tako se niso bistveno spremenile osnovne epidemiološke značilnosti, kot sta usmerjeno zemljepisno širjenje ter eksplozivno širjenje z visokim številom okuženih in s povečano umrljivostjo. Kljub temu pa je sodoben pogled na pojav pandemij influence A kompleksen (4). Zaradi številnih neznank in spremenljivk, ki vplivajo na pojav pandemskih virusov, je časovno napovedovanje pojava naslednje pandemije influence nemogoče.

Najnovejši izsledki raziskav in izkušnje iz nedavne pandemije narekujejo obširno spremljanje virusa influence A na molekularnem nivoju v naravnih rezervoarjih pticah, v prašičih in tudi pri ljudeh (17). Dejstvo je, da si samo tako lahko zagotovimo nekaj prednosti pred virusom pri pripravi ukrepov, kot so ustrezno cepivo, zaloga učinkovitih zdravil in pripravljenost širšega zdravstvenega sistema. Kljub temu pa strokovnjaki dvomijo v verjetnost, da bi s temi podatki lahko preprečili naslednjo pandemijo ali da bi se lahko v popolnosti pripravili na vse posledice nove pandemije virusa influence A (19).

Z novimi tehnikami, npr. globokega sekveniranja, bo mogoče ugotoviti številne še neznane, a pomembne dejavnike, ki na strani virusa ali gostitelja vplivajo na hud ali celo smrten potek bolezni (17). Zaradi tega bo v prihodnosti mogoče sprejeti natančnejše, učinkovitejše in ekonomsko vzdržnejše ukrepe kot pri pojavu zadnje pandemije leta 2009.

LITERATURA

1. Koren S, Maver P, Jelen M. Ortomiksovirusi. In: Poljak M, Petrovec M, eds. Medicinska virologija. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011. p. 125–36.
2. Van Kerkhove MD, Mumford E, Mounts AW, et al. Highly pathogenic avian influenza (H5N1): pathways of exposure at the animal-human interface, a systematic review. PLoS ONE. 2011; 6 (1): e14582.
3. Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. Lancet. 2004; 363 (9409): 587–93.
4. Morens DM, Taubenberger JK. Pandemic influenza: certain uncertainties. Rev Med Virol. 2011; 262–84.
5. Kawaoka Y, Neumann G. Influenza viruses: an introduction. In: Kawaoka Y, Neumann G, eds. Influenza Virus. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. p. 1–9.
6. Morens DM, Taubenberger JK, Folkers GK, et al. Pandemic influenza's 500th anniversary. Clin Infect Dis. 2010; 51 (12): 1442–4.
7. Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. Science. 2005; 310 (5745): 77–80.
8. Elderfield R, Barclay W. Influenza pandemics. Adv Exp Med Biol. 2011; 719: 81–103.
9. Cheng VCC, To KKW, Tse H, et al. Two Years after Pandemic Influenza A/2009/H1N1: What Have We Learned? Clin Microbiol Rev. 2012; 25 (2): 223–63.
10. Medina RA, García-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. Nat Rev Microbiol. 2011; 9 (8): 590–603.
11. Herfst S, Schrauwen EJA, Linster M, et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. Science. 2012; 336 (6088): 1534–41.
12. Herfst S, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. The future of research and publication on altered H5N1 viruses. J Infect Dis. 2012; 205 (11): 1628–31.
13. Berns KI, Casadevall A, Cohen ML, et al. Public health and biosecurity. Adaptations of avian flu virus are a cause for concern. Science. 2012; 335 (6069): 660–1.
14. Kawaoka Y. H5N1: Flu transmission work is urgent. Nature. 2012; 482 (7384): 155.
15. Fouchier RAM, Herfst S, Osterhaus ADME. Restricted data on influenza H5N1 virus transmission. Science (New York, N.Y.). 2012; 335 (6069): 662–3.
16. Palese P, Wang TT. H5N1 influenza viruses: Facts, not fear. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 109 (7): 2211–3.
17. Russell CA, Fonville JM, Brown AEX, et al. The potential for respiratory droplet-transmissible A/H5N1 influenza virus to evolve in a mammalian host. Science [internet]. 2012 [citirano 2012 Oct 7]; 336 (6088): 1541–7. Dosegljivo na: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1222526>
18. Taubenberger JK, Morens DM. Influenza: the once and future pandemic. Public Health Rep. 2010; 125 Suppl 3: 16–26.
19. Guterl F. Waiting to explode. Sci Am. 2012; 306 (6): 64–9.

Olga Zorman Rojs¹, Brigita Slavec², Joško Račnik³, Uroš Krapež⁴, Marko Zadavec⁵,
Alenka Dovč⁶, Aleksandra Hari⁷, Tomi Trilar⁸, Tatjana Avšič - Županc⁹

Pojavnost povzročiteljev aviarnne influence in vročice zahodnega Nila pri pticah v Sloveniji

Incidence of Avian Influenza and West Nile in Birds in Slovenia

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: prostoživeče ptice, virus zahodnega Nila, virus influence tipa A

Prostoživeče ptice so lahko okužene z vrsto mikroorganizmov, ki lahko povzročijo obolenja pri ljudeh in domačih živalih. Ptice lahko zbolijo same ali pa so le prenašalke in rezervoar teh patogenov. Aviarna influenza in vročica zahodnega Nila sta zoonozi, kjer ptice igrajo pomembno vlogo. V članku so prikazani rezultati spremljanja okuženosti prostoživečih ptic z virusom zahodnega Nila in virusi aviarnne influence v zadnjih petih letih. Z raziskavo smo protitelesa proti virusu zahodnega Nila potrdili pri 3,66 % ptic pevk, prav tako tudi pri fazanih. Zanimanje za morebitno okuženost prostoživečih ptic z virusi aviarnne influence v svetu je vzpodbudil predvsem pojav H5N1. Tako kot v drugih državah tudi pri nas izvajamo aktivni in pasivni monitoring divjih ptic. V obdobju od leta 2008 do 2011 smo pri pticah potrdili 39 virusov aviarnne influence. Večino virusov, ki so pripadali različnim podtipom, smo ugotovili pri racah mlakaricah, pozitivni pa so bili tudi labodi grbci, bela štorcklja in rumenonogi galeb. Visoko patogenega virusa aviarnne influence v tem obdobju nismo potrdili.

ABSTRACT

KEY WORDS: wild birds, West Nile virus, influenza virus type A

Wild birds can be infected with a number of pathogenic microorganisms that are transmissible to humans and domestic animals. They carry emerging zoonotic pathogens either as reservoir hosts or by dispersing infected arthropod vectors. Two very important pathogens with

¹ Izr. prof. dr. Olga Zorman Rojs, dr. vet. med., Inštitut za zdravstveno varstvo perutnine, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Cesta v Mestni log 47, 1000 Ljubljana; olga.zorman-rojs@vf.uni-lj.si

² Asist. strok. sod. dr. Brigita Slavec, dr. vet. med., Inštitut za zdravstveno varstvo perutnine, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Cesta v Mestni log 47, 1000 Ljubljana

³ Doc. dr. Joško Račnik, dr. vet. med., Inštitut za zdravstveno varstvo perutnine, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Cesta v Mestni log 47, 1000 Ljubljana

⁴ Doc. dr. Uroš Krapež, dr. vet. med., Inštitut za zdravstveno varstvo perutnine, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Cesta v Mestni log 47, 1000 Ljubljana

⁵ Asist. dr. Marko Zadavec, dr. vet. med., Inštitut za zdravstveno varstvo perutnine, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Cesta v Mestni log 47, 1000 Ljubljana

⁶ Izr. prof. dr. Alenka Dovč, dr. vet. med., Inštitut za zdravstveno varstvo perutnine, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Cesta v Mestni log 47, 1000 Ljubljana

⁷ Mag. Aleksandra Hari, dr. vet. med., Veterinarska uprava Republike Slovenije, Ministrstvo za kmetijstvo in okolje, Dunajska cesta 22, 1000 Ljubljana.

⁸ Dr. Tomi Trilar, univ. dipl. biol., Prirodoslovni muzej Slovenije, Prešernova cesta 20, 1000 Ljubljana

⁹ Prof. dr. Tatjana Avšič - Županc, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

zoonotical potential are the influenza A virus and the West Nile virus. In the paper, the results of monitoring free-living birds either with the West Nile virus or the avian influenza virus in last five years are presented. Specific antibodies against the West Nile virus were detected in 3.66% of the examined wild birds. Pheasants from two different locations were also serologically positive. The emergence of H5N1 in different animal species and humans led to global surveillance of the avian influenza viruses. Slovenia, like other countries, accepted the surveillance program for the early detection of avian influenza viruses in birds. In the period from 2008 to 2011, 39 avian influenza viruses were detected using molecular methods. All of them were low pathogenic strains. The highest prevalence of avian influenza viruses was in mallard ducks, although some were also detected in mute swans, yellow-legged gulls and white storks.

UVOD

Prostoživeče ptice lahko prenašajo številne povzročitelje bolezni. Ob tem lahko zbolijo same ali pa so vir okužb za domačo perutnino, druge vrste živali in človeka.

Bolezen ali vročica zahodnega Nila (angl. *West Nile fever*, WNF) je zoonoza in jo povzroča arbovirus (angl. *arthropod-borne virus*). Praviloma se omenjeni virusi ne širijo z vretenčarja na vretenčarja brez pomoči členonožca. Členonožec ima vlogo prenašalca in se ponavadi okuži s pitjem krvi na gostitelju v času viremije. Prenašalec prenese virus s pikom ali ugrizom na občutljivega gostitelja ptice pevke, še posebej prostoživeče vrste, ki so glavni gostitelji virusa zahodnega Nila (angl. *West Nile virus*, WNV). WNV je bil ugotovljen pri več kot 326 različnih vrstah ptic in pri perutnini. Glavni prenašalci virusa so komarji, ki se hranijo na pticah. Naključni, končni gostitelji so predvsem konji in ljudje, ki za obstoj WNV v naravi niso pomembni (1, 2).

Pojavi okužb z virusi influence A (angl. *avian influenza virus*, AIV) pri ljudeh in živalih so v zadnjem desetletju postali skrb vzbujajoče dejstvo. Virus je razširjen med pticami po vsem svetu. Divje ptice, posebno vodne, ki so nosilci in prenašalci, razširjajo virus z izločki in iztrebki. Mnoge med njimi nikoli ne zbolijo, predstavljajo pa vir okužbe za druge vrste ptic in sesalce.

AIV uvrščamo v družino *Orthomyxoviridae*. Genom virusa influence A je sestavljen iz osmih kosov linearne, enovijačne RNA. Glavni antigeni determinanti sta transmembranska glikozilirana proteina hemaglutinin (H) in nevraminidaza (N). Viruse influence A de-

limo na podlagi antigenosti teh dveh površinskih proteinov v različne podtippe – obstaja 16 podtipov H (H1–H16) in 9 podtipov N (N1–N9). Tako H kot N sta podvržena mutacijam predvsem v antigenih mestih, kar zmanjšuje ali inhibira vezavo nevtralizacijskih protiteles in tako omogoča neovirano razmnoževanje novih virusnih podtipov. Okužbe z različnimi podtipi AIV se pri pticah in sesalcih kažejo v različnih oblikah bolezni, od asimptomatskih do resnih obolenj z visoko smrtnostjo. Nekateri sevi, še posebno sevi podtipa H5 in H7, povzročajo bolezen in visok pogin pri domači perutnini in tudi pri sesalcih (3–6).

Nadzor morebitnih okužb prostoživečih ptic z AIV se izvaja v naši državi bolj ali manj intenzivno že od leta 2005, vse od pojava virusa H5N1 (tabela 1). Nadzor izvajamo tako pri poginjenih (pasivni monitoring) kot tudi pri živih prostoživečih pticah (aktivni monitoring).

MATERIAL IN METODE

Virus zahodnega Nila

Vzorci

Ptice pevke in druge manjše vrste ptic smo lovili v obdobju jesenske in pomladanske selitve ptic v letih 2008 in 2009. Ptice smo klinično pregledali in jim odvzeli vzorce krvi. Uspešno smo odvzeli vzorce 464 živalim, ki so pripadale 27 vrstam (tabela 2). Najštevilčnejše so bile zastopane črnoglavke (*Sylvia atricapilla*), vrtnice penice (*Sylvia borin*), poljski vrabci (*Passer montanus*), taščice (*Erethacus rubecula*) in rumeni vrtniki (*Hippolais icteri-*

na). Od drugih vrst ptic so bile najpogostejše bele štokljke (*Ciconia ciconia*) ter vijeglavke (*Jynx torquilla*) (tabela 3). Vzorce krvi smo odvzeli tudi različnim vrstam ptic dvoriščne perutnine. Vzorčene vrste perutnine so bile race, kokoši, purani in fazani (tabela 4).

Dokaz protiteles proti virusu zahodnega Nila

V serumih različnih ptic in perutnine smo dokazovali specifična protitelesa IgG proti WNV z metodo posredne imunofluorescence (angl. *indirect immunofluorescence*, IIF). Kot antigen smo uporabili virus zahodnega Nila (WN(E101)01.71), ki nam ga je poslal dr. Herve Zeller (*Institut Pasteur*, Lyon, Francija). Virus smo namnožili v liniji celic Vero E-6. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili vzorec divje ptice, pozitiven proti WNV, ki smo ga prav tako dobili z omenjenega inštituta. Vse vzorce serumov smo pregledovali pri razredčini 1 : 10.

Virusi influence A

Vzorci

V obdobju od leta 2008 do 2011 smo v okviru pasivnega in aktivnega monitoringa pregledali 1.430 vzorcev ptic, ki so pripadale 11 različnim rodovom (tabela 1). Za virološke preiskave – tako za molekularne kot tudi za izolacijo virusa na kokošjih embrijih – smo uporabili suhe brise sapnikov in kloake.

Vzorce smo pripravili, kot so opisali Račnik in sodelavci (7).

Molekularne preiskave

Za izolacijo celokupne RNA iz brisov smo uporabili Qiaamp DNA mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Nemčija).

Za ugotavljanje AIV smo uporabili delno modificirano metodo obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (angl. *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, RT-PCR) za pomnoževanje dela gena za M-protein, ki jo za diagnostiko priporoča referenčni laboratorij Evropske skupnosti (8). Namesto priporočenega smo uporabili kit Quantifast RT-PCR (Qiagen GmbH, Hilden, Nemčija) v 15 µl končnem volumnu. Temperaturni pogoji so obsegali obratno transkripcijo 10 min pri 50 °C in denaturacijo pri 95 °C 5 min. Sledilo je 40 ponovitev po 10 sekund denaturacije pri 95 °C in 30 sekund pomnoževanja pri 60 °C.

Vzorce, pozitivne na M-gen, smo nadalje preiskali na podtipе ter poskušali izolirati virus na kokošjih embrijih. Za ugotavljanje podtipov H5 in H7 kot tudi za določanje nukleotidnega zaporedja smo uporabili konvencionalni RT-PCR z oligonukleotidnimi začetniki, ki jih je opisala Starickova s sodelavci, priporočenimi s strani referenčnega laboratorija Evropske unije (EU) (9, 10). Vzorce, ki so bili pozitivni na M-gen in hkrati negativni na podtipa H5 in H7, smo preiskali tudi na druge podtipе H-gena (11).

Tabela 1. Število prostoživečih ptic, ki smo jih preiskali na viruse influence A v obdobju 2008–2011.

Skupina ptic	Red	Število pregledanih prostoživečih ptic			
		2008	2009	2010	2011
Vodne ptice	<i>Anseriformes</i>	290	283	147	145
	<i>Ciconiiformes</i>	61	16	28	22
	<i>Charadriiformes</i>	19	20	8	8
	<i>Pelecaniformes</i>	2	1	1	3
	<i>Podicipediformes</i>	1	0	2	0
	<i>Gruiformes</i>	1	2	2	2
Ptice roparice	<i>Falconiformes</i>	5	12	53	33
Druge prostoživeče ptice	<i>Passeriformes</i>	54	66	14	24
	drugi rodovi	47	12	28	18
Skupaj		480	412	283	255

Pomnožene produkte verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) smo z agarozno gelsko elektroforezo določili v 1,8-odstotnem agaroznem gelu. Specifične pomnožke smo iz gela izrezali in očistili s komercialnim kompletom Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, ZDA). Določanje nukleotidnega zaporedja smo izvedli z ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, VB). Nukleotidna in prevedena aminokislinska zaporedja smo analizirali s programom BLAST in jih primerjali z že znanimi zaporedji v Gen-Bank (12, 13).

Izolacija virusov aviarne influence

Vzorci brisov, ki so bili pozitivni na M-gen, smo nasadili v pet specifičnih patogenov prostih (angl. *specific pathogen free*, SPF) kokošjih embrijev, starih 9–11 dni (14). Alantoisno tekočino smo preiskali na prisotnost hemaglutinacijske aktivnosti in podtipa (H) določili v testu inhibicije hemaglutinacije z uporabo poliklonalnih specifičnih serumov (H1–H16, VLA, VB).

REZULTATI IN RAZPRAVA

Različne vrste ptic so različno dovzetne za okužbo z WNV. Ptice pevke (*Passeriformes*) in pobrežniki (*Charadriiformes*) so najdovzетnejši ter razvijejo najdaljšo in najvišjo viremijo med vsemi vrstami ptic. Najmanj dovzetne so ptice iz redov papig (*Psittaciformes*) in kur (*Galliformes*). Prostoživeče ptice selivke so vpletene v mehanski prenos in vnos WNV na različna območja Evrope v času pomladanske selitve, saj lahko prenesejo WNV iz različnih prezimovališč v Afriki. Virus lahko vnesejo med lokalne populacije ptic na novem območju (15–17).

Prvo večjo raziskavo o razširjenosti WNV pri pticah v Sloveniji je opravil Račnik (18). Rezultati te obsežne epidemiološke študije, ki je bila opravljena med leti 2003 in 2006, so pokazali, da v Sloveniji kroži WNV. Seroško pozitivne ptice je ugotovil med pticami pevkami, mestnimi golobi kot tudi v rejah fazanov. V tabeli 2 prikazujemo rezultate seroloških preiskav ptic pevk, ki smo jih opravili v letih 2008–2009.

Tabela 2. Rezultati metode posredne imunofluorescence virusa zahodnega Nila pri ujetih pticah pevkah. n – število ptic, + – število serološko pozitivnih ptic, % – število serološko pozitivnih ptic v odstotkih, IIF – posredna imunofluorescenca (angl. *indirect immunofluorescence*), WNV – virus zahodnega Nila (angl. *West Nile virus*).

Ptice pevke Slovensko ime	IIF WNV 2008–2009		
	n	+	%
Biča trstnica	15	1	6,66
Črnoglavka	140	5	3,57
Dlesk	1	0	0
Drevesna cipa	1	0	0
Grmovščica	3	0	0
Kmečka lastovka	1	0	0
Kobilčar	1	0	0
Kos	2	1	50,00
Kovaček	1	0	0
Mali slavec	4	0	0
Mlinarček	1	0	0
Močvirnska trstnica	1	0	0
Modra taščica	2	0	0
Poljski vrabec	26	0	0
Rakar	11	0	0
Rjava penica	7	0	0
Rjavi srakoper	3	0	0
Rumeni vrtnik	20	1	5,00
Siva vrana	7	0	0
Sivi muhar	1	0	0
Srpična trstnica	16	0	0
Ščinkavec	2	0	0
Taščica	25	2	8,00
Veliki slavec	2	0	0
Vrbja listnica	1	0	0
Vrtna penica	167	7	4,19
Zelenec	3	0	0
Skupaj	464	17	3,66

Ptice, pri katerih smo potrdili specifična protitelesa, so pripadale naslednjim vrstam: črnoglavka, vrtna penica, taščica, biča trstnica in rumeni vrtnik. Vse ptice so bile mladi, enoletni osebk, ki so se izlegle v letu ulova. Le ena serološko pozitivna črnoglavka je bila odrasel osebek. Pozitivni kos, ki smo ga ujeli in vzorčili leta 2009, pa je bil še juvenilni osebek, kar vzbuja sum, da se je žival okužila na območju Slovenije. Tudi v študijah, ki so jih opravili raziskovalci v Veliki Britaniji in Nemčiji, so nekajkrat dokazali protitelesa proti WNV tudi pri mladih pticah, ki še niso imele možnosti selitve (19). Med drugimi vrstami

Tabela 3. Rezultati metode posredne imunofluorescence virusa zahodnega Nila pri drugih vrstah ptic. n – število ptic, + – število serološko pozitivnih ptic, % – število serološko pozitivnih ptic v odstotkih, IIF – posredna imunofluorescenca (angl. indirect immunofluorescence), WNV – virus zahodnega Nila (angl. West Nile virus).

Druge vrste ptic	IIF WNV 2008–2009		
	n	+	%
Slovensko ime			
Vodomec	1	0	0
Mlakarica	2	0	0
Veliki detelj	1	0	0
Vijeglavka	8	0	0
Mokož	1	0	0
Bela štoklja	17	0	0
Črna štoklja	1	0	0
Labod grbec	6	0	0
Skupaj	37	0	0

ptic nismo ugotovili specifičnih protiteles proti WNV (tabela 3).

Okužbe z WNV pri domači perutnini so zelo redke in na splošno velja, da so kokoši in purani manj dovzetni za WNV. Večina podatkov o vplivu WNV na njihov organizem je pridobljenih na podlagi umetne okužbe. Za okužbo z WNV so najbolj dovzetne domače gosi (rod *Anseriformes*). Izbruh bolezni zahodnega Nila se je pojavil pri domačih gosih na območju Izraela in na Madžarskem (19). Izmed 268 vzorcev, ki smo jih odvzeli domači perutnini, sta bila pozitivna dva fazana, eden s področja Brkinov in drugi s področja Belincev (tabela 4).

Tabela 4. Rezultati metode posredne imunofluorescence WNV pri dvoriščni perutnini. n – število ptic, + – število serološko pozitivnih ptic, % – število serološko pozitivnih ptic v odstotkih, IIF – posredna imunofluorescenca (angl. indirect immunofluorescence), WNV – virus zahodnega Nila (angl. West Nile virus).

Dvoriščna perutnina	IIF WNV 2008–2009		
	n	+	%
Slovensko ime			
Domača rasa	127	0	0
Fazan	125	2	1,6
Kokoš	10	0	0
Puran	6	0	0
Skupaj	268	2	0,74

Rezultati naših raziskav potrjujejo, da je virus WNV v Sloveniji endemičen, saj smo protitelesa potrdili pri mladih pticah in pticah, ki se ne selijo, kot tudi pri dvoriščni perutnini. Vse do zadnjega desetletja so bili pojavi aviarnе influence pri perutnini v svetu dokaj redki. Visoko patogeni (angl. *highly pathogenic avian influenza*, HPAI) sev H5N1, ki je bil prvič potrjen pri gosih na Kitajskem leta 1996, kasneje pa se je razširil na skoraj vse celine in povzročil izjemno veliko gospodarsko škodo zaradi pomora več sto milijonov perutnine in obolenja ljudi, je povsem spremenil odnos širše javnosti do te bolezni (6, 20). Po letu 2005 je v EU prišlo do vrste sprememb v zakonodaji in do večjega poudarka na zgodnjem odkrivanju AIV pri pticah. AIV lahko povzročijo obolenja praktično pri vseh pticah, potrjeni so bili pri preko 100 vrstah ptic iz 25 družin. Najpogosteje so okužene prostoživeče vodne ptice, kot so race, gosi, čigre, labodi in galebi. Sistematične preiskave divjih ptic omogočajo spremljanje AIV in s tem boljši vpogled v ekologijo teh virusov (3).

V primerjavi s prvimi leti po potrditvi virusa HPAI H5N1 v Sloveniji pri labodih grbcih, sivi čaplji, raci mlakarici in dolgorepi raci število načrtnih preiskav prostoživečih ptic upada (tabela 1) (21, 22).

V zadnjem štiriletmem obdobju (2008–2011) HPAI virusov nismo potrdili, nizko patogeni (angl. *low pathogenic avian influenza*, LPAI) AIV pa so bili ugotovljeni pri 39 pticah. Najpogosteje so bile okužene race mlakarice (79,5%), ki so ena najpogostejših vrst vodnih ptic v Sloveniji. Ornitologi ocenjujejo, da jih letno v naši državi gnezdi med 10.000 in 20.000. Splošno znano je, da veljajo race za gostitelje najširše palete podtipov AIV. Pri tej vrsti ptic so bili najpogosteje dokazani podtipi H1, H2, H3, H5, H6, H7, H10, H11 in H12, redkeje pa H9 in H13, ki ju najdemo pretežno pri pobrežnikih in galebih. V Sloveniji smo v obdobju 2008–2011 potrdili virus tudi pri labodih grbcih, beli štoklji in rumenonogem galebu (tabela 5).

Z molekularnimi metodami smo določili podtip pri 17 od 39 na AIV pozitivnih ptic. Potrdili smo podtipe H1 (2/17), H2 (1/17), H3 (3/17), H4 (2/17), H5 (2/17), H7 (1/17), H8 (2/17), H10 (2/17) in H11 (2/17). Vsi določeni podtipi, razen H7 in H5, ki smo ju določili pri dveh poginjenih labodih grbcih,

Tabela 5. Potrjeni virusi influence A pri pticah v Sloveniji v obdobju 2008–2011. AIV – aviarna influenza (angl. avian influenza virus), LPAI – nizko patogeni sevi (angl. low pathogenic avian influenza).

Leto	Slovensko ime (latinsko ime)	Podtip/število pozitivnih vzorcev	Skupno število pozitivnih AIV
2008	Labod grbec (<i>Cygnus olor</i>)	tip A ^a /1	15/480
		H3/2	
	Raca mlakarica (<i>Anas platyrhynchos</i>)	H4/1	
		H8/2	
		H11/2	
		tip A ^a /4	
Rumenonogi galeb (<i>Larus michahellis</i>)	tip A ^a /2		
Bela štokrlja (<i>Ciconia ciconia</i>)	tip A ^a /1		
2009	Labod grbec (<i>Cygnus olor</i>)	H7N7 (LPAI)/1	12/412
		H5 (LPAI)/1	
	Raca mlakarica (<i>Anas platyrhynchos</i>)	H2/1	
		H3/1	
		H4/1	
		tip A ^a /7	
2010	Raca mlakarica (<i>Anas platyrhynchos</i>)	H10/2	6/283
		H1/2	
		tip A ^a /2	
2011	Labod grbec (<i>Cygnus olor</i>)	H5 (LPAI)/1	6/255
		tip A/2	
	Raca mlakarica (<i>Anas platyrhynchos</i>)	tip A/3	

^a podtip ni bil določen

so bili določeni pri racah mlakaricah. Med njim je bil najpogostejši podtip H3.

Razlogi za nizko stopnjo izolacije (2,5%) so lahko v načinu in trajanju transporta vzorcev ali pa v nizki koncentraciji virusa. Metoda RT-PCR v realnem času je v primerjavi z izolacijo dosti bolj občutljiva in z njo lahko določimo izjemno nizke koncentracije virusne RNA. Vrednosti Ct v vzrocih so bile v večini primerov višje od 30.

Najpomembnejša podtipa AIV sta prav gotovo podtipa H5 in H7. Virusi teh dveh podtipov so pogosto podvrženi mutacijam cepnega mesta hemaglutinina. Spremembe aminokislinskega zaporedja privedejo do nastanka HPAI virusov, ki predvsem pri perutnini, lahko pa tudi pri sesalcih, povzročijo hudo klinično obolenje in visok pogin. Podtip H5 LPAI s cepnim mestom PQRETR*GLF smo ugotovili pri raci mlakarici leta 2009, ki je bila ustreljena v okviru aktivnega monitoringa. Primerjava 263 nukleotidov dolgega odseka gena za H je pokazala 99-odstotno genetsko podobnost s sevom (A/garganey/Cri-

mea/97/2008 (H5N2)), ugotovljenim pri reglji, ki so jo našli v Ukrajini leta 2008. Z analizo nukleotidnega in aminokislinskega dela zaporedja gena (263 nt) za H pri podtipu H5, ki smo ga potrdili pri labodu grbcu v letu 2011, smo ugotovili 97-odstotno nukleotidno in 100-odstotno aminokislinsko podobnost s sevom potrjenim pri raci mlakarici.

Z analizo celotnega zaporedja za gen H seva H7N7 LPAI s cepnim mestom PELPKGR*GLF, ki je bil potrjen pri labodu grbcu, smo ugotovili, da je genetsko najbolj podoben sevu, ki so ga ugotovili pri domači goski leta 2009 na Češkem (A/goose/Czech Republic/1848-K9/2009 (H7N9)) in sevu, ki je v Španiji povzročil izbrih HPAI pri perutnini (A/chicken/Spain/6279-2/2009) (23).

ZAKLJUČKI

AIV in WNV sta povezana s prostoživečimi pticami, oba sta povzročitelja zoonoz, razlikujeta pa se po načinu prenosa in ekologiji. Prenos AIV je povezan z vodo in prostoživečimi

vodnimi pticami, ki veljajo za njegov glavni rezervoar. Prenos WNV je povezan s prenašalci komarji, ptice pevke pa so pomembni gostitelji tega virusa v naravi. Stik prostoživečih ptic z domačo perutnino, drugimi domačimi živalmi in nenazadnje tudi z ljudmi je bistvenega pomena pri prenosu omenjenih dveh virusov, ki pri pticah običajno ne povzročata bolezni. Na žalost je možnost preučevanja prostožečih ptic s strani veterinarske medicine prepogosto povezana z negativnimi učinki, kot je prenos zelo patogenih virusov ali bakterij na domače živali ali zoonoz na ljudi. Želeli bi si, da bi bilo kdaj tudi drugače.

ZAHVALA

Rezultati tega dela so bili pridobljeni v okviru Ciljanega raziskovalnega projekta (CRP V4-0474), ki jih je financirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije in Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano in v okviru rednega nadzora na prisotnost AIV pri prostoživečih pticah, ki ga organizira in financira Veterinarska uprava Republike Slovenije, Ministrstvo za kmetijstvo in okolje Republike Slovenije.

LITERATURA

1. Work TH, Hurlbut HS, Taylor RM. Indigenous wild birds of the Nile Delta as potential West Nile virus circulating reservoirs. *Am J Trop Med Hyg.* 1955; 4: 872-88.
2. De Filette M, Ulbert S, Diamond M, et al. Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Vet Res.* 2012; 43 (1): 16.
3. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev.* 1992; 56 (1): 152-79.
4. Alexander DJ. Orthomyxoviridae infection. In: McFerran JB, McNulty MS, eds. *Virus infections of birds.* Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1993. p. 287-317.
5. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol.* 2005; 79 (5): 2814-22.
6. Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, et al. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science* 2006; 312 (5772): 384-8.
7. Račnik J, Slavec B, Trilar T, et al. Evidence of avian influenza virus and paramyxovirus subtype 2 in wild-living passerine birds in Slovenia. *Eur J Wildl Res.* 2008; 54: 529-32.
8. Spackman E, Senne DA, Myers TJ, et al. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol.* 2002; 40 (9): 3256-60.
9. Starick E, Römer-Oberdörfer A, Werner O. Type- and subtype-specific RT-PCR assays for avian influenza A viruses (AIV). *J Vet Med.* 2000; 47 (4): 295-301.
10. Slomka MJ, Pavlidis T, Banks J, et al. Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005-2006. *Avian Disease.* 2007; 51 (1 Suppl): 373-7.
11. Phipps LP, Essen SC, Brown IH. Genetic subtyping of influenza A viruses using RT-PCR with a single set of primers based on conserved sequences within the HA2 coding region. *J Virol Methods.* 2004; 122 (1): 119-22.
12. Zhang J, Madden TL. PowerBLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res.* 1997; 7 (6): 649-56.
13. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30: 17-20.
14. OIE (Office International des Epizooties). Chapter 2.3.4. Avian influenza. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals [Internet]. [cited 2012 Jan 19]. Dostopno na: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf. 2009
15. Meulen KM, Pensaert MB, Nauwynck HJ. West Nile Virus in the Vertebrate World. *Arch Virol.* 2005; 150 (4): 637-57.
16. Hubalek Z. European experience with the West Nile virus ecology and epidemiology: could it be relevant for the New World? *Viral Immunol.* 2000; 13 (4): 415-26.
17. Komar N, Langevin S, Hinten S, et al. Experimental Infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9 (3): 311-22.
18. Račnik J. Epidemiološka študija aviarnе influence in bolezni zahodnega Nila (West Nile) pri pticah v Sloveniji [doktorsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2008.

19. Malkinson M, Banet C. The Role of Birds in the Ecology of West Nile Virus in Europe and Africa. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2002; 267: 309–22.
20. Capua I, Alexander DJ. The challenge of avian influenza to the veterinary community. *Avian Pathol.* 2006; 35: 189–205.
21. Slavec B, Račnik J, Zorman - Rojs O, et al. Molecular analysis of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) isolates from Slovenia in 2006. In: Book of abstracts of the 8th conference of the European wildlife disease association; 2008 Oct 2–5; Rovinj, Croatia. Rovinj: Cibo Copy; 2008. p. 88.
22. Slavec B, Račnik J, Krapež U, et al. Virusi influence tipa A pri prostoživečih pticah v Sloveniji od leta 2006 do 2010. In: Majdič G, ed. Program in zbornik referatov, (Slovenian veterinary research, Supplement, 13), 4. Slovenski veterinarski kongres 2011; 2011 Nov 18–19; Portorož, Slovenija. Portorož: Veterinarska fakulteta; 2011. p. 275–80.
23. Iglesias I, Martinez M, Munoz MJ, et al. First case of highly pathogenic avian influenza in poultry in Spain. *Transb Emerg Dis.* 2010; 57 (4): 282–5.

Tatjana Avšič - Županc¹, Miša Korva², Katarina Resman³, Luka Fajs⁴

Mikrobiološka diagnostika najpogostejših eksotičnih zoonoz

Microbiological Diagnostics of Important Exotic Zoonoses

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: eksotične zoonoze, mikrobiološka diagnostika, krimsko-kongoška hemoragična mrzlica, virus denga, virus zahodnega Nila, virus chikungunya, virus Toscana

Eksotične zoonoze povzročajo mikroorganizmi, ki so razširjeni in običajno omejeni na določena endemska področja, zvečine tropskega in subtropskega podnebnega pasu. Zaradi globalizacije in vse dostopnejših potovanj zabeležimo v Sloveniji pri potnikih iz tujine vsako leto več primerov bolezni, ki so sicer endemične v Afriki, Aziji ali Amerikah. Klinična slika in anamneza bolnika običajno nista zadostni za postavitev diagnoze. Zato je za zanesljivo potrditev okužbe potrebna občutljiva, sodobna in zanesljiva mikrobiološka diagnostika. Prispevek predstavlja mikrobiološko diagnostiko petih virusnih eksotičnih zoonoz: krimsko-kongoške hemoragične mrzlice, okužbe z virusom denga, okužbe z virusom zahodnega Nila, okužbe z virusom chikungunya in okužbe z virusom Toscana, ki jih v Sloveniji pogosto beležimo predvsem pri potnikih iz tujine.

ABSTRACT

KEY WORDS: exotic zoonoses, microbiological diagnostics, Crimean-Congo haemorrhagic fever, dengue virus, West Nile virus, chikungunya virus, Toscana virus

Exotic zoonoses are caused by pathogens that are geographically distributed in limited endemic regions of the tropics and the subtropics. Due to increased globalization and readily available tourism, a dozen of exotic zoonoses cases, albeit endemic in Africa, Asia or the Americas, are registered in Slovenian travellers each year. Generally, a definite diagnosis of such cases should not depend solely on clinical presentation and anamnestic data. This is why a sensitive, modern and accurate microbiological diagnostics is necessary to confirm these infections. The present paper represents microbiological diagnostic approaches in viral zoonoses, most frequently diagnosed in Slovenian travellers: Crimean-Congo haemorrhagic fever, dengue, West Nile virus infection, infection with chikungunya and Toscana viruses.

¹ Prof. dr. Tatjana Avšič - Županc, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; tatjana.avsic@mf.uni-lj.si

² Dr. Miša Korva, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Katarina Resman, univ. dipl. bioteh., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁴ Luka Fajs, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

UVOD

Zoonoze so nalezljive bolezni, katerih povzročitelji se prenašajo z okuženih ali bolnih divjih in domačih živali na ljudi. Patogeni mikroorganizmi, ki so povzročitelji teh bolezni, so lahko razširjeni po vsem svetu ali pa so omejeni le na določena endemska področja, zvečinoma tropskega in subtropskega podnebne pasu, zato jih pogosto imenujemo eksotične zoonoze (1). Tako zabeležimo v Sloveniji, pri potnikih iz tujine, vsako leto več 10 primerov bolezni, ki so sicer endemične v Afriki, Aziji ali Amerikah. Hkrati pa je zaradi globalizacije, dostopnejšega potovanja, preseljevanja ljudi, živali in produktov ter podnebnih sprememb vse manj bolezni, ki bi jih lahko imenovali »eksotične«. Vse več je podatkov, da se tudi v Evropi pojavljajo avtohtone okužbe z »eksotičnimi« patogeni (2). Prav zato klinična slika in anamneza bolnika pogosto nista zadostni za postavitev diagnoze in je razvoj občutljive, sodobne mikrobiološke diagnostike izrednega pomena. Za nedvomen dokaz okužbe uporabljamo tako molekularne metode, ki so hitre in lahko z njimi neposredno dokažemo posameznega povzročitelja, kot tudi serološke metode, pri katerih je diagnostično okno širše, vendar je zaradi navzkrižne reaktivnosti protiteles včasih tolmačenje rezultatov zahtevno. V prispevku bomo predstavili mikrobiološko diagnostiko petih virusnih eksotičnih zoonoz: krimsko-kongoške hemoragične mrzlice, okužbe z virusom denga, okužbe z virusom zahodnega Nila, okužbe z virusom chikungunya in okužbe z virusom Toscana, ki jih v Sloveniji pogosto beležimo predvsem pri potnikih iz tujine.

VIRUS KRIMSKO-KONGOŠKE HEMORAGIČNE MRZLICE

Krimsko-kongoška hemoragična mrzlica (KKHM) je zoonoza z značilnim nenadnim izbruhom in visoko smrtnostjo, ki sega od 10 do 50%. Bolezen povzroča virus KKHM, ki ga uvrščamo v rod *Nairovirus*, družino *Bunyaviridae*. Virus KKHM sodi med zemljepisno najbolj razširjene viruse, ki se prenašajo s členonožci (arbovirusi, angl. *arthropod borne viruses*), in je endemičen na južnem Balkanu, v Aziji in Afriki. Zemljepisna razširitev viru-

sa KKHM je povezana z razširjenostjo klopotov iz rodu *Hyalomma* spp., ki so glavni prenašalci virusa (3). Virus KKHM je RNA-virus s segmentiranim genomom in je genetsko izjemno raznolik (4). Človek se okuži z vbodom okuženega klopa ali s stikom z okuženimi telesnimi tekočinami oziroma tkivi živali ali ljudi. Kliničen potek KKHM je hiter in buren. Inkubacijski dobi, ki traja od tri dni do dva tedna, sledijo: povišana telesna temperatura z mrzlico, glavobol, bolečine v mišicah, slabost, bruhanje, rdečica obraza ter krvavitve. Med laboratorijskimi kazalci so značilni trombocitopenija, levkopenija, povišani jetrni encimi in motnje v strjevanju krvi (3). Na okužbo z virusom KKHM je treba pomisliti pri bolnikih z značilnimi kliničnimi znaki, ki se vračajo z endemičnih področij, predvsem z južnega Balkana (Kosovo, Albanija, Bolgarija), iz Azije (Turčija, Iran, Irak, Afganistan) in podsaharske Afrike.

Mikrobiološka diagnostika

Mikrobiološka diagnostika okužbe z virusom KKHM temelji na neposrednem dokazu virusa v krvi ali dokazu specifičnih protiteles v serumu bolnika. Za potrditev akutne okužbe se vse bolj uporablja metoda obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (angl. *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, RT-PCR) v realnem času, kjer dokazujemo virusno RNA. Primerna je predvsem v prvem tednu bolezni in pri bolnikih s težjim potekom bolezni ali s smrtnim izidom, pri katerih specifičnega protitelesnega odziva pogosto ni mogoče dokazati. Kvantitativna različica metode RT-PCR omogoča določanje virusnega bremena v serumu in služi kot napovedni dejavnik za težji potek bolezni, saj ima 90% smrtnih primerov virusno breme večje od 10^8 kopij/ml (5). Posredno dokazujemo okužbe z virusom KKHM z ugotavljanjem specifičnih protiteles razreda IgG in IgM, najpogosteje z encimskim imunskim testom (angl. *enzyme linked immunoassay*, ELISA) in z metodo posredne imunofluorescence (angl. *indirect immunofluorescent assay*, IFA). Posredno potrdimo okužbo z dokazom specifičnih protiteles razreda IgM ali s serokonverzijo oz. porastom nivoja specifičnih protiteles razreda IgG v parnih serumih. Treba je poudariti, da so pogosto v začetni fazi bolezni in pri bol-

nikih s težjim potekom bolezni specifična protitelesa odsotna. Zato se v dnevni mikrobiološki diagnostiki KKHM poleg posrednega dokazovanja protiteles sočasno dokazuje tudi virusni genom (6).

VIRUS DENGA

Virus denga (DEN) sodi v družino *Flaviviridae*, rod *Flavivirus*. Ločimo štiri različne serotipe DEN (DEN-1, DEN-2, DEN-3 in DEN-4), med katerimi težje in smrtno primere večkrat povzročata virusa DEN-2 in DEN-3. Ljudje se z virusom DEN okužijo z vbodi okuženih komarjev *Aedes aegypti* in *A. albopictus*. Bolezen je endemična v tropskih in subtropskih predelih Azije, Afrike in Amerike, na Karibskem otočju in delu Pacifika. Z vračanjem potnikov z endemičnih območij se lahko virus DEN razširi tudi v druge države. V Evropi je mrzlica denga vnesena bolezen. Okužba z virusom DEN je najpogosteje asimptomatska ali z blagimi bolezenskimi znaki. Lahko se pojavi klasična mrzlica denga ali se razvije smrtno nevarna oblika bolezni: hemoragična mrzlica denga in denga šok sindrom (7).

Mikrobiološka diagnostika

Virus DEN je RNA-virus, njegov genom nosi zapis za tri strukturne beljakovine (C, M in E) ter za sedem nestrukturnih beljakovin (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B in NS5). Glikozilirana ovojnična beljakovina E je glavna tarča za nevtralizirajoča protitelesa. Glikoprotein NS1 se tvori pri vseh flavivirusih in je nujen za virusno pomnoževanje in preživetje. Ker se protein NS1 izloča v krvni obtok bolnika, ga lahko uporabimo za zgodnji dokaz okužbe z virusom DEN (8). Poleg neposrednega dokaza virusnega antigena NS1 lahko z RT-PCR v serumu bolnika dokažemo tudi virusno RNA. Metoda je uporabna le v prvem tednu po pojavu kliničnih znakov, saj v kasnejšem obdobju, ko so prisotna tudi specifična protitelesa, virusa običajno v krvi in plazmi bolnikov ni več (9). Poleg seruma lahko RNA virusa DEN dokažemo tudi v urinu. Prednosti so, da lahko virusni genom dokažemo v urinu dalj časa po okužbi (tudi do 16. dneva bolezni) kot v serumu. Vzorce urina lahko zberemo enostavno, brez invazivnih postopkov, zato je tak odvzem primernejši za dokazovanje okužbe

z virusom DEN pri novorojenčkih, otrocih in bolnikih s hemoragičnimi znaki (10). Prednost molekularnih metod je predvsem hitrost, visoka občutljivost in specifičnost, saj lahko določimo tudi genotip virusa DEN. Slabost je v tem, da ne moremo razlikovati med primarno in sekundarno okužbo, kar je lahko v primeru težjih oblik bolezni ključnega pomena (11–13). Po okužbi z enim od serotipov virusa DEN ostanejo vseživljenjska protitelesa, ki so za serotip specifična, zato le delno ščitijo pred okužbo z drugimi serotipi virusa DEN. V dnevni laboratorijski diagnostiki najpogosteje uporabljamo metodo ELISA, saj omogoča dokaz specifičnih protiteles razreda IgM in IgG, ki so v serumu bolnika običajno prisotna ob koncu prvega tedna bolezni.

V primerjavi z molekularnimi metodami so serološke metode cenejše in enostavnejše, z njimi lahko razlikujemo med primarno in sekundarno okužbo z virusom DEN. Akutno okužbo z virusom DEN posredno potrdimo z dokazom specifičnih protiteles razreda IgM ali s serokonverzijo oz. vsaj štirikratnim porastom titra protiteles razreda IgG v parnih serumskih vzorcih. Na endemskih področjih uporabljajo test MAC-ELISA (angl. *IgM antibody capture*, MAC), s katerim lahko dokažejo tudi bolnike s ponovno okužbo z virusom DEN. Ponovno okužbo lahko dodatno dokažemo tudi z ugotavljanjem avidnosti protiteles razreda IgG, ki je nizka po primarni okužbi in se v tednih in mesecih po okužbi povečuje. Pomembno je poudariti, da je pri vrednotenju rezultatov seroloških metod potrebna previdnost, saj je na nivoju protiteles razreda IgG med različnimi flavivirusi dokaj visoka navzkrižna reaktivnost (7).

VIRUS ZAHODNEGA NILA

Virus zahodnega Nila (angl. *West Nile virus*, WNV) prav tako sodi v družino *Flaviviridae*, rod *Flavivirus*. V naravi kroži virus med prenašalci, komarji iz rodu *Culex* spp., in pticami. Ljudje in konji so naključni in končni gostitelj, ki se okužijo z vbodom okuženega komarja (14). WNV je zemljepisno izjemno razširjen po celem svetu: v Sredozemlju, Aziji, Afriki, Avstraliji ter v Severni, Srednji in Južni Ameriki (15). Čeravno so ga prvič izolirali v Ugandi leta 1937, je dobil pozornost znanstvene

skupnosti in širše javnosti šele leta 1999 po obširnem izbruhu okužb v Združenih državah Amerike (16, 17). Okužba z WNV se v večini primerov klinično ne izrazi ali pa poteka kot blaga vročinska bolezen. V redkih primerih je prizadeto osrednje živčevje, razvije se meningitis ali encefalitis s pogosto trajnimi nevrološkimi posledicami (14).

Mikrobiološka diagnostika

Diagnostika okužb z WNV temelji na epidemioloških podatkih ter kliničnih in mikrobioloških kazalcih. V zgodnjem obdobju bolezni, tj. v prvem tednu po pojavu kliničnih znakov, najpogosteje uporabimo metodo RT-PCR za dokaz virusnega genoma, ki omogoča hitro, občutljivo in specifično zaznavanje virusa v serumu ali likvorju bolnika. Glavna slabost neposrednega dokaza virusa je kratko diagnostično okno, v katerem je virus v krvi ali likvorju. Kljub nenehnemu razvoju molekularnih metod obstaja možnost lažno negativnih rezultatov, saj je WNV genetsko raznolik in v naravi kroži več genetskih različic virusa. Posredno dokazujemo okužbo z WNV z ugotavljanjem specifičnih protiteles razreda IgM in IgG z metodo ELISA, ki nastanejo že v prvem tednu bolezni (18). Akutno okužbo z WNV potrdimo z dokazom specifičnih protiteles razreda IgM v serumu in likvorju ali s serokonverzijo oz. štirikratnim porastom protiteles razreda IgG v parnih vzorcih seruma (14). Pri dokazu le protiteles razreda IgG moramo rezultate skrbno tolmačiti, saj so protitelesa številnih flavivirusov navzkrižno reaktivna. Podobno kot pri virusu DEN lahko tudi pri okužbi z WNV že zelo zgodaj po okužbi dokažemo virusni antigen NS1 (19). Prednost dokazovanja antigena NS1 je predvsem v nižji ceni in hitrejši diagnostiki v primerjavi z dokazom virusnega genoma z RT-PCR (18).

VIRUS CHIKUNGUNYA

Virus chikungunya (CHIK) uvrščamo v rod *Alphavirus*, v družino *Togaviridae*. Glede na zemljepisno razširjenost uvrščamo virus CHIK med alfaviruse Starega sveta. Virus je endemičen v tropskih in subtropskih predelih Afrike, na otokih Indijskega oceana in v jugovzhodni Aziji (20). Leta 2007 so opisali prvi izbruh avtohtonih primerov okužb z virusom CHIK

v Italiji in kasneje, leta 2010, tudi v južni Franciji (21, 22). V naravi virus kroži v gozdnem krogu, med prenašalci (komarji iz rodu *Aedes* spp.) in vretenčarskimi gostitelji (večinoma nečloveški primati), v urbanem krogu pa med prenašalci in ljudmi. Ljudje se z virusom CHIK okužijo z vbodom okuženega komarja. Virus CHIK lahko pri človeku povzroči asimptomatsko okužbo, blago vročinsko bolezen ali vročinsko bolezen, z izpuščajem in s hudimi bolečinami v sklepih ter mišicah (20). Diagnostika okužb z virusom CHIK temelji na značilnih kliničnih znakih (menaden pojav povišane telesne temperature in močne bolečine v sklepih ali vnetje sklepov), epidemiološki anamnezi in dokazu okužbe z mikrobiološkimi preiskavami (23).

Akutno okužbo z virusom CHIK potrdimo z dokazom virusnega genoma v vzorcih seruma z RT-PCR, izolacijo virusa na celični kulturi ali z dokazom specifičnih protiteles. Virusni genom lahko dokažemo le v vzorcih seruma, ki so odvzeti v prvem tednu po pojavu kliničnih znakov bolezni (24). Posredno lahko potrdimo okužbo z virusom CHIK z dokazom specifičnih protiteles razreda IgM, ki nastanejo med 2. in 7. dnevom po naraščanju telesne temperature in so dokazljiva tudi do 24 mesecev po okužbi (22, 23). Protitelesa razreda IgG nastanejo večinoma 5–6 dni po pojavu kliničnih znakov bolezni, vendar jih lahko pri nekaterih bolnikih dokažemo tudi že dva dni po okužbi. Akutno okužbo z virusom CHIK potrdimo z dokazom specifičnih protiteles razreda IgM ali s štirikratnim porastom titra specifičnih protiteles razreda IgG v parnih vzorcih serumov (23). Serološke preiskave omogočajo zadostno in specifično potrditev okužb z virusom CHIK, saj so protitelesa navzkrižno reaktivna le z virusom O'nyong-nyong (25).

VIRUS TOSCANA

Virus Toscana (TOS) uvrščamo v družino *Bunyaviridae*, v rod *Phlebovirus*. Virus so prvič izolirali leta 1971 iz peščene muhe *Phlebotomus perniciosus* v osrednji Italiji (26). Ljudje se z virusom TOS okužijo z vbodom peščene muhe. Okužba lahko poteka asimptomatsko, kot blaga vročinska bolezen ali kot okužba osrednjega živčevja, z razvojem meningitisa oziro-

ma meningoencefalitisa (27). Okužbe z virusom TOS so omejene na področje Sredozemlja (Italija, Španija, Portugalska, Francija, Ciper, Turčija in Hrvaška) in se najpogosteje pojavljajo v poletnih mesecih (28, 29).

Mikrobiološka diagnostika

Pri postavitvi diagnoze okužbe z virusom TOS potrebujemo poleg natančne anamneze tudi dokaz z mikrobiološkimi preiskavami, pri katerih dokazujemo specifična protitelesa ali virusni genom v vzorcih seruma, plazme ali likvorja (30). S serološkimi metodami lahko hitro potrdimo okužbo z dokazom specifičnih protiteles razreda IgM ali s serokonverzijo oz. štirikratnim porastom titra protiteles razreda IgG v parnih vzorcih. Protitelesa lahko zaznamo že v prvem tednu po pojavu kli-

ničnih znakov bolezni. Pri razlagi seroloških rezultatov moramo predvsem pri nizko pozitivnih ali mejnih in nejasnih rezultatih upoštevati tudi možnost navzkrižne reaktivnosti z ostalimi flebovirusi. Dokončno potrditev akutne okužbe z virusom TOS lahko dobimo z dokazom virusne RNA z metodo RT-PCR. Omejitev molekularne metode je predvsem kratkotrajna viremija, saj se ob pojavu protiteles virusno breme običajno zniža pod mejo zaznavnosti (30). Tako kot pri mnogih drugih arbovirusih je tudi pri diagnostiki okužb z virusom TOS pomembna vključitev vseh epidemioloških, kliničnih in mikrobioloških podatkov. Kljub trenutni zemljepisni omejenosti okužb z virusom TOS lahko v prihodnjih letih, predvsem zaradi podnebnih in ekoloških sprememb, pričakujemo porast okužb tudi v Sloveniji.

LITERATURA

1. Cutler SJ, Fooks AR, van der Poel WH. Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16 (1): 1–7.
2. Gould EA, Higgs S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009; 103 (2): 109–21.
3. Ergonul O. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis.* 2006; 6 (4): 203–14.
4. Deyde VM, Khristova ML, Rollin PE, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity. *J Virol.* 2006; 80 (17): 8834–42.
5. Duh D, Saksida A, Petrovec M, et al. Viral load as predictor of Crimean-Congo hemorrhagic fever outcome. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13 (11): 1769–72.
6. Saksida A, Duh D, Wraber B, et al. Interacting roles of immune mechanisms and viral load in the pathogenesis of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Clin Vaccine Immunol.* 2010; 17 (7): 1086–93.
7. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8 (12 Suppl): S7–16.
8. Peeling RW, Artsob H, Pelegrino JL, et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8 (12 Suppl): S30–8.
9. Klungthong C, Gibbons RV, Thaisomboonsuk B, et al. Dengue virus detection using whole blood for reverse transcriptase PCR and virus isolation. *J Clin Microbiol.* 2007; 45 (8): 2480–5.
10. Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, et al. Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum. *J Clin Microbiol.* 2012; 50 (6): 2047–52.
11. Kong YY, Thay CH, Tin TC, et al. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. *J Virol Methods.* 2006; 138 (1–2): 123–30.
12. Chien LJ, Liao TL, Shu PY, et al. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *J Clin Microbiol.* 2006; 44 (4): 1295–304.
13. Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (10): 4977–83.
14. Avšič - Županc T, Saksida A. Flavivirusi. In: Poljak M, Petrovec M, eds. *Medicinska virologija*. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011. p. 151–67.
15. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med.* 2004; 10 (12 Suppl): S98–109.

16. Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, et al. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med Hyg.* 1940; 20: 471-92.
17. Hayes CG. West Nile virus: Uganda, 1937, to New York City, 1999. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 951: 25-37.
18. De Filette M, Ulbert S, Diamond M, et al. Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Vet Res.* 2012; 43 (1): 16.
19. Alonso-Padilla J, Jimenez de Oya N, Blazquez AB, et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of West Nile virus infection based on a recombinant envelope protein produced in *Trichoplusia ni* larvae. *J Virol Methods.* 2010; 166 (1-2): 37-41.
20. Fajs L, Avšič - Županc T. Togavirusi. In: Poljak M, Petrovec M, eds. *Medicinska virologija.* Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011. p. 183-92.
21. Angelini R, Finarelli AC, Angelini P, et al. An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy. *Euro Surveill.* 2007; 12 (9): E070906.1.
22. Grandadam M, Caro V, Plumet S, et al. Chikungunya virus, southeastern France. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17 (5): 910-3.
23. Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, et al. Chikungunya: a re-emerging virus. *Lancet.* 2012; 379 (9816): 662-71.
24. Panning M, Grywna K, van Esbroeck M, et al. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14 (3): 416-22.
25. Blackburn NK, Besselaar TG, Gibson G. Antigenic relationship between chikungunya virus strains and o'nyong nyong virus using monoclonal antibodies. *Res Virol.* 1995; 146 (1): 69-73.
26. Verani P, Nicoletti L, Ciufolini MG. Antigenic and biological characterization of Toscana virus, a new Phlebotomus fever group virus isolated in Italy. *Acta Virol.* 1984; 28 (1): 39-47.
27. Saksida A. Bunjavirusi. In: Poljak M, Petrovec M, eds. *Medicinska virologija.* Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011. p. 169-81.
28. 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.
29. 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.
30. Cusi MG, Savellini GG. Diagnostic tools for Toscana virus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011; 9 (7): 799-805.

Daša Stupica¹

Sledenje oseb, okuženih med izbruhom vročice Q leta 2007

Follow-Up of Subjects Infected During Q Fever Outbreak in 2007

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: vročica Q, *Coxiella burnetii*, izbruh

Vročica Q je zoonoza, ki jo povzroča znotrajcelična bakterija *Coxiella burnetii*, in ima različne klinične pojavne oblike. Najpogosteje poteka kot gripi podobna bolezen. Akutna bolezen večinoma mine spontano, lahko pa napreduje v kronično, ki se največkrat izrazi kot endokarditis. Diagnozo potrdimo s serološkimi preiskavami. Zaradi izjemne kužnosti lahko *C. burnetii* povzroči velike izbruhe bolezni. V Sloveniji se je med srednješolci in študenti veterinarske stroke, ki so opravljali vaje na ovčji farmi, marca 2007 pojavil izbruh vročice Q. Pri 68 od 84 (81 %) izpostavljenih je bila serološko potrjena akutna okužba s *C. burnetii*. Dvainšestdeset (91 %) okuženih je akutno zbolelo. Osebe, pri katerih smo ugotovili specifična protitelesa, smo klinično in laboratorijsko spremljali na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja v Ljubljani.

ABSTRACT

KEY WORDS: Q fever, *Coxiella burnetii*, outbreak

Q fever is a zoonosis with protean clinical manifestations. It is caused by the intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. The most common clinical presentation is an influenza-like illness. Acute illness is usually self-limiting; nevertheless it may progress to a chronic infection and disease. The most frequent chronic presentation is endocarditis. The diagnosis of Q fever is based on specific serological findings. The extreme infectiousness of the bacterium may result in large outbreaks. In March 2007, an outbreak of Q fever occurred among high school and veterinary students who participated in a training program on a sheep farm in Slovenia. Acute infection with *C. burnetii* has been serologically documented in 68 of 84 (81%) exposed students. The infection was symptomatic in 62 (91%) seropositive cases. Those with positive serological test results were being followed-up via clinical examinations and laboratory tests at the Department of Infectious Diseases of the University Medical Centre Ljubljana.

¹ Asist. dr. Daša Stupica, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana; cerar.dasa@gmail.com

UVOD

Vročica Q je zoonoza, ki jo povzroča znotraj-celična bakterija *Coxiella burnetii*, in je z izjemo Nove Zelandije prisotna po vsem svetu (1). Okužba lahko vodi v asimptomatsko serokonverzijo, akutno ali kronično bolezen (2). Raznolikost kliničnega poteka je predvsem odvisna predvsem od dejavnikov bolnika (imunski status, okvara srčnih zaklopk, nosečnost, starost, spol) in manj od velikosti kužnega odmerka, načina okužbe ter virulentnih lastnosti bakterije (3).

EPIDEMIOLOGIJA IN PATOGENEZA

Najpogostejši rezervoar *C. burnetii* so govedo, ovce in koze. Bakterija se nahaja v seču, blatu, mleku in tkivih, ki se izločajo ob kotitvi okuženih živali (4). V času kotitve okužena placenta onesnaži okolje, v katerem lahko *C. burnetii* preživi več mesecev (5). Ljudje se najpogosteje okužijo z vdihavanjem aerosolov okuženih živalskih izločkov ali onesnažene volne in le redko z uživanjem nepasteriziranega mleka ali mlečnih izdelkov (1, 6). Prenos okužbe s človeka na človeka je verjetno izjemno redek (7). Z različnih koncev sveta poročajo o različnem deležu s *C. burnetii* okuženih domačih živali; od 3% (govedo v Združenih državah Amerike (ZDA)) do 80% (kamele v Čadu) (8). Prenos okužbe z živali na človeka je odvisen od stika med obema, deleža in gostote okuženih živali ter še nekaterih dejavnikov okolja (9). Okužbi so najbolj izpostavljeni ljudje, ki so zaradi svojega poklica v stiku z živalmi: kmetje, veterinarji, delavci v klavnicah in podobno (8).

Patogeneza bolezní ni povsem razjasnjena. Strokovnjaki domnevajo, da vstopno mesto okužbe morda vpliva na klinični potek bolezni. Ne glede na vstopno mesto okužbe se bakterije najverjetneje razsejejo po krvnem obtoku v različne organe in jih prizadenejo (7). Pri sicer zdravem gostitelju okužbo zamejijo makrofagi in nastajajo granulomi. Pri nekaterih bolnikih makrofagom ne uspe uničiti *C. burnetii*, in sicer domnevno zaradi čezmernega izločanja interleukina-10 (10). Bolniki z oslabljenim imunskim odzivom, okvaro srčnih zaklopk, arterijsko anevrizmo ali žilnim

vsadkom ter nosečnice so po okužbi s *C. burnetii* bolj ogroženi za nastanek kronične vročice Q (6).

Zaradi velike kužnosti *C. burnetii* so za ravnanje z okuženim materialom potrebni strogi pogoji. Večina laboratorijev nima pogojev za ravnanje s kužnim materialom tretje stopnje biološke varnosti (angl. *biosafety level 3*), ki so potrebni za osamitev bakterije (11). Manj tvegano za pojav laboratorijske okužbe je dokazovanje DNA *C. burnetii* v kliničnih vzorcih z verižno reakcijo s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) (12).

KLINIČNA SLIKA

Klinični potek okužbe s *C. burnetii* je zelo raznolik. Inkubacijska doba traja 2–3 tedne in je odvisna od velikosti kužnega odmerka (13). Pogosto se okužba klinično ne izrazi (14). Najpogostejša klinična slika akutne vročice Q je samoomejujoča, gripi podobna vročinska bolezen in/ali pljučnica, redkeje granulomatozni hepatitis (15–17). Z različnih koncev sveta poročajo o nekoliko različni klinični pojavnosti vročice Q, kar pripisujejo razlikam med podvrstami *C. burnetii* (18).

Akutna bolezen najpogosteje poteka z vročino, mrzlico, glavobolom, bolečinami v mišicah in sklepih ter pomanjkanjem apetita, redko je prisoten kožni izpuščaj (15, 19). Pri *C. burnetii* pljučnici se poleg omenjenih simptomov lahko pojavita še kašelj in plevritična bolečina. Pljučnica je navadno blaga; na rentgenogramu prsnih organov se v obeh pljučnih krilih lahko pojavi več okroglih bolezenskih sprememb (16). Hepatitis z zlatenico je redek pojav, pogosteje so prisotna le povečana jetra in povečana koncentracija jetrnih encimov. Smrtnost akutne vročice Q je 1–2%, med najpogostejšimi vzroki za smrt je miokarditis (7, 15, 20).

Kronična okužba s *C. burnetii* se razvije, če bolnikov imunski sistem ne uspe obvladati povzročitelja (7). V 60–70% primerov se izrazi kot endokarditis in mnogo redkeje kot okužba žilne anevrizme ali žilnega vsadka, kronični hepatitis ali osteoartritis (1, 21).

DIAGNOSTIKA

Diagnoza vročice Q temelji na bolezenskih simptomih in znakih ter na izvidih seroloških

kih preiskav. Metoda izbire za dokazovanje okužbe s *C. burnetii* je indirektna imunofluorescenca (22). Ob akutni okužbi se v serumu pojavijo specifična protitelesa IgM in IgG, usmerjena pretežno proti nevirulentni obliki *C. burnetii* (faza II). Pomemben titer dosežejo šele 3–4 tedne po okužbi, kar lahko povzroči težave pri odločanju glede zdravljenja; priporočljivo je, da z zdravljenjem začnemo že ob kliničnem sumu na vročico Q (1).

Dober pokazatelj kronične okužbe je pojav velikih koncentracij protiteles IgG in IgA, usmerjenih proti virulentni (faza I) in nevirulentni (faza II) obliki bakterije, vendar mora diagnoza kronične vročice Q temeljiti na hkratnih kliničnih pokazateljih bolezni (2, 7, 23). Občutljivost PCR za dokazovanje DNA v vzorcih seruma je majhna; med 100 bolniki z vročico Q jih je imelo le 18 pozitivno PCR (24). Občutljivost PCR je precej višja za tkivne vzorce, npr. srčne zaklopke (25).

ZDRAVLJENJE

Akutno vročico Q zdravimo z doksiciklinom (100 mg dvakrat dnevno) od 14 do 21 dni (13). Antibiotično zdravljenje skrajša čas vročine in pospeši ozdravitev pljučnice (16, 26). Poročajo tudi o klinični in *in vitro* uspešnosti novjših makrolidov in fluorokinolonov (13, 25, 27). Domnevamo lahko, da zdravljenje akutne vročice Q zmanjša njeno možnost napredovanja v kronično obliko bolezni, vendar o tem nimamo trdnih dokazov o tem.

Maurin in sodelavci so za endokarditis predlagali doživljenjsko antibiotično zdravljenje, vendar sodeč po rezultatih kasnejših raziskav zadostuje 18-mesečno zdravljenje s kombinacijo doksiciklina (100 mg dvakrat dnevno) in hidrosiklorokvina (200 mg trikrat dnevno) (7, 28).

IZBRUH VROČICE Q NA OVČJI FARMI

V obdobju od januarja do marca 2007 je 87 dijakov in študentov veterinarske stroke opravljalo vaje na ovčji farmi Vremščica, kjer se je takrat končevalo obdobje jagnjitve. Zaradi vročinske bolezni je bila v začetku aprila 2007 na Kliniko za infekcijske bolezni in vročinska stanja v Ljubljani napotena ena od dijakinj, pri

kateri smo serološko potrdili klinični sum na akutno okužbo s *C. burnetii*. Obvestili smo epidemiologe Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije (IVZ), ki so opravili epidemiološko preiskavo, v katero so zajeli 66 dijakov tretjega letnika srednje veterinarske šole, od katerih jih je 45 opravljalo prakso na ovčji farmi, in tri učitelje. Dijaki so bili približno štiri ure v tesnejšem stiku z navidezno zdravimi ovčami, ko so strigili parklje, dajali injekcije ali z jodom premazovali rane ovac po carskem rezu. Pri 35 izpostavljenih osebah so našli protitelesa proti *C. burnetii*, ki so potrjevala nedavno okužbo. Serološko so testirali tudi 20 dijakov, ki prakse na ovčji farmi še niso imeli. Serološko pozitivni so bili le tisti dijaki, ki so imeli prakso na omenjeni ovčji farmi, zato so sklepali, da je ovčja farma nedvomno vir okužbe (29).

Na osnovi poročila Centra za nalezljive bolezni (CNB) IVZ o izbruhu vročice Q je pristojni območni urad Veterinarske uprave RS odredil pregled krvi določenega števila ovac na *C. burnetii*. Od 50 pregledanih ovac jih je bilo serološko pozitivnih 29, devet pa sumljivih (encimski imunski test (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA)) na okuženost s *C. burnetii*. Veterinarski ukrepi za preprečevanje novih okužb so bili: omejitev gibanja živali ovčje farme, prepoved prodaje mleka in mlečnih izdelkov, ločitev seropozitivnih živali od tropa, dezinfekcija/dezinsekcija/deratizacija prostorov, v katerih so bile živali nastanjene, posebno pozornost je bilo potrebno posvetiti odstranjevanju splavljenih plodov, plodovih ovojnica in posteljic. Zaposleni na farmi naj bi ob stiku z živalmi uporabljali osebno varovalno opremo. Za preprečevanje okužb pri ljudeh so epidemiologi predlagali omejitev obiskov na ovčji farmi, pregled zaposlenih in izdelavo ocene tveganja delovnega mesta.

KLINIČNO SPREMLJANJE SEROLOŠKO POZITIVNIH DIJAKOV IN ŠTUDENTOV

Od junija 2007 smo dijake in študente klinično in z laboratorijskimi preiskavami spremljali na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja v Ljubljani še osem mesecev po okužbi. Serološke teste – določanje protiteles proti

Tabela 1. Klinični podatki o preiskovancih, ki so zboleli in smo pri njih potrdili akutno okužbo s *C. burnetii*. n – število bolnikov.

Značilnost	Število bolnikov (n = 62)
Vročinska bolezen	54 (87,1%)
Pljučnica	4 (6,5%)
Kašelj in/ali glavobol ^a	3 (4,8%)
Bolečine v mišicah ^b	1 (1,6%)
Trajanje vročine (dni)	5,4 ± 2,1 ^c 5 (1–10) ^d
Najvišja temperatura (°C)	39,4 ± 0,8 ^c 39,3 (38–41) ^d
Asimptomatska okužba	6 (8,8%)

^a število bolnikov, pri katerih je bil kašelj in/ali glavobol edini bolezenski znak

^b število bolnikov, pri katerih so bile bolečine v mišicah edini bolezenski znak

^c povprečje ± standardna deviacija

^d mediana (razpon vrednosti)

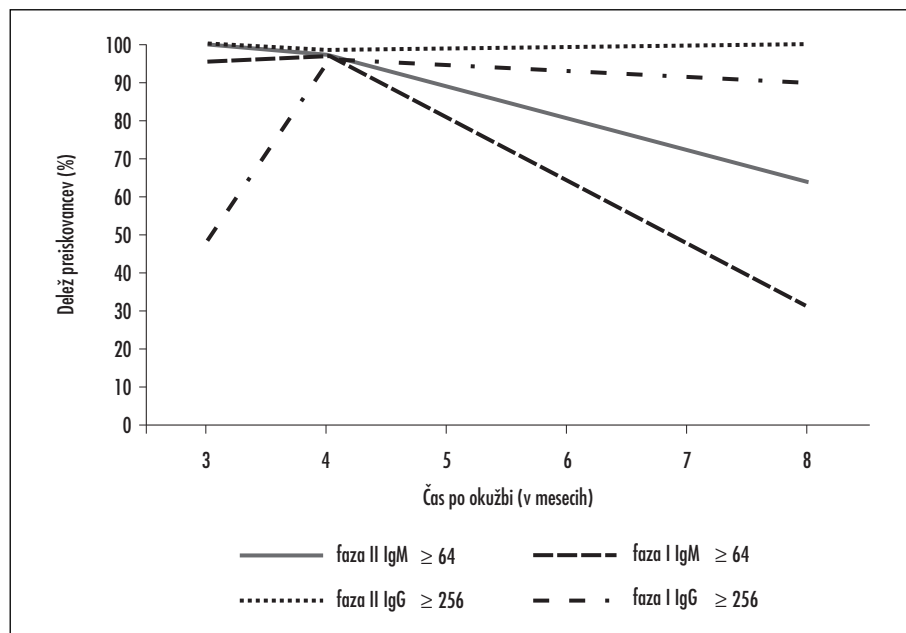
C. burnetii z metodo indirektno imunofluorescence so opravili na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Pri 68 od 84 (81,0%) pregledanih dijakih in študentih (preiskovancih), ki so opravljali vaje na ovčji farmi, je bila serološko potrjena akutna okužba s *C. burnetii*. Od 68 okuženih

je zbolelo 62 (91,2%) oseb. V tabeli 1 navajamo nekaj kliničnih podatkov o poteku okužbe.

Deleži posameznih bolezenskih znakov oziroma sindromov, ki so navedeni v tabeli 1, so okvirni, saj je v akutni fazi bolezni zdravnika obiskalo le 44 od 62 (71,0%) preiskovancev in so bile le pri majhnem delu pregledanih opravljene laboratorijske oziroma slikovne preiskave; serološke preiskave, ki so omogočile odkritje vzroka bolezenskih težav oziroma diagnozo vročice Q, so bile narejene le pri eni (2,3%) preiskovanki. Štiriindvajset (53,3%) preiskovancev je prejelo antibiotik. Ob prebolevanju akutne okužbe je bilo šest bolnikov napotenih na Kliniko za infekcijske bolezni in vročinska stanja. Serološke preiskave so bile opravljene le pri eni dijakinji. Pri njej smo potrdili akutno okužbo s *C. burnetii*. Prejela je doksiciklin. Dva bolnika sta zaradi rentgensko potrjene pljučnice prejela moksifloksacin, en bolnik je zaradi suma na okužbo sečil prejel ciprofloksacin, dvema bolnikoma pa ob sumu na virusno okužbo antibiotikov nismo predpisali.

Med kasnejšim spremljanjem so še štirje preiskovanci prejeli antibiotik: dva zaradi ultrazvočno ugotovljenih zadebeljenih listi-



Slika 1. Spremljanje titrov protiteles proti *C. burnetii*, določenih z metodo indirektno imunofluorescence pri okuženih preiskovancih.

čev mitralne zaklopke, eden zaradi vztrajanja slabega počutja in nizko povišane telesne temperature ter eden zaradi vztrajanja suhega kašlja.

Zadnje ambulantno spremljanje dijakov in študentov smo izvedli osem mesecev po okužbi. Pri nobenem od 60 pregledanih preiskovancev nismo ugotovili kliničnih znakov, ki bi govorili v prid kronične vročice Q, in to kljub temu da so pri precejšnjem delu preiskovancev izvidi seroloških preiskav govorili v prid kronične okužbe s *C. burnetii*; pri 31 (51,7%) preiskovancih je bil titer IgG protiteles proti fazi I *C. burnetii* = 1024, kar je višje od = 800, to je od vrednosti, ki jo Fournier in sodelavci omenjajo kot diagnostično za endokarditis (30).

Na sliki 1 prikazujemo spreminjanje titrov protiteles proti *C. burnetii* za preiskovance, pri katerih smo potrdili akutno okužbo s *C. burnetii*.

ZAKLJUČEK

Vročica Q je svetovno razširjena zoonoza, ki je v Sloveniji prezrta. Njeno podcenjevanje kažejo tudi dogodki ob izbruhu vročice Q

leta 2007: v času akutne bolezni je obiskalo zdravnika 44 oseb zaradi bolezenskih simptomov in znakov, za katere se je kasneje izkazalo, da so bili z veliko verjetnostjo odsev vročice Q, vendar na primarni ravni ni bila pri nobenem bolniku postavljena pravilna diagnoza, od šestih bolnikov, ki so jih družinski zdravniki poslali k specialistu, pa le pri enem.

Za diagnostično nemoč in posledično podcenjenost pogostosti vročice Q je več med seboj povezanih razlogov tako na področju humane medicine kot tudi veterine. V Sloveniji nimamo podatkov o deležu živali, ki so okužene s *C. burnetii*. Zadnji izbruh vročice Q je bil eden od dejavnikov za izvedbo ocene ogroženosti za vročico Q v državi. Na osnovi te ocene je Veterinarska zbornica Republike Slovenije predlagala ponovno uvedbo monitoringa živali na *C. burnetii* v Sloveniji. Za delujoče v humani medicini morajo biti nedavni izbruh vročice Q in ugotovitve pri živalih spodbuda, da bomo bolj skrbno pridobivali epidemiološke podatke, večkrat (še posebno pri bolnikih z vročinskimi boleznimi s prizadetostjo dihal) pomislili na možnost vročice Q in se odločili za ustrezne preiskave ter še naprej zavestno gojili in podpirali sodelovanje klinikov, mikrobiologov, epidemiologov in veterinarjev.

LITERATURA

1. Raoult D, Marrie T. Q fever. Clin Infect Dis. 1995; 20 (3): 489–95.
2. Raoult D, Tissot-Dupont H, Foucault C, et al. Q fever 1985–1998: clinical and epidemiologic features of 1,383 infections. Medicine (Baltimore). 2000; 79 (2): 109–23.
3. Raoult D, Marrie T, Mege J. Natural history and pathophysiology of Q fever. Lancet Infect Dis. 2005; 5 (4): 219–26.
4. Marrie TJ, Raoult D. Q fever – a review and issues for the next century. Int J Antimicrob Agents. 1997; 8 (3): 145–61.
5. McCaul TF, Williams JC. Localization of DNA in *Coxiella burnetii* by post-embedding immunoelectron microscopy. Ann N Y Acad Sci. 1990; 590: 136–47.
6. Fishbein DB, Raoult D. A cluster of *Coxiella burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products. Am J Trop Med Hyg. 1992; 47 (1): 35–40.
7. Maurin M, Raoult D. Q fever. Clin Microbiol Rev. 1999; 12 (4): 518–53.
8. Parker NR, Barralet JH, Bell AM. Q fever. Lancet. 2006; 367 (9511): 679–88.
9. Marrie TJ. Epidemiology of Q fever. In: Marrie TJ, ed. Q fever, the disease. Boca Raton: CRC Press; 1990. p. 49–65.
10. Honstetter A, Imbert G, Ghigo E, et al. Dysregulation of cytokines in acute Q fever: Role of interleukin-10 and tumor necrosis factor in chronic evolution of Q fever. J Infect Dis. 2003; 187 (6): 956–62.
11. Sawyer L, Fishbein D, McDade J. Q fever: current concepts. Rev Infect Dis. 1987; 9 (5): 935–46.
12. Stein A, Raoult D. Detection of *Coxiella burnetii* by DNA amplification using polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1992; 30 (9): 2462–6.
13. Dumler SJ. Q fever. Curr Treat Options Infect Dis. 2002; 4: 437–45.
14. Luoto L, Casey ML, Pickens EG. Q fever studies in Montana. Detection of asymptomatic infection among residents of infected dairy premises. Am J Epidemiol. 1965; 681: 356–69.

15. Tissot-Dupont H, Raoult D, Brouqui P, et al. Epidemiologic features and clinical presentation of acute Q fever in hospitalized patients: 323 French cases. *Am J Med.* 1992; 93 (4): 427-34.
16. Marrie TJ. Coxiella burnetii pneumonia. *Eur Respir J.* 2003; 21 (4): 713-9.
17. Hofmann CE, Heaton JW. Q fever hepatitis. Clinical manifestations and pathological findings. *Gastroenterology.* 1982; 83 (2): 474-9.
18. Domingo P, Munoz C, Franquet T, et al. Acute Q fever in adult patients: report on 63 sporadic cases in an urban area. *Clin Infect Dis.* 1999; 29 (4): 874-9.
19. Fournier PE, Raoult D. Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever. *J Clin Microbiol.* 2003; 41 (11): 5094-8.
20. Derrick E. Q fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. *Med J Aust.* 1937; 2: 281-99.
21. Fournier PE, Etienne J, Harle JR, et al. Myocarditis, a rare but severe manifestation of Q fever: report of 8 cases and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2001; 32 (10): 1440-7.
22. Brouqui P, Tissot-Dupont H, Drancourt M, et al. Chronic Q fever: ninety-two cases from France, including 27 cases without endocarditis. *Arch Intern Med.* 1993; 153 (5): 642-8.
23. Lepidi H, Houplikian P, Liang Z, et al. Cardiac valves in patients with Q fever endocarditis: microbiological, molecular, histologic studies. *J Infect Dis.* 2003; 187 (7): 1097-106.
24. van der Hoek W, Versteeg B, Meekelenkamp JCE, et al. Follow-up of 686 Patients With Acute Q Fever and Detection of Chronic Infection. *Clin Infect Dis.* 2011; 52 (12): 1431-6.
25. Fournier PE, Marrie TJ, Raoult D. Diagnosis of Q fever. *J Clin Microbiol.* 1998; 36 (7): 1823-34.
26. Tissot-Dupont H, Thirion X, Raoult D. Q fever serology; cutoff determination of microimmunofluorescence. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1994; 1 (2): 189-96.
27. Gikas A, Spyridaki I, Scoulica E, et al. In vitro susceptibility of Coxiella burnetii to linezolid in comparison with its susceptibility to quinolones, doxycycline, and clarithromycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45 (11): 3276-8.
28. Rolain JM, Maurin M, Raoult D. Bacteriostatic and bactericidal activities of moxifloxacin against Coxiella burnetii. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45 (1): 301-2.
29. Raoult D, Houplikian P, Tissot Dupont H, et al. Treatment of Q fever endocarditis: comparison of two regimens containing doxycycline and ofloxacin or hydroxychloroquine. *Arch Int Med.* 1999; 159 (2): 167-73.
30. Grilc E, Sočan M, Koren N, et al. Outbreak of Q fever among a group of high school students in Slovenia, March-April 2007. *Eurosurveillance* [internet]. 2007 [citirano 2012 May 8]; 12 (29). Dosegljivo na: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3237/>

Katja Kalan¹, Tomi Trilar²

Tigrasti komar v Sloveniji – biologija in razširjenost

Asian Tiger Mosquito in Slovenia – Biology and Distribution

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: tigrasti komar, *Aedes albopictus*, Slovenija, biologija, razširjenost

Tigrasti komar (*Aedes albopictus* (Skuse, 1894)) je primarno tropska in subtropska vrsta komarjev, ki izvira iz Azije. V zadnjih tridesetih letih se je razširil po vsem svetu. V Evropi je bil prvič zabeležen leta 1979 v Albaniji, v Sloveniji pa leta 2002. Najpomembnejšo vlogo pri njegovem širjenju ima prenos jajčec s transportom starih pnevmatik. Najpogostejši omejujoči dejavniki, ki vplivajo na njegovo razširjenost, so temperatura, dolžina dneva, vlažnost zraka in količina padavin. Naselitev v zmerno toplem klimatskem pasu so mu med drugim omogočili sposobnost razvoja v umetnih bivališčih in dormantna jajčeca, ki so odporna na izsuševanje in nizke temperature. Po trenutno znanih podatkih se tigrasti komar pojavlja predvsem v jugozahodnem delu Slovenije, nekaj poročil je tudi iz drugih delov države (Štajerska, Dolenjska, osrednja Slovenija), vendar ti podatki niso preverjeni. Vsekakor obstaja možnost za vzpostavitve stabilne populacije tigrastega komarja na skoraj celotnem ozemlju države, zaradi česar je nujno potreben celovit in enoten sistem monitoringa na državni ravni.

ABSTRACT

KEY WORDS: Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*, Slovenia, biology, distribution

The Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus* (Skuse, 1894)) is a tropical and subtropical mosquito species that has spread worldwide in the last thirty years. In Europe it was first found in Albania in 1979, whereas in Slovenia it was first recorded in 2002. The transport of eggs with the trade of used tires played the most important role in its spread. The most common limiting factors affecting its distribution are temperature, day length, humidity and rainfall. The colonization in the temperate climatic zone was mainly enabled by the ability to colonize man-made containers and dormant eggs that are resistant to dehydration and low temperatures. According to the currently available data, the Asian tiger mosquito is prevalent in the Southwestern part of Slovenia, but it was also spotted in other parts of the country (Styria, Lower Carniola, and central Slovenia). However, these data are not verified. Establishing a stable population of the Asian tiger mosquito is possible almost in the entire country. This is why a comprehensive and unified system of monitoring at the state level is essential.

¹ Katja Kalan, univ. dipl. biol., Znanstveno raziskovalno središče, Inštitut za biodiverzitetne študije, Univerza na Primorskem, Garibaldijeva ulica 1, 6000 Koper; Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije, Univerza na Primorskem, Glagoljaška ulica 8, 6000 Koper; katja.kalan@gmail.com

² Dr. Tomi Trilar, univ. dipl. biol., Prirodoslovni muzej Slovenije, Prešernova cesta 20, 1000 Ljubljana; ttrilar@pms-lj.si

BIOLOGIJA TIGRASTEGA KOMARJA

Morfološki opis tigrastega komarja

Jajčeca tigrastega komarja (*Aedes albopictus* (Skuse, 1894)) so črne barve, jajčasto-eliptične oblike in nekoliko sploščena ob straneh (1). Njihova povprečna velikost je 0,5 mm (2).

Določitev ličink komarjev do vrste je možna na podlagi zadnje, četrte razvojne stopnje ličinke. Na osmem členu zadka se pri komarjih nahajajo luske, ki so vrstno značilno razporejene. Za ličinke tigrastega komarja je značilnih 6–13 lusk, ki so razporejene v ravni vrsti. Sifon ličink je kratek, na bazi nima zajede, manjkajo tudi ščetine na hrbtni strani. Hrbtni in bočni del desetega člena zadka pokriva velik sklerit (sedlo), ki je na spodnji strani prekinjen. Vse štiri škrge ličink tigrastega komarja, ki se nahajajo na desetem členu zadka, so enako dolge (3–5). Določanje komarjev na podlagi bub je težavno, saj imajo te manj izrazite določevalne znake v primerjavi z ličinkami in odraslimi osebkami (5).

Odrasli osebki tigrastega komarja so značilno črno-belo obarvani (slika 1). Na glavi imajo belo proggo. Njihovo bodalo oz. sesalo je v celoti črne barve, medtem ko se na vrhu črnih palpov nahajajo izrazito bele luske. Samice tigrastega komarja se od samic drugih vrst komarjev razlikujejo po obarvanosti mezonotuma in zadnjih stopalc nog. Mezonotum je pretežno črne barve z vzdolžno belo črto. V zadnjem delu mezonotuma je vzdolžna bela progga, ki je v sprednjem delu ni. Na robu mezonotuma se na vsaki strani pred bazo kril nahaja majhna bela točka nepravilne oblike

s širokimi pravnimi luskami srebrne barve. Noge tigrastega komarja so značilno črno-belo obarvane (3–5). Odrasle samice tigrastega komarja so velike 5–10 mm. Samci so običajno manjši in imajo v primerjavi s samicami izrazito peresaste tipalnice (3–5).

Bivališče tigrastega komarja

Tigrasti komar izvira iz tropske in subtropske Azije, kjer je pogost v mestnih, primestnih, vaških in gozdnih območjih, kjer samice jajčeca najpogosteje odlagajo v vodne kotanje v drevesih (6). V zmerno toplem podnebnem pasu se vrsta večinoma pojavlja v urbanem okolju. Ker vegetacije v mestih pogosto ni veliko, je omejena na predmestja, kjer je več vegetacije in kjer se lahko razmnožuje v naravnih, najpogosteje pa v umetnih habitatih, ki so posledica človekove dejavnosti (7). Med slednje uvrščamo rabljene avtomobilske pnevmatike, podstavke cvetličnih lončkov, vaze, kopeli za ptice, pločevinke, plastična vedra ter druge zapuščene predmete, ki zadržujejo majhno količino vode (1). Značilno bivališče ličink prikazuje slika 2.

Življenjski krog tigrastega komarja

Razvoj tigrastega komarja od jajčeca do odraslega osebka traja spomladi od 15 do 20 dni, poleti pa se ta čas skrajša na 6 do 8 dni (slika 3) (1). Samice tigrastega komarja odlagajo jajčeca posamično na temno, hrapavo, navpično podlago, nekaj centimetrov nad vodno gladino. Nekaj jajčec odložijo tudi neposredno na vodno površino. Temno obarvana voda, dodatek listja, sveže in suhe trave ter prisotnost komarjevih jajčec in ličink privab-



Slika 1. Odrasli samici tigrastega komarja med sesanjem krvi na človeku.



Slika 2. Značilno bivališče ličink tigrastega komarja v zmerno toplem pasu.

Ljajo samice komarjev k odlaganju jajčec. Samice jajčeca enega cikla odložijo v več zadrževalnikov z vodo. Obdobje med dvema odlaganjema jajčec traja pri temperaturi 30 °C od štiri do šest dni, pri nižjih temperaturah pa se ta čas podaljša (6).

Večina vrst komarjev iz rodov *Aedes* in *Ochlerotatus* poleg običajnih jajčec odlaga določen delež dormantnih jajčec, iz katerih se izležejo ličinke šele ob pojavu ugodnih klimatskih in hidroloških razmer. Dormantna jajčeca so odporna na izsuševanje in nizke temperature, zato komarjem omogočajo preživeti zimo v zmerno toplem pasu in razširjanje po svetu (5).

Iz jajčec se izležejo ličinke šele, ko jih preplavi voda. Na čas, ki je potreben za izleganje iz jajčec, vplivajo temperatura, starost jajčec, izsušitev, dolžina dneva, spremembe v temperaturi in parcialni tlak kisika v vodi (6).

Trajanje stopnje ličinke je odvisno od temperature vode, količine hrane, prostornine vodnega zadrževalnika in gostote ličink v vodnem zadrževalniku (1). V laboratorijskih razmerah, pri temperaturi 25 °C in optimalni količini hrane, stopnja ličinke traja 5–10 dni.

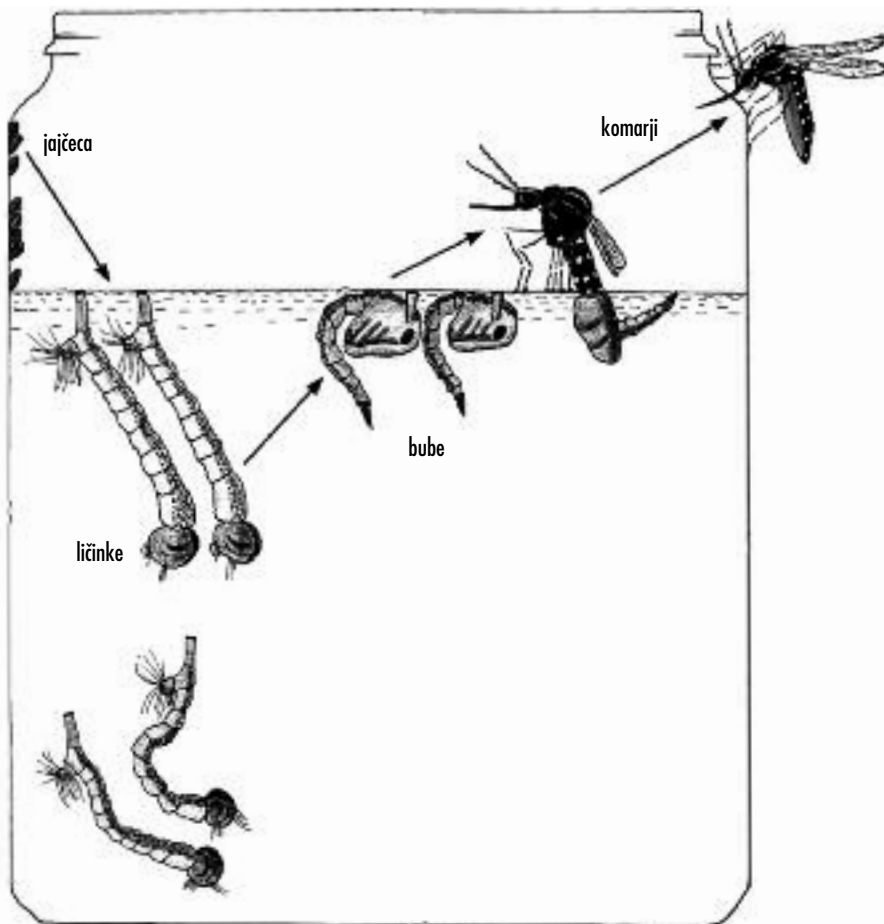
Ob pomanjkanju hrane in nizkih temperaturah se ta čas podaljša. Razvoj ličink naj bi se zaustavil pri temperaturah, nižjih od 11 °C (6).

Bube so zadnja, zelo gibljiva vodna stopnja komarja, ki pri temperaturi 15 °C traja okoli štiri dni, pri višjih temperaturah pa se ta čas skrajša. Pri temperaturi 25 °C se lahko iz bube izleže odrasel komar že po dveh dneh (1).

Hranjenje odraslih komarjev

Odrasli samci in samice se prehranjujejo s cvetnim nektarjem, sadnimi sokovi in raznimi oslajenimi tekočinami. Za komarje je sladkor osnovni vir energije, s katerim zadovoljujejo dnevne energetske potrebe. Samice se dodatno hranijo še s krvjo, s katero dobijo beljakovine, ki jih potrebujejo za tvorbo in razvoj jajčec (5).

Samice tigrastega komarja se lahko hranijo na mnogo različnih gostiteljih, najpogosteje na sesalcih, pa tudi na pticah, plazilcih in dvoživkah (1). Samice se običajno hranijo pri tleh ter na prostem, občasno pa jih najdemo tudi višje v krošnjah ali v notranjosti hiš. Hranijo se podnevi in le redko ponoči. Čas



Slika 3. Razvojni krog tigrastega komarja (Avtor: Bogdan Horvat).

največje aktivnosti hranjenja je odvisen od bivališča, običajno pa ima dva vrhova – prvega zgodaj zjutraj in drugega pozno popoldan. Bimodalnost je izrazitejša v bivališčih, kjer ni zaščite pred dnevno pripeko. Nasprotno imajo komarji v bivališčih z zaščito pred dnevno pripeko le en vrh aktivnosti hranjenja (6). Čez dan se odrasli komarji zadržujejo v senčnih, vlažnih okoljih z veliko vegetacije (v visoki travi, živih mejah in grmovju) (1).

Pomen tigrastega komarja z zdravstvenega vidika

Tigrasti komar je zelo nadležen za lokalno prebivalstvo, kjer se pojavlja, saj se hrani večino podnevi, njegovi piki pa povzročajo zelo

srbeče otekline. Poleg tega ima velik epidemiološki pomen. Eksperimentalno lahko prenaša 23 arbovirusov ter virusa nodamura in sindbis (SIN) (7). Med virusi velja posebej omeniti virus chikungunya, viruse mrzlice denga in virus zahodnega Nila. Poleg svetovne razširjenosti omenjenih boleznih se pojavlja nevarnost za ponovne izbruhe boleznih v Evropi. V prid temu govori izbruh boleznih chikungunya v Italiji v letu 2007, kjer je zbolelo več kot 300 ljudi. To je bil prvi izbruh boleznih izven tropskega območja (8). Zadnji izbruh mrzlice denga je bil v Grčiji med letoma 1927 in 1928, v letu 2010 pa sta bila ugotovljena avtohtona prenosa virusa v Franciji in na Hrvaškem (9–11). Poleg virusov lahko tigrasti komar prenaša še plazmodije, ki povzročajo ptičjo mala-

rijo, in pasji srčni glisti (*Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*), ki povzročata filariozo pri psih (12–15).

Razširjenost tigrastega komarja

Način širjenja in omejujoči dejavniki širjenja

Odrasli komarji so sposobni preleteti od 200 do 400 m, zato je razširjanje na dolge razdalje možno le s človekovo pomočjo. Glavno vlogo pri širjenju vrste ima transport dormantnih jajčec, odpornih na izsuševanje in nizke temperature, v rabljenih pnevmatikah. Oplojene samice jajčeca odložijo v pnevmatike, ki so hranjene na odprtem prostoru. Te nato za recikliranje prevažajo po vsem svetu, in ko so na cilju, so večinoma ponovno hranjene na prostem. Ob prvem dežju se napolnijo z vodo in iz jajčec se že po nekaj urah izležejo ličinke, ki so začetek populacije tigrastega komarja na novem koncu sveta (16).

Poleg transporta jajčec se lahko s človekovo aktivnostjo razširjajo tudi ličinke ter odrasli osebki tigrastega komarja. Jajčeca in ličinke se širijo tudi s trgovanjem z okrasno rastlino »lucky bamboo« (*Dracaena* sp.), ki jo prevažajo v stoječi vodi (17, 18). Odrasli komarji se lahko zatečejo v avtomobile in se tako razširjajo na srednje dolge razdalje (19, 20).

Glavni dejavniki, ki omejujejo širjenje tigrastega komarja, so temperatura, dolžina dneva, količina padavin in vlažnost (7). Pri temperaturi so pomembne tako poletne kot zimske temperature. V zmerno toplem podnebni pasu tigrasti komarji zimo preživijo z dormantnimi jajčeci. Zimska (januarska) izoterma +10 °C ločuje populacije komarja, ki se razmnožujejo vse leto, od tistih, ki zimo preživijo v dormantnem stanju. Zimska izoterma -5 °C določa največjo severno razširjenost tigrastega komarja v celinski Aziji in verjetno tudi v Severni Ameriki. Če upoštevamo konzervativno mnenje, da naj bi severno mejo naselitve tigrastega komarja v Evropi določala zimska (januarska) izoterma 0 °C, potem morebitno območje naselitve zajema večino zahodne Evrope in vse mediteranske države (7).

Poletne temperature vplivajo na čas, ki je potreben, da komar zaključi svoj razvoj od jajčeca do odraslega osebka, na čas med dvema odlaganjema jajčec, na pogostost hranjenja

s krvjo in učinkovitost prenosa arbovirusov (7). Posledica visokih temperatur je večje število generacij v sezoni z eksponentialno rastjo populacije (21).

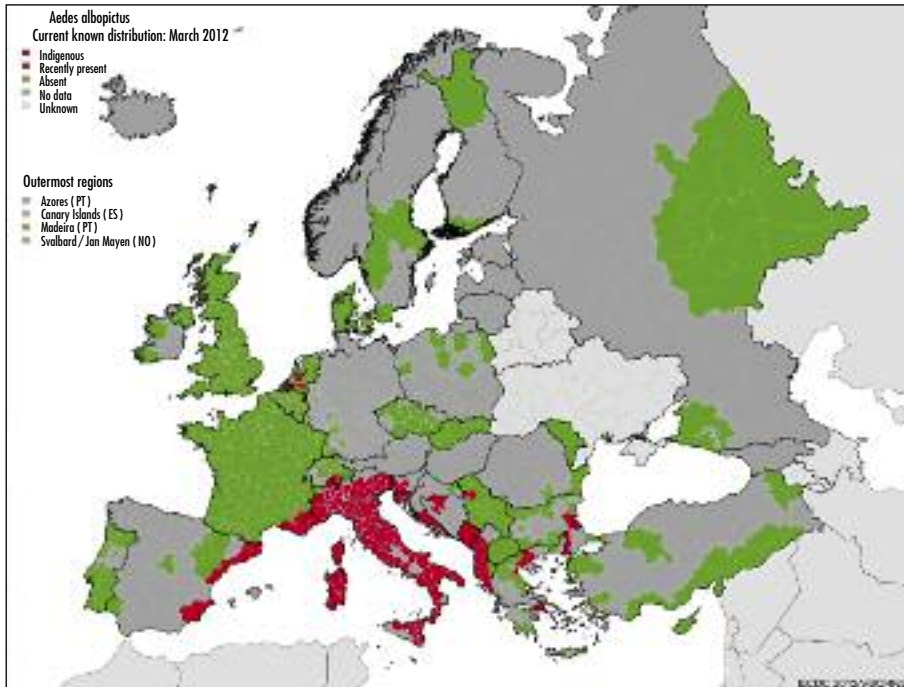
Poleg temperature na pojavljanje tigrastega komarja pomembno vplivata količina in razporeditev padavin, saj je od tega odvisno število mest za njegov razvoj, s čimer so povezani številčnost ličink in odraslih osebkov, stopnja odlaganja jajčec (ta je med sušnim obdobjem minimalna) in stopnja hranjenja odraslih osebkov (6, 7). V Evropi imajo območja, kjer je prisoten tigrasti komar, več kot 500 mm padavin letno. Čeprav lahko preživi tudi bolj sušne razmere, kar je odvisno od lokalnih mikroklimatskih razmer, je malo verjetno, da se bo ustalil v območjih z manj kot 300 mm dežja letno (7).

Odrasli tigrasti komarji so v tropskih in subtropskih predelih aktivni vse leto, medtem ko so v zmerno toplih predelih sposobni preživeti zimo na stopnji jajčec. Dolžina dneva je tista, ki določi, ali bodo samice odlagale večji delež dormantnih jajčec ali ne. Običajno se dormanca pojavi, ko je dan dolg 13 oz. 14 ur ali manj (6).

Svetovna razširjenost tigrastega komarja

Tigrasti komar izvira iz tropske in subtropske Azije, od koder se je v samo tridesetih letih razširil v Severno in Južno Ameriko, na Karibsko otočje, v Afriko, Evropo in na nekatere pacifiške otoke (6, 16).

V Evropi je bil tigrasti komar prvič najden v Albaniji leta 1979, od koder pa se ni razširil v sosednje države (22). Naslednje odkritje tigrastega komarja v Evropi je bilo šele leta 1990 v Genovi v Italiji. V Italijo naj bi komar prišel s transportom starih pnevmatik, večinoma iz Združenih držav Amerike, pa tudi z Japonske in s Tajvana. Tigrasti komar se je v Italiji izredno hitro razširil, kar je verjetno posledica večkratnega vnosa iz več regij sveta s transportom različnega tovora (21). Po odkritju komarja v Italiji so sledila odkritja tudi v drugih evropskih državah, in sicer v Franciji, Črni gori, Grčiji, Švici, Španiji, Belgiji, na Hrvaškem, v Bosni in Hercegovini, na Nizozemskem, v Nemčiji, Monaku, San Marinu, Vatikanu in na Malti (23). O prvih odkritjih tigrastega komarja poročata tudi Turčija in Bolgarija (24).



Slika 4. Razširjenost tigrastega komarja v Evropi (stanje marca 2012) (26). Z rdečo barvo so označena območja, kjer je tigrasti komar prisoten, z zeleno območja, kjer ga ni in s sivo območja, za katera ni podatkov.

182

Najhuje prizadeta evropska država je Italija, kjer se je komar v 18 letih od odkritja najbolj razširil in namnožil. Iz Italije naj bi se komar s transportom odraslih osebkov v avtih in tovornjakih razširil v Španijo, Francijo, Hrvaško, Švico, Nemčijo ter v Slovenijo (25).

Pri širjenju tigrastega komarja ima v zadnjih letih velik pomen tudi Nizozemska, kjer v rastlinjakih gojijo draceno, poznano tudi pod imenom »lucky bamboo« (*Dracaena sanderiana*), ki jo izvažajo v mnoge države. Leta 2005 so v rastlinjakih prvič opazili tigrastega komarja, ki naj bi tja prišel s pošiljko rastlin s Kitajske. Nizozemska je trenutno najbolj severna evropska država, kjer je bila potrjena prisotnost tigrastega komarja. Različni modeli predvidevajo različno severno mejo razširjenosti komarja v Evropi, zagotovo pa se njegovo širjenje še ni končalo (25). Trenutno razširjenost prikazuje slika 4.

Razširjenost tigrastega komarja v Sloveniji

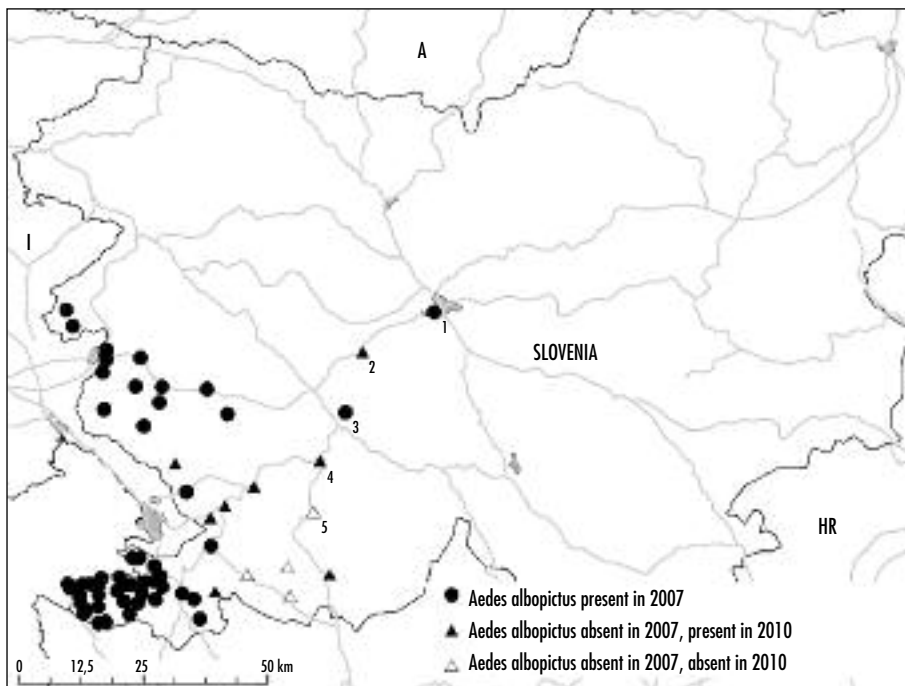
V Sloveniji tigrastega komarja prvič omenjajo leta 2002 v prilogi Primorskih novic, Sob-

ta, prvi strokovni članek o njegovem pojavljanju v Sloveniji pa je bil objavljen leta 2005 (27, 28).

Prvo raziskavo o razširjenosti tigrastega komarja v Sloveniji (natančneje v jugozahodnem delu države) je leta 2007 opravila Katja Kalan v okviru diplomskega dela (29). Ugotovila je stabilno populacijo tigrastega komarja predvsem na obalnem in goriškem območju. V letu 2010 so Kalanova in sodelavci ponovili vzorčenje na lokacijah, kjer komar ni bil ugotovljen v letu 2007. V takratni raziskavi je bila prisotnost komarja potrjena v skoraj celotnem jugozahodnem delu Slovenije (slika 5) (30). V prihodnosti pričakujemo še veliko večje območje razširjenosti tigrastega komarja, ki nikakor ne bo omejena le na jugozahodni del Slovenije, saj o najdbah poročajo tudi s Štajerske in z Dolenjske, vendar pa te najdbe še niso potrjene.

ZAKLJUČEK

Tigrasti komar ima velik medicinski, sociološki in ekonomski pomen za človeka. Iz opisa



Slika 5. Najdbe tigrastega komarja (*Aedes albopictus*) v jugozahodnem delu Slovenije v letih 2007 in 2010 (30). Črne pike prikazujejo naselja, kjer je bil tigrasti komar prisoten leta 2007. Črni trikotniki prikazujejo naselja, kjer tigrasti komar ni bil prisoten leta 2007, leta 2010 pa je bil prisoten. Beli trikotniki prikazujejo naselja, kjer ne leta 2007 ne leta 2010 ni bila ugotovljena prisotnost tigrastega komarja. 1 – Ljubljana, 2 – Vrhnika, 3 – Laze, 4 – Postojna, 5 – Pivka.

vrste lahko sklepamo, da je tigrasti komar zelo nadležen za ljudi, poleg tega pa je udeležen tudi pri prenosu nekaterih povzročiteljev bolezni. S prisotnostjo prenašalca v velikem delu države se pojavlja možnost izbruhov mrzlic denga in chikungunya. Tukaj velja omeniti predvsem nevarnost prenosa povzročiteljev bolezni z obolelih popotnikov, ki prihajajo z endemičnih območij bolezni, na lokalno prebivalstvo. Poleg tega se lahko pojavijo tudi avtohtoni primeri bolezni, kot se je zgodilo npr. v Franciji in Italiji (10, 11).

Da bi širjenju tigrastega komarja lahko sledili, bi v Sloveniji nujno potrebovali državni sistem za spremljanje populacije komarjev, ne samo tigrastih, temveč tudi drugih vrst. Omenimo naj samo nekaj izmed invazivnih vrst komarjev, katerih pojavljanje in širjenje je bilo zabeleženo v zadnjih letih v Evropi: *Aedes*

aegypti, *Aedes japonicus*, *Aedes atropalpus*, *Aedes koreicus* (24). Tudi nekateri izmed teh komarjev so pomembni prenašalci bolezni. Z državnim sistemom nadzora bi tako dobili informacije o pojavu novih vrst že takoj na točki njihovega vnosa (npr. pri uvozniku rabljenih pnevmatik), s čimer bi lahko učinkovito preprečili njegovo nadaljnje širjenje.

Zaradi nezadostnih virov financiranja oziroma nezainteresiranosti pristojnih organov za to problematiko monitoring na državni ravni žal še ni urejen. V Sloveniji sicer lokalni zavodi za zdravstveno varstvo in občine nekaj sredstev namenijo preučevanju tigrastega komarja in izobraževanju javnosti, vendar pa to ni dovolj. Spremljanja populacije se je treba lotiti načrtno in slediti evropskim smernicam, kjer skoraj v vseh državah potekajo aktivnosti spremljanja in nadzora komarjev.

LITERATURA

1. Bellini R, Veronesi R, Venturelli C, et al. Linee guida per la sorveglianza e la lotta alla zanzara tigre (*Aedes albopictus*). Bologna: Servizio sanitario regionale Emilia-Romagna; 2005. p. 24.
2. Klobučar A, Benić N, Merdić E, et al. *Aedes albopictus* prvi put u Hrvatskoj. Zbornik radova seminara DDD i ZUPP; 2005; Rovinj. Zagreb: Korunić; 2005. p. 207–12.
3. Gutsevich AV, Monchadskii AS, Shtakelberg AA. Fauna of the USSR. Diptera. Jerusalem: Keter Publishing House Jerusalem; 1974. p. 342.
4. Schaffner F, Angel G, Geoffroy B, et al. The mosquitoes of Europe – an identification and training programme [CD-ROM]. Montpellier: IRD Editions & EID Mediteranee; 2001.
5. Becker N, Petrić D, Zgomba M, et al. Mosquitoes and their control. New York: Springer; 2003. p. 420.
6. Hawley WA. The biology of *Aedes albopictus*. J Am Mosq Control Assoc Suppl. 1988; 4 (Suppl): 1–39.
7. Mitchell CJ. Geographic spread of *Aedes albopictus* and potential for involvement in arbovirus cycles in the mediterranean basin. J Vector Ecol. 1995; 20: 44–58.
8. Angelini R, Finarelli AC, Angelini P, et al. Chikungunya in north-eastern Italy: a summing up of the outbreak. Euro Surveill. 2007; 12 (11): 47.
9. Rosen L. Dengue in Greece in 1927 and 1928 and the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever: new data and a different conclusion. Am J Trop Med Hyg. 1986; 35 (3): 642–53.
10. La Roche G, Souarès Y, Armengaud A, et al. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. Euro Surveill. 2010; 15 (39): 19676.
11. Gjenero-Margan I, Aleraj B, Krajcar D, et al. Autochthonous dengue fever in Croatia. August–September 2010. Euro Surveill. 2011; 16 (9): 19805.
12. Drake James A. Handbook of alien species in Europe. Dordrecht: Springer; 2009.
13. Konishi E. *Culex tritaeniorhynchus* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) as natural vectors of *Dirofilaria immitis* (Spirurida: Filariidae) in Miki City, Japan. J Med Entomol. 1989; 26 (4): 294–300.
14. Nayar JK, Knight JW. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): an experimental and natural host of *Dirofilaria immitis* (Filarioidea: Onchocercidae) in Florida, USA. J Med Entomol. 1999; 36 (4): 441–8.
15. Cancrini G, Romi R, Gabrielli S, et al. First finding of *Dirofilaria repens* in a natural population of *Aedes albopictus*. Med Vet Entomol. 2003; 17 (4): 448–51.
16. Knudsen AB. Global distribution and continuing spread of *Aedes albopictus*. Parassitologia. 1995; 37 (2–3): 91–7.
17. Madon MB, Hazelrigg JE, Shaw MW, et al. Has *Aedes albopictus* established in California? J Am Mosq Contr Assoc. 2003; 19 (4): 297–300.
18. Scholte E-J, Jacobs F, Linton YM, et al. First record of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* in the Netherlands. Eur Mosq Bull. 2007; 22: 5–9.
19. Flacio E, Lüthy P, Patocchi N, et al. Primo ritrovamento di *Aedes albopictus* in Svizzera. Bollettino della Società Ticinese di Scienze Naturali. 2004; 92: 141–2.
20. Pluskota B, Storch V, Braunbeck T, et al. First record of *Stegomyia albopicta* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Germany. Eur Mosq Bull. 2008; 26: 1–5.
21. Romi R. *Aedes albopictus* in Italia: un problema sanitario sottovalutato. Annali dell'Istituto Superiore di Sanita. 2001; 37 (2): 241–7.
22. Adhami J, Murati N. Presence of the mosquito *Aedes albopictus* in Albania. Revista Mjkesore. 1987; 1: 13–6.
23. European Centre for Disease Prevention and Control. Development of *Aedes albopictus* risk maps [internet]. Stockholm: ECDC; 2009 [citirano 2012 Mar 15]. Dosegljivo na: http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0905_TER_Development_of_Aedes_Alboipictus_Risk_Maps.pdf
24. Medlock MJ, Hansford KM, Schaffner F, et al. A review of the invasive mosquitoes in Europe: Ecology, public health risk, and control options. Vector Borne Zoonotic Dis. 2012; 12 (20): 1–13.
25. Enserink M. A mosquito goes global. Science. 2008; 320 (5878): 864–6.
26. European Network for Arthropod Vector Surveillance for Human Public Health [internet]. Stockholm: ECDC; c2011-2012 [citirano 2012 Mar 15]. Dosegljivo na: www.vbornet.eu
27. Turel I. Nadležni komar prestopil mejo. Primorske novice, Sobota. 2002; VI: 21.
28. Petrić D, Zgomba M, Ignjatovic Cupina A, et al. Invasion of the *Stegomyia albopicta* to a part of Europe [izvleček]. 15th European SOVE Meeting; 2006 Apr 10–14; Serres, Greece. p. 58.
29. Kalan K. Razširjenost in sezonska aktivnost tigrastega komarja (*Aedes albopictus*) v priobalnem delu Slovenije [diplomsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2009.
30. Kalan K, Kostanjšek R, Merdić E, et al. A survey of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) distribution in Slovenia in 2007 and 2010. Natura Sloveniae. 2011; 12 (2): 39–50.

Andrea Pavlovič¹, Alenka Trop Skaza², Miša Korva³, Irena Milotič⁴,
Lucija Beškovnik⁵, Tatjana Avšič - Županc⁶

Primeri uvožene mrzlice denga med slovenskimi gradbenimi delavci v Mombaju

Cases of Imported Dengue Fever among Slovenian Construction Workers in Mumbai

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: virus denga, klasična mrzlica denga, hemoragična mrzlica denga/denga s šok sindromom, bicitopenija, repelenti, komarji

V prispevku bomo prikazali primer uvožene mrzlice denga pri slovenskih delavcih, ki so začasno bivali in delali v gradbeništvu v indijskem mestu Mombaj, od avgusta do septembra 2011. Večina delavcev je zbolela približno en mesec po prihodu v Indijo, kjer je bilo deževno obdobje, za katero je značilno veliko komarjev. Kljub zaščiti z repelenti in mrežami so delavce pikali komarji. Šest od osmih delavcev je zbolelo z značilno klinično sliko klasične mrzlice denga, nihče ni razvil denga šok sindroma. Pri kliničnih znakih so bili najpogostejši vročina, bolečine v sklepih in mišicah, glavobol ter srbeč izpuščaj. V laboratorijskih izvidih je imela večina bolnikov bicitopenijo ter blago hepatopatijo. Pri vseh smo s serološkimi metodami dokazali protitelesa proti virusu denga. Pri štirih smo v akutnem serumu dodatno dokazali tudi virusno RNA ter pri petih virusni antigen NS1. Trije bolniki so po prihodu v Slovenijo potrebovali bolnišnično zdravljenje, medtem ko so bili ostali obravnavani le ambulantno. Terapija je bila simptomatska. Pri vseh je prišlo do kliničnega in laboratorijskega izboljšanja brez posledic.

ABSTRACT

KEY WORDS: dengue virus, *Aedes* mosquitoes, classical dengue fever, dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome, bicytopenia, repellents

In this article, cases of imported dengue fever among Slovenian workers working and living at the construction site in Mumbai, India, from August to September 2011, are presented. The majority of the workers fell ill one month after the arrival to India where it was the rainy season with many mosquitoes present in the region. Despite using repellents and nets, they reported mosquito bites. Six out of eight workers fell ill with signs and symptoms of classical dengue fever. None of them suffered from the dengue shock syndrome or had biphasic febrile course

¹ Andrea Pavlovič, dr. med., Oddelek za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Splošna bolnica Celje, Oblakova ulica 5, 3000 Celje; andrapavlov1@gmail.com

² Dr. Alenka Trop Skaza, dr. med., Zavod za zdravstveno varstvo Celje, Ipavčeva ulica 18, 3000 Celje

³ Dr. Irena Milotič, dr. med., Oddelek za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Splošna bolnica Celje, Oblakova ulica 5, 3000 Celje

⁴ Dr. Miša Korva, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁵ Lucija Beškovnik, dr. med., Zavod za zdravstveno varstvo Celje, Ipavčeva ulica 18, 3000 Celje

⁶ Prof. dr. Tatjana Avšič - Županc, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

of the disease. Most of the patients had fever, muscle and joint pains, headaches and itchy rashes. Laboratory analysis showed bicytopenia and mildly elevated transaminases. The dengue infection was serologically confirmed in all patients. In four patients, the infection was additionally confirmed by the presence of viral RNA in acute samples and in five patients the dengue NS1 antigen was detected. Three patients were hospitalized, others were treated as outpatients. The therapy was symptomatic. All the patients recovered completely without suffering any consequences and all the laboratory tests reached normal values.

UVOD

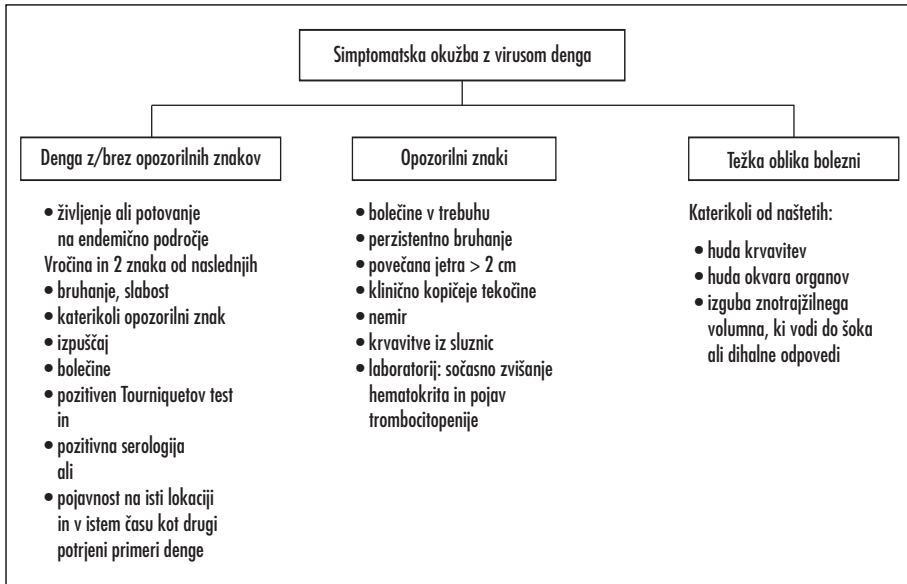
Mrzlica denga je akutna infekcijska bolezen, ki jo prenašajo komarji. Bolezen je pogosta v tropskih in subtropskih državah (predvsem na gosto naseljenih področjih), kjer so podnebne razmere ugodne za razmnoževanje komarjev (1, 2). Okužba z virusom denga lahko povzroči različne oblike bolezni: od asimptomatske do blage klasične mrzlice denga, do težjih oblik, kot sta denga hemoragična mrzlica ter denga s sindromom šoka (angl. *dengue hemorrhagic fever / dengue shock syndrome*, DHF/DSS) (3, 4). Bolniki, ki se prvič okužijo z virusom, bolezen prebolijo brez značilnih kliničnih znakov ali zbolijo s klasično mrzlico denga, ki je blaga oblika bolezni. Značilni znaki klasične mrzlice denga so: vročina, glavobol, retroorbitalna bolečina, bolečine v sklepih, izpuščaj, prebavne težave, respiratorni simptomi (3, 5). Osebe, ki so že bile izpostavljene virusu, pa lahko razvijejo težjo obliko bolezni (4, 6). Za težjo obliko okužbe z virusom denga redko zbolijo odrasle osebe (4).

V Indiji je število okužb z virusom denga povezano s količino padavin, ki je največja v monsunskem (od junija do septembra) in pomonsunskem obdobju (4, 7). Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je že leta 1975 objavila klasifikacijo okužbe z virusom denga, ki je bila ponovno ocenjena leta 1997 in leta 2009. Po zadnji klasifikaciji se simptomatske okužbe z virusom denga delijo na mrzlico denga brez opozorilnih znakov oz. z njimi ter na težko dengo (slika 1) (3). Diagnozo okužbe z virusom denga postavimo v glavnem klinično in jo potrdimo z mikrobiološkimi preiskavami.

EPIDEMIOLOGIJA

Virus denga sodi v rod *Flavivirus*, družina *Flaviviridae* (8). V naravi se virus ohranja s kro-

ženjem med komarji in opicami. Glavni prenašalci virusa denga so komarji vrste *Aedes aegypti* in *Aedes albopictus*, ki se razmnožujejo v stoječih rezervoarjih vode (8). Poleg naravnega kroga lahko virus denga kroži tudi v urbanem okolju, in sicer med komarji in ljudmi. Okužena oseba je običajno viremična 2–8 dni, kar omogoča učinkovit prenos virusa. Glavni prenašalec je komar vrste *A. aegypti*, ki se hrani večinoma podnevi, vrhunec hranjenja je zgodaj zjutraj in zvečer in tako vzdržuje kroženje virusa v urbanem okolju (2, 9). Drugi prenašalec, *A. albopictus* oziroma tigrasti komar, je razširjen predvsem v Aziji. To je zelo invazivna vrsta komarja, ki se je razširila tudi v Ameriko in Evropo ter se dobro prilagodila na tamkajšnja podnebja (2). Bolezen je endemična v Afriki, obeh Amerikah, v delih Srednjega Vzhoda, Aziji in Zahodnem Pacifiku (9). Poznamo štiri tipe virusa denga (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4), ki po preboleli bolezni puščajo za virusni tip specifično imunost. To pomeni, da okužba z enim tipom virusa denga zagotovi doživljenjsko imunost proti temu tipu in le nekajmesečno navzkrižno imunost proti ostalim trem tipom virusa (8). V jugovzhodni Aziji so endemični vsi štirje virusni tipi in večina prebivalstva se z njimi okuži že v otroštvu (1, 2). V zadnjih desetletjih se je pogostost okužb z virusom denga v svetu bistveno povečala. Po oceni SZO se vsako leto z virusom denga v svetu okuži 50–100 milijonov ljudi. V Sloveniji je prijava okužbe z virusom denga zakonsko obvezna (Zakon o nalezljivih boleznih, Uradni list Republike Slovenije, št. 33/2006, prečiščeno besedilo). Od leta 2001 do 2012 so na Inštitutu za varovanje zdravja Republike Slovenije (IVZ) zabeležili 30 prijav (10).



Slika 1. Klasifikacija denge po SZO (2009), prirejena po Srikantachomou (3). SZO – Svetovna zdravstvena organizacija.

KLINIČNA SLIKA

Okužba z virusom denga lahko poteka brez kliničnih znakov ali kot klasična mrzlica denga oziroma pri težjih oblikah bolezni kot denga hemoragična mrzlica in denga s sindromom šoka. Inkubacijska doba je v povprečju 4–7 dni (11). Po definiciji SZO ima bolnik s klasično mrzlico denga vročino, bival ali potoval je na endemičnem področju in ima vsaj dve od naslednjih težav: slabost ali bruhanje, izpuščaj, kostno-mišične bolečine, pozitiven Tourniquetov test ali enega od opozorilnih znakov (slika 1) (12). Potek bolezni je lahko dvofazen zaradi dvofaznega poteka vročine (1). Izpuščaj je prisoten v 50% in je pogostejši pri primarni okužbi z virusom denga (5). Pogosto srbeč izpuščaj je makulozen ali makulopapulozen in generaliziran, se običajno pojavi po padcu vročine ter traja 2–4 dni (11). Simptomi trajajo v povprečju 2–7 dni (2).

KLINIČNI PRIMER

V predstavljenem primeru so bile vse osebe s potrjeno boleznijo moški povprečne starosti 37 let (starostni interval: 25–46 let). Delavci so prispeli v Indijo na začetku avgusta ter

na začetku septembra pričeli z gradbenimi deli. Pred pričetkom gradbenih del so šli dvakrat na izlet v narodni park. Higienške razmere na gradbišču so bile slabe. Okrog gradbišča je bilo močvirje, prav tako je bilo na gradbišču veliko stoječe vode in komarjev. Mesec dni pred odhodom v Indijo so se vsi cepili proti hepatitisu A in B, tifusu in tetanusu ter prejeli navodila za zaščito pred piki žuželk na območnem Zavodu za zdravstveni varstvo. Antimalaričnih zdravil niso prejeli. V času bivanja v tujini so po nasvetu epidemiološke službe uporabljali repelente z najmanj 30-odstotno koncentracijo N,N-dietil-meta-toluamida (DEET), ki so jih prinesli iz Slovenije (13). Ko jim je teh zmanjkalo, so uporabljali repelente z neznano koncentracijo DEET, kupljene v Indiji.

Prvi delavec je zbolel pet dni po začetku gradbenih del, zadnji pa 10 dni kasneje. V povprečju so prišli na pregled po šestih dneh bolezni (4–14 dni). Šest od osmih okuženih oseb je bilo simptomatskih. Trije bolniki so bili zdravljeni bolnišnično, a je bolezen pri vseh potekala brez zapletov. Ostali bolniki so bili obravnavani le ambulantno. Vsi oboleli so imeli znake klasične mrzlice denga. Nihče od bolnikov ni razvil dvofaznega poteka bolezni. Najpogostejši znaki so bili: vročina, mrzlica, glavobol, utrujenost, artralgijske, prebavne

Tabela 1. Klinični znaki/simptomi in laboratorijski izvidi. Poz. – pozitivno, neg. – negativno, EIA – encimski imunski test (angl. enzyme immunoassay), RT-PCR – obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (angl. reverse transcriptase-polymerase chain reaction), ND – preiskave niso opravili, / – ni podatka.

Bolnik	1	2	3	4	5	6	7	8
Znaki								
Začetek kliničnih znakov pred obiskom v bolnišnici (dnevi)	brez znakov	4	7	5	14	7	4	brez znakov
Bolnišnično zdravljenje	ne	da	ne	da	ne	da	ne	ne
Starost v letih	36	46	44	26	42	41	25	37
Mialgije	/	ne	da	da	da	ne	ne	/
Artralgije	/	da	da	da	da	ne	da	/
Glavobol	/	da	da	da	ne	da	da	/
Retroorbitalna bolečina	/	ne	ne	da	ne	ne	ne	/
Mrzlica	/	da	da	da	da	da	da	/
Vročina	/	da	da	da	da	da	da	/
Utujenost	/	da	da	da	da	ne	da	/
Znaki prebavil (slabost, bruhanje, driska)	/	da	da	ne	da	da	ne	/
Izpuščaji	/	da	da	da	da	da	da	/
Hemoragične manifestacije (melena, petehije, hematemeza, epistaksa, purpura, hemoptize)	/	da, petehije (usta)	/	da, petehije (noge, usta)	/	/	/	/
Pordevanje obraza	/	da	da	da	ne	ne	ne	/
Respiratorna simptomatika	/	da	ne	da	ne	ne	ne	/
Laboratorijski izvidi								
Levkopenija	ne	da	da	da	ne	ne	ne	da
Trombocitopenija	ne	da	ne	da	ne	ne	ne	da
Zvišane transaminaze	da	da	da	da	da	da	ne	da
EIA – Denga IgM and IgG	IgM poz. IgG poz.	IgM poz. IgG neg.	IgM poz. IgG poz.	IgM poz. IgG poz.	IgM poz. IgG neg.	IgM poz. IgG poz.	IgM neg. IgG neg.	IgM poz. IgG poz.
Serum akutne faze								
EIA – Denga NS1 antigen	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	neg.	neg.	neg.
Serum akutne faze								
EIA – Denga IgM and IgG Konvalescentni serum	ND	IgM poz. IgG poz.	IgM poz. IgG poz.	IgM neg. IgG poz.	IgM poz. IgG poz.	ND	IgM poz. IgG neg.	IgM poz. IgG poz.
RT-PCR								
Serum akutne faze	poz.	poz.	neg.	neg.	poz.	poz.	neg.	neg.

težave in makulozen, srbeč izpuščaj. Manj pogosto so imeli respiratorne težave, retroorbitalne bolečine in petehije. Noben bolnik ni imel vnetja žrela, konjunktivitisa ali povečanih jeter, samo en bolnik je imel povečane področne bezgavke. Nihče ni imel nevroloških znakov. V povprečju so težave trajale osem dni (7–10 dni). Sedem bolnikov je imelo povišane transaminaze, štirje so razvili levkopenijo in trije trombocitopenijo (tabela 1).

DIAGNOSTIKA

Diagnoza okužbe z virusom denga temelji v glavnem na klinični sliki, potrdim jo z mikrobiološkimi preiskavami. Ob tem nam pomagajo tudi laboratorijski izvidi krvi, saj so v krvi pogosto prisotni levkopenija, trombocitopenija ter blago povišane transaminaze (14–18). Na endemičnih področjih uporabljajo enostaven in hiter Tourniquetov test, ki ga

pri naših bolnikih v Indiji niso opravili (19). Ob prihodu v bolnišnico smo bolnikom odvzeli kri za osnovne laboratorijske teste in mikrobiološke preiskave na virus denga, hepatitis B in C, malarijo (krvni razmaz in gosta kaplja), virus humane imunske pomanjkljivosti (angl. *human immunodeficiency virus*, HIV), virus chikungunya, citomegalovirus in virus Epstein-Barr. Za dokaz specifičnih protiteles proti virusu denga smo uporabili encimski imunski test (angl. *enzyme immunoassay*, ELA), s katerim smo v serumu akutne faze dokazali specifična protitelesa razreda IgM pri petih od šestih simptomatskih bolnikov in specifična protitelesa razreda IgG pri dveh bolnikih (tabela 1). Pri štirih od šestih bolnikov smo z encimskoimunsko metodo dokazali tudi virusni antigen NS1. Specifična protitelesa razreda IgM in IgG smo dokazali tudi pri dveh bolnikih, ki nista kazala kliničnih znakov okužbe. Pri enem smo dokazali tudi virusni antigen NS1. V serumu, odvzetem v fazi okrevanja, smo dokazali specifična protitelesa IgM in IgG pri petih od šestih bolnikov z mrzlico denga. V serumu akutne faze smo z obratno transkripcijo in verižno reakcijo s polimerazo (angl. *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, RT-PCR) v realnem času dokazali virusno RNA pri štirih od osmih bolnikov. Z določanjem nukleotidnega zaporedja virusa denga smo dokazali, da so se bolniki okužili z virusnim tipom 3.

ZDRAVLJENJE

Zdravljenje mrzlice denga je simptomatsko. Bolniki, ki so bili bolnišnično zdravljeni na našem oddelku, so potrebovali analgetike oziroma antipiretike ter antihistaminike zaradi srbečega izpuščaja. Bolniki niso prejeli aspirina ali nesteroidnih antirevmatikov zara-

di možnih antikoagulacijskih učinkov omenjenih zdravil. Zaradi levkopenije in trombocitopenije smo redno spremljali krvno sliko ter jetrne teste zaradi povišanih vrednosti le-teh. Vsi bolniki so ozdraveli brez posledic.

ZAKLJUČEK

Mrzlica denga je akutna virusna infekcijska bolezen, ki jo prenašajo komarji v tropskih deželah. Zaradi vse pogostejših migracij se bolezen pojavlja tudi na področjih, kjer do sedaj ni bila prisotna (20). Prenašalec virusa denga je komar vrste *A. albopictus* ali tigrasti komar, ki je prisoten tudi na slovenski obali (21). V opisanem kliničnem primeru so bolniki zboleli za mrzlico denga kljub uporabi repelentov. V kraju, kjer so bivali, virus denga sicer ni endemičen, vendar so delali v slabih higienskih razmerah in v monsunskem obdobju, ki je ugoden za razmnoževanje komarjev. Glede na začetek bolezni pri delavcih in znano inkubacijsko dobo le-te (v povprečju 4–7 dni) lahko predvidevamo, da so se bolniki z virusom okužili na gradbišču (11). Pri vseh delavcih smo s serološkimi testi dokazali specifična protitelesa proti virusu denga in tako potrdili okužbo. V diferencialni diagnozi smo izključevali malarijo, okužbo z virusom chikungunya, sindrom infekcijske mononukleoze, hepatitis B in C ter okužbo z virusom HIV.

Cepivo ali zdravilo proti dengi ne obstaja, vendar lahko nadzorujemo ali preprečujemo prenos virusa z zaščitnimi ukrepi proti komarjem. Ukrepi so usmerjeni primarno na primerno odstranjevanje odpadkov, pokrivanje ter čiščenje domačih rezervoarjev vode. Drugi del ukrepov temelji na zaščiti človeka pred piki komarjev s primernimi oblačili, repelenti ter z zaščitnimi mrežami (2).

LITERATURA

1. Marolt - Gomišček M. Virusne hemoragične mrzlice. In: Marolt - Gomišček M, Radšel - Medvešček A. Infekcijske bolezni. Ljubljana: Tangram; 2002. p. 483–5.
2. WHO Media centre: Dengue and severe dengue. Fact sheet No 117 [internet]. World health organization; 2012 [citirano 2012 Jun 16]. Dosegljivo na: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
3. Srikiatkachorn A, Rothman AL, Gibbons RV, et al. Dengue – how best to classify it. *Clin Infect Dis*. 2011; 53 (6): 563–7.

4. Gunasekaran P, Kaveri K, Mohana S, et al. Dengue disease status in Chennai (2006–2008): a retrospective analysis. *Indian J Med Res.* 2011; 133 (3): 322–5.
5. Cobra C, Rigau-Pérez JG, Kuno G, et al. Symptoms of dengue fever in relation to host immunologic response and virus serotype, Puerto Rico, 1990–1991. *Am J Epidemiol.* 1995; 142 (11): 1204–11.
6. Deen JL, Harris E, Wills B, et al. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet.* 2006; 368 (9530): 170–3.
7. Raheel U, Faheem M, Riaz MN, et al. Dengue fever in the Indian Subcontinent: an overview. *J Infect Dev Ctries.* 2011; 5 (4): 239–47.
8. Avšič - Županc T, Saksida A. Flavivirusi. In: Poljak M, Petrovec M, eds. *Medicinska virologija.* Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011. p. 151–67.
9. Khabbaz RF, Ostroff SM, LeDuc JW, et al. Emerging and Reemerging Infectious Disease Threats. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles And Practice Of Infectious Diseases.* 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2010. p. 199–219.
10. Grilc E, Praprotnik M. Denga, denga hemoragična mrzlica. eNBOZ junij/julij 2011 [internet]. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja; 2011 [citirano 2012 Jun 17]. Dosegljivo na: <http://www.ivz.si/enboz>
11. Dengue Fever & Dengue Hemorrhagic fever. In: *Yellow book Health information for international travel* [internet]. Geneva: Oxford university press; 2012 [citirano 2012 Jun 16]. Dosegljivo na: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf
12. WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control – new edition [internet]. Geneva: World Health Organization; 2009 [citirano 2012 Jun 16]. Dosegljivo na: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf
13. Bazemore AW, Huntington M. The pretravel consultation. *Am Fam Physician.* 2009; 80 (6): 583–90.
14. Vaughn DW, Barrett A, Solomon T. Flaviviruses (Yellow Fever, Dengue, Dengue Hemorrhagic Fever, Japanese Encephalitis, West Nile Encephalitis, St. Louis Encephalitis, Tick-Borne Encephalitis). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.* 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2010. p. 2133–56.
15. Schwartz E, Mendelson E, Sidi Y. Dengue fever among travelers. *Am J Med.* 1996; 101 (5): 516–20.
16. Trofa AF, DeFraitas RF, Smoak BL, et al. Dengue fever in US military personnel in Haiti. *JAMA.* 1997; 277 (19): 1546–8.
17. Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis.* 1997; 176 (2): 313–21.
18. Kalayanarooj S. Dengue. *Lancet.* 2007; 370 (9599): 1644–52.
19. Zakon o nalezljivih boleznih. Uradni list RS št. 33/2006.
20. Singh NP, Jhamb R, Agarwal SK, et al. The 2003 outbreak of Dengue fever in Delhi, India. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2005; 36 (5): 1174–8.
21. Kalan K, Kostanjšek R, Merdić E, et al. A survey of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) distribution in Slovenia in 2007 and 2010. *Natura Sloveniae.* 2011; 13 (1): 39–50.

Matjaž Jereb¹, Blaž Pečavar², Janez Tomažič³, Igor Muzlovič⁴, Tatjana Avšič - Županc⁵,
Tanja Premru - Sršen⁶, Snežana Levičnik - Stežinar⁷, Primož Karner⁸

Prenos humane granulocitne anaplazmoze s krvjo

Human Granulocytic Anaplasmosis Transmitted by Blood Transfusion

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: humana granulocitna anaplazmoza, hud potek, transfuzija krvi

Humana granulocitna anaplazmoza je zoonoza, ki jo povzroča *Anaplasma phagocytophilum*. Najpogostejši vir okužbe so klopi. Bolezen navadno poteka kot blago, akutno vročinsko stanje. Težji potek je redek. Najpogosteje gre za samoomejujočo bolezen, ki ne potrebuje antibiotičnega zdravljenja. V primeru težje oblike je potrebno zdravljenje z doksiciklinom. Redki, vendar možni, so tudi nekateri drugi načini prenosa, kot je prenos preko posteljice ali z okuženo krvjo. Pri 36-letni porodnici, pri kateri je prišlo do hudega poteka anaplazmoze, smo z opravljenimi preiskavami potrdili s transfuzijo preneseno okužbo. Z retrogradnimi preiskavami smo nato dokazali še okužbo pri krvodajalcu. Gre za prvi primer s transfuzijo prenesene humane granulocitne anaplazmoze v Evropi z dokazom boleznici tudi pri krvodajalcu, ki je daroval okuženo kri.

ABSTRACT

KEY WORDS: human granulocytic anaplasmosis, severe form, blood transfusion

Human granulocytic anaplasmosis is an emerging tick-borne infection. Its clinical manifestations range from mild or self-limiting to severe or, in rare instances, fatal diseases. Rare examples of non-tick transmission of human granulocytic anaplasmosis exist in literature and include direct exposure to deer blood, transfusion, and transplacental transmission. The case described in this report provides reliable evidence that *Anaplasma phagocytophilum* infection in this patient was acquired through blood transfusion. Although a previous case of transfusion-transmitted anaplasmosis was reported, this is the first report in which a definitive case of human granulocytic anaplasmosis was confirmed in a blood transfusion recipient as well as in the donor.

¹ Doc. dr. Matjaž Jereb, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana; matjaz.jereb@kclj.si

² Blaž Pečavar, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana

³ Prof. dr. Janez Tomažič, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana

⁴ Asist. dr. Igor Muzlovič, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana

⁵ Prof. dr. Tatjana Avšič - Županc, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁶ Asist. dr. Tanja Premru - Sršen, dr. med., Klinični oddelek za perinatologijo, Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Šlajmerjeva ulica 3, 1000 Ljubljana

⁷ Snežana Levičnik - Stežinar, dr. med., Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva ulica 6, 1000 Ljubljana

⁸ Asist. dr. Primož Karner, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana

UVOD

Humana granulocitna anaplazmoza (HGA) – v preteklosti znana kot humana granulocitna erlihioza – je s klopi prenosljiva zoonoza, ki jo povzroča obvezna znotrajcelična po Gramu negativna bakterija *Anaplasma phagocytophilum*. HGA so prvič odkrili leta 1994 v severnem predelu Združenih držav Amerike (ZDA), prvi primer v Evropi so dokazali leta 1996 v Sloveniji (1, 2). V ZDA sta najpomembnejša prenašalca povzročitelja *Ixodes scapularis* v severnih zveznih državah in *Ixodes pacificus* v zveznih državah ob Tihem oceanu (3, 4). V Evropi povzročitelja prenaša gozdni klop (*Ixodes ricinus*) (5).

Serološko-epidemiološke študije kažejo, da je število okužb s HGA podcenjeno (6). Večina okužb je posledica vboda klopa na endemskem področju. Opisani so tudi posamezni primeri prenosa okužbe preko posteljice oziroma ob porodu in ob stiku z okuženo krvjo (7–10).

Potek bolezni v Evropi in v ZDA je podoben, vendar ima po sedanjih podatkih evropska oblika nekoliko blažji potek. Med evropskimi bolniki s potrjeno HGA je prizadetost pljuč redka in opisov bolezni s težjim potekom, odpovedjo dihanja in potrebo po mehanskem predihavanju v literaturi ne zasledimo (11–13). Opisan primer predstavlja bolnico s hudo potekajočo HGA, ki je bila zaradi dihalne odpovedi zdravljena na oddelku za intenzivno zdravljenje in mehansko predihavana. Okužba je bila posledica transfuzije okužene krvi. Poleg zanesljivo dokazane HGA pri porodnici je bila HGA nedvoumno dokazana tudi pri krvodajalcu.

PRIKAZ PRIMERA

Na Ginekološko kliniko Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani so 26. avgusta sprejeli 36-letno nosečnico v 29. tednu nosečnosti. V področni bolnišnici so ugotovili preeklampsijo in znotrajmaternični zastoj rasti ploda ter se zaradi spontanega splava v preteklosti odločili za bolnišnično spremljanje. Ob profilaktičnem odmerku cefamezina je bil 15. septembra napravljen elektivni porod s carskim rezom. Nekaj ur po posegu so se pojavili simptomi in znaki hemoragičnega šoka. Napravljena je bila ultrazvočna preiskava trebuha,

ki je pokazala prosto tekočino v trebušni votlini, zaradi katere so se odločili za kirurško revizijo z vstavitvijo hemostatskih šivov. Ob tem je bolnica prejela šest enot koncentriranih eritrocitov ter dve enoti sveže zamrznjene plazme. Krvni pripravki, ki so jih zbrali na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v Ljubljani (ZTM), so izvirali od šestih krvodajalcev.

Nadaljnji potek zdravljenja je bil do 23. septembra, z izjemo bolečine v ledvenem predelu hrbtenice, brez posebnosti. Štiriindvajsetega septembra je imela bolnica kratkotrajno povišano telesno temperaturo brez drugih spremljajočih simptomov. V laboratorijskih izvidih so zabeležili povišano koncentracijo C-reaktivnega proteina, prokalcitonina, serumskih aminotferaz, bilirubina in haptoglobina (tabela 1). Zaradi suma na bakterijsko okužbo je bila v skladu s slovenskimi nacionalnimi smernicami uvedena antibiotična terapija z amoksicilinom s klavulansko kislino, ki jo je bolnica prejela v peroralni obliki, saj je parenteralno terapijo zavrnila. Ker je imela po treh dneh antibiotičnega zdravljenja še vedno povišano telesno temperaturo, je bila antibiotična terapija zamenjana za gentamicin in metronidazol. Istega dne je bil na pregledni rentgenski sliki pljuč viden blag intersticijski edem, ultrazvočna preiskava trebuha je pokazala difuzno okvaro jeter. V trebušni steni ob tem ni bilo videti hematoma ali abscesa. Na vaginalnem ultrazvoku je bila vidna normalna maternica z debelino endometrija 20 mm brez znakov zaostanka tkiva posteljice in brez znakov vnetja miometrija. Ker se je njeno stanje slabšalo, je bila premeščena na oddelk za intenzivno zdravljenje Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

Ob sprejemu je bila tahipnoična (30–40 vdihov/min) brez hipoksije, tahikardna (120 utripov/min), febrilna (37,8 °C) in hipotenzivna (90/60 mmHg). Opravili smo rutinske preiskave krvi in urina, katerih rezultati so prikazani v tabeli 1. Ker ob predhodnem antibiotičnem zdravljenju ni prišlo do izboljšanja, smo ponovno menjali protimikrobna zdravila. Dobila je imipenem, azitromicin in vankomicin. Odvzeli smo ustrezne mikrobiološke kužnine, ki so bile z izjemo protiteles razreda IgM na *Mycoplasma pneumoniae* negativne oziroma sterilne.

Tabela 1. Izvidi krvnih preiskav pri bolnici s hudo potekajočo humano granulocitno anaplazmozo. CRP – C-reaktinski protein, PCT – prokalcitonin (angl. procalcitonin), L – število levkocitov, Neseg L – poličasti granulociti, Erci – število eritrocitov, Hb – hemoglobin, Tr – število trombocitov, LDH – laktat dehidrogenaza, AF – alkalna fosfataza, AST – aspartat aminotransferaza, ALT – alanin aminotransferaza, GGT – γ -glutamil transferaza, / – vrednost ni bila določena.

Parametri	CRP (mg/L)	PCT (μ g/L)	L (10^9 /L)	Neseg L (%)	Erci (10^{12} /L)	Hb (g/L)	Tr (10^9 /L)	LDH (μ kat/L)	AF (μ kat/L)	AST (μ kat/L)	ALT (μ kat/L)	GGT (μ kat/L)
Normalne vrednosti	<5	<0,5	4–10	<5	4,2–5,4	120–160	140–340	<4,12	<1,74	<0,52	<0,56	<0,63
13.9.2010	<3	/	8,2	/	4,23	113	230	2,67	1,8	0,46	0,53	0,19
16.9.2010	45	/	11,1	/	4,57	127	142	3,74	1,5	0,78	0,53	0,23
25.9.2010	97	/	9,2	/	4,76	128	258	/	2,54	1,39	1,65	/
27.9.2010	95	0,75	6,2	/	3,91	106	80	6,1	3,56	1,39	1,12	2,67
28.9.2010	120	0,73	9,1	48	3,67	104	39	8,28	5,3	1,9	1,17	3,07
29.9.2010	167	0,98	10	23	3,82	106	21	9,23	6,11	2,74	1,33	2,98
30.9.2010	121	1,02	9,4	15	3,79	106	11	13,6	5,75	3,69	1,36	2,95
1.10.2010	88	0,83	6	10	3,92	111	21	18,12	5,07	4,06	1,29	3,28
2.10.2010	60	1	12	10	3,94	104	50	23,2	4,3	4,86	1,48	3,8
5.10.2010	34	0,23	13,9	3	3,2	91	52	16,03	3,33	1,8	1,4	4,06
6.10.2010	15	0,19	14,3	2	3,38	97	141	10,48	2,72	1,2	1,52	3,21
7.10.2010	4	/	12	2	3,52	101	210	7,41	2,49	0,97	1,99	3,11
8.10.2010	<3	/	11,5	0	3,54	104	275	6,03	2,23	0,73	1,83	2,77
10.10.2010	<3	/	8,5	0	3,96	107	401	5,65	2,11	0,62	1,5	2,62

Z računalniško tomografijo pljuč smo dokazali infiltrat v desnem spodnjem pljučnem režnju brez znakov za pljučno embolijo.

Ob podatku hude preeklampsije in znotrajmaterničnega zastoja rasti ploda smo posumili na katastrofalni antifosfolipidni sindrom in 29. septembra uvedli kortikosteroide, humane imunoglobuline in nizkomolekularni heparin (NMH). Opravili smo potrebne preiskave za potrditev delovne diagnoze. Z izjemo protiteles IgA proti β 2-glikoproteinu so bili izvidi ostalih preiskav negativni.

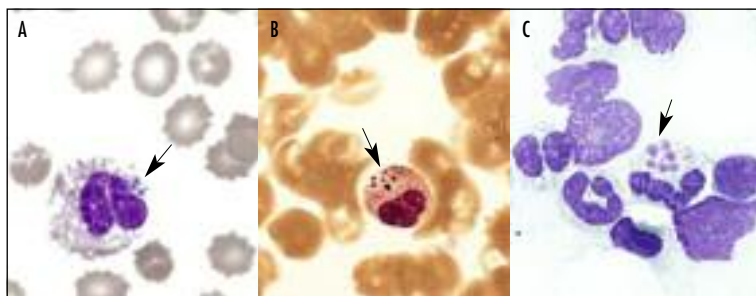
Ob vztrajanju povišane telesne temperature, poslabšanju laboratorijskih izvidov (tabela 1) in dokazu na vankomicin odporne enterokoka v blatu smo predhodno antibiotično terapijo z izjemo azitromicina ukinili in uvedli piperacilin s tazobaktamom ter daptomicin. Klinični znaki, laboratorijski izvidi, napredujoča dihalna stiska in rentgenska slika pljuč so bili skladni s sindromom dihalne stiske pri odraslih (angl. *adult respiratory distress syndrome*, ARDS), ki pa ga vzročno nismo uspeli pojasniti. Ker je vztrajala trombocitopenija, smo opravili biopsijo kostnega mozga, ki je pokazal le reaktivne spremembe. Osmi dan bolezni smo zaradi pozitivnega β -D-glukana (464 pg/ml) in izolacije glive *Candida albicans* iz izmečka uvedli kaspofungin. Istega dne smo nato zaradi neučinkovite dotedanje terapije, nadaljnega slabšanja, blage hepatopatije in trombocitopenije pomislili na možno okužbo z *A. phagocytophilum* ter ostalim protimikrobnim zdravilom dodali še doksiciklin.

Ko so v rutinskem krvnem razmazu 2. oktobra v granulocitih opazili bazofilne inkluzi-

je, ki so skladne z diagnozo HGA, smo opravili urgentno preiskavo ugotavljanja DNA bakterije *A. phagocytophilum* z metodo verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) iz polne krvi. Prav tako smo opravili mikroskopski pregled polne krvi, s katerim smo želeli dokazati morule oziroma skupke bakterij v citoplazmi granulocitov. Obe preiskavi sta bili pozitivni (slika 1A, B). Ob tem pa z metodo posredne imunofluorescence (angl. *indirect immunofluorescence assay*, IFA) specifičnih protiteles razreda IgG proti *A. phagocytophilum* nismo dokazali. Ob kontrolnem pregledu kostnega mozga smo še vedno opazili značilne morule ter v vzorcu kostnega mozga dokazali DNA *A. phagocytophilum* z metodo PCR, ki kodira 16S rRNA (slika 1C). Prisotnost DNA bakterije *A. phagocytophilum* smo v pozitivnih vzorcih dodatno potrdili s PCR, ki kodira operon *groESL* in z neposrednim sekvenciranjem produktov PCR.

Ker se je dihalna stiska poglobljala, je bila potrebna intubacija in prehodno mehansko predihavanje. V naslednjih dneh smo opažali klinično in laboratorijsko izboljšanje in bolnica je bila 6. oktobra ekstubirana. Opravili smo več zaporednih testiranj na *A. phagocytophilum* in rezultati so predstavljeni v tabeli 2. Bolnica je bila 13. oktobra odpuščena in ob kontrolnem pregledu ni imela težav.

Bolnica je vbod klopa zanikala, saj je bila pred sprejemom v bolnišnico nekaj tednov samo doma in ni hodila v naravo. Postavljen je bil sum, da je izvor okužbe lahko transfuzija krvi po operaciji. Opravili smo dodatna testiranja krvi bolnice in krvi krvodajalcev. Bolnici so 16. septembra pred transfuzijo krvi



Slika 1. A, B. Po metodi Giemsa barvani vzorci periferne krvi (povečava $\times 1000$). C. Po metodi Giemsa barvan kostni mozeg (povečava $\times 1000$). S puščicami so označene morule.

Tabela 2. Rezultati verižne reakcije s polimerazo in metode poslednje imunofluorescence za dokaz protiteles nazreda IgG proti *A. phagocytophilum* za našo bolnico in krvodajalce. PCR – verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction), IFA – posredna imunofluoresenca (angl. indirect immunofluorescence assay), neg – negativno, poz – pozitivno, NP – ni podatka.

Bolnica	Datum (2010)	15. 9. ^a	25. 9.	1. 10.	4. 10.	6. 10.	9. 10.	10. 10.	12. 10.	19. 10.	23. 10.
PCR		neg	NP	poz ^b	poz	poz	poz	neg	neg	NP	NP
IFA (IgG)		neg	NP	neg	1:128	1:512	NP	NP	1:512	1:512	> 1:1024
Opomba		transfuzija	pitčetak vročinskega stanja				zdravljenje z doksiciklinom 1.–14. 10.				brez težav
Krvodajalec	Datum (2010)	12. 5. ^a	28.–29. 8.	7. 9. ^a	20. 10.						
PCR		neg	NP	poz	neg						
IFA (IgG)		neg	NP	> 1:1024	> 1:1024						
Opomba		118 dni pred darovanjem okužene krvi	vročinsko stanje	darovanje okužene krvi	43 dni po darovanju okužene krvi						

^a retrospektivno testiranje shranjenega vzorca krvi

^b DNA je bila dokazana tudi v shranjenem vzorcu kostnega mozga

odvzeli kri za navzkrižno testiranje. Vzorec smo naknadno testirali z metodo IFA za dokaz specifičnih protiteles proti *A. phagocytophilum* kakor tudi z metodo PCR za dokaz DNA bakterije. Obe preiskavi sta bili iz omenjenega vzorca negativni. Testirali smo tudi zamrznjene vzorce plazme vseh šestih darovalcev, ki so bili shranjeni na ZTM (tabela 2).

Pri darovalcu številka 6, kjer smo dokazali specifična protitelesa razreda IgG in tudi DNA bakterije *A. phagocytophilum*, smo opravili klinični pregled in intervju. Bil je 42-letni moški, redni krvodajalec z za HGA endemskega področja Slovenije. Kri, ki jo je daroval 7. septembra, je v obliki koncentriranih eritrocitov prejela naša bolnica. Sam je povedal, da je imel v drugi polovici avgusta prehodno vročino (39 °C) z bolečinami v mišicah in sklepih. Težave so v nekaj dneh spontano minile in osebnega zdravnika takrat ni obiskal. Zadnji vbod klopa, ki se ga je spomnil, je imel 20. julija, vendar se je tudi kasneje redno gibal v naravi. Vsi dosegljivi vzorci so bili testirani in so predstavljeni v tabeli 2.

ZAKLJUČEK

Akutna okužba z *A. phagocytophilum* lahko poteka brez simptomov ali z neznatno in kratkotrajno vročino. Hude oblike bolezni so redke. V ameriškem okolju opisujejo občasno prizadetost dihal. Kašelj se pojavlja pri 19 % bolnikov, pljučnica ali ARDS pa samo pri 1 % (14). Izmed dokazanih okužb v Evropi je po znanih podatkih prizadetost dihal zelo redka in težjih oblik z odpovedjo dihanja v literaturi ni zaslediti (11–13). Smrtnost HGA je nižja od 1 % in je v veliki meri povezana s starostjo, kroničnimi boleznimi in zdravili, ki oslabijo imunost (14).

Okrnjena imunost, ki lahko spremlja nosečnost, bi bila možen povod za težjo obliko bolezni. Vendar Dhand in sodelavci opažajo, da ima HGA v nosečnosti relativno blag potek in ni povezana s hudimi zapleti (15). Zaključek je, da težji potek bolezni pri naši bolnici verjetno ni povezan s samo nosečnostjo, ki je bila ne nazadnje prekinjena s carskim rezom pred pojavom prvih simptomov. Težji potek okužbe povezujemo predvsem z relativno dolgim časom od začetka prvih simptomov do diagnoze in uvedbe ustreznega protimikrob-

nega zdravila. Nejasno pa ostaja vprašanje, kako sta na potek bolezni vplivala kratkotrajno zdravljenje s kortikosteroidi in bakterijsko breme v prejeti transfuziji krvi. Po uvedbi doksidiklina se je njeno stanje zelo hitro izboljšalo in četrty dan je bila ekstubirana. Ker so bili izvidi vseh pomembnih mikrobioloških testov, z izjemo testov na *A. phagocytophilum*, negativni, je možnost drugih, tudi bolnišničnih okužb manj verjetna.

Večina primerov HGA je posledica vbo-da klopa iz rodu *Ixodes*. Vendar med drugim v literaturi najdemo posamezne opise prenosa *A. phagocytophilum* preko posteljice oziroma ob porodu ali preko okužene krvi (7–10). Med akutno okužbo najdemo bakterije namreč v neposrednem razmazu periferne krvi, kar bi lahko predstavljalo medij za prenos okužbe. Bakken in sodelavci so opisali nekaj primerov HGA pri mesarjih, ki so bili pred okužbo poklicno izpostavljeni večjim količinam svežega jelenjega mesa (16). Predpostavlja se, da so se okužili preko stika živalske krvi s človeškimi ranami. Bolj prepričljiv je primer bolnišničnega prenosa HGA, ki je povezan s tesnim stikom s krvjo bolnika, ki je preboleval akutno vročinsko obolenje s krvavitvijo in je kasneje tudi umrl. HGA so dokazali pri devetih bolnikih, ki so bili z njim v tesnem stiku, ne pa tudi pri izvornem bolniku. Tudi prenos okužbe s klopom ni bil nedvoumno izključen (7). Povzročitelj HGA ostane viabilen pri 4 °C do 18 dni, kar omogoča prenos s transfuzijo krvi (17). Kemperman in sodelavci so opisali verjeten prenos *A. phagocytophilum* s transfuzijo krvi, vendar za razliko od našega primera okužba pri bolniku pred transfuzijo ni bila zanesljivo izključena (9). Podoben primer z enakimi pomisleki so objavili tudi Alhumaidan in sodelavci (10). V krvi bolnice, ki je bila odvzeta na dan poroda za navzkrižne teste pred predvideno transfuzijo krvi, nismo odkrili protiteles ali genoma *A. phagocytophilum*. Ker bolnica ni zapustila hiše nekaj tednov pred sprejemom v bolnišnico, je prenos s transfuzijo edini verjeten način okužbe. Ob tem je to tudi edini primer, pri katerem smo nedvoumno potrdili akutno okužbo pri darovalcu krvi. V vzorcu dajalčeve krvi, ki jo je prejela bolnica, smo dokazali visok titer specifičnih protiteles in DNA *A. phagocytophilum*, ob tem

pa so bili vzorci prejšnjih odvzemov (npr. maj 2010) negativni.

Povzročitelja HGA najdemo v granulocitih, kjer bakterije tvorijo skupke, imenovane morule. Pri naši bolnici smo dokazali morule v periferni krvi in tudi v kostnem mozgu (slika 1). Kljub temu da je bolnica prejela transfuzijo koncentriranih eritrocitov z odstranjenimi levkociti, to ni preprečilo okužbe. Vzrok za to so lahko okuženi granulociti, ki so ostali v prejeti krvi, ali proste bakterije, ki so se sprostile pri odvzemu in predelavi krvi.

Nepojasnjena ostaja serokonverzija protiteles IgA proti β 2-glikoproteinu. Možna razlaga za to je transfuzija protiteles s humanimi imunoglobulini in prekomerna aktivacija imunskega sistema med okužbo. Z nadaljnjimi preiskavami smo namreč potrdili protitelesa proti β 2-glikoproteinu v originalnem vzor-

cu humanih imunoglobulinov, ki jih je bolnica prejela. Na drugi strani v literaturi najdemo podatke, da tovrstna protitelesa nastajajo tudi pri nekaterih okužbah zaradi motenj v celični in humoralni imunosti (18).

Glede na diagnostične kriterije ameriškega Centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. *Centers for disease control and prevention*, CDC) lahko zanesljivo zaključimo, da je bila HGA pri naši bolnici in darovalcu krvi nedvoumno dokazana (19). Prvi slovenski in širše evropski primer HGA, katere vir je bila okužena kri krvodajalca, potrjuje predhodne primere iz ZDA in odkriva nove vzroke za vročino s trombocitopenijo po transfuziji krvi. Pregled krvi krvodajalcev z endemskih področij na genom *A. phagocytophilum* pa, glede na majhno število bolnikov, z ekonomskega vidika verjetno ni upravičen.

LITERATURA

1. Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, et al. Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol.* 1994; 32 (3): 589–95.
2. Petrovec M, Lotrič - Furlan S, Avšič - Županc T, et al. Human disease in Europe caused by a granulocytic Ehrlichia species. *J Clin Microbiol.* 1997; 35 (6): 1556–9.
3. Des Vignes F, Fisch D. Transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by host seeking Ixodes scapularis (Acari:Ixodidae) in southern New York state. *J Med Entomol.* 1997; 34 (4): 379–82.
4. Richter PJ Jr, Kimsey RB, Madigan JE, et al. Ixodes pacificus (Acari:Ixodidae) as a vector of Ehrlichia equi (Rickettsiales:Ehrlichieae). *J Med Entomol.* 1996; 33 (1): 1–5.
5. Petrovec M, Sumner JW, Nicholson WL, et al. Identity of ehrlichial DNA sequences derived from Ixodes ricinus tick with those obtained from patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. *J Clin Microbiol.* 1999; 37 (1): 209–10.
6. Rojko T, Uršič TM, Avšič - Županc T, et al. Seroprevalence of human anaplasmosis in slovene forestry workers.. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1078: 92–4.
7. Zhang L, Liu Y, Ni D, et al. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. *JAMA.* 2008; 300 (19): 2263–70.
8. Horowitz HW, Kilchevsky E, Haber S, et al. Perinatal transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N Engl J Med.* 1998; 339 (6): 375–8.
9. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Anaplasma phagocytophilum transmitted through blood Transfusion - Minnesota, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2008; 57 (42): 1145–8.
10. Alhumaidan H, Westley B, Esteva C, et al. Transfusion-transmitted anaplasmosis from leukoreduced red blood cells. *Transfusion.* V tisku 2012.
11. Remy V, Hansmann Y, De Martino S, et al. Human anaplasmosis presenting as atypical pneumonitis in France. *Clin Infect Dis.* 2003; 37 (6): 846–8.
12. Karlsson U, Bjoersdorff A, Massung R, et al. Human granulocytic ehrlichiosis - a clinical case in Scandinavia. *Scand J Infect Dis.* 2001; 33 (1): 73–4.
13. Lotrič - Furlan S, Rojko T, Petrovec M, et al. Epidemiological, clinical and laboratory characteristics of patients with human granulocytic anaplasmosis in Slovenia. *Wien Klin Wochenschr.* 2006; 118 (21–22): 708–13.
14. Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, et al. Ehrlichiosis in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis.* 2007; 45 Suppl 1: S45–51.
15. Dhand A, Nadelman RB, Aguerro-Rosenfeld M, et al. Human granulocytic anaplasmosis during pregnancy: case series and literature review. *Clin Infect Dis.* 2007; 45 (5): 589–93.

16. Bakken JS, Krueh J, Lund T, et al. Exposure to deer blood may be a cause of human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis.* 1996; 23 (1): 198.
17. Kalantarpour F, Chowdhury I, Wormser GP, et al. Survival of the human granulocytic ehrlichiosis agent under refrigeration conditions. *J Clin Microbiol.* 2000; 38 (6): 2398-9.
18. Loizou S, Singh S, Wypkema E, et al. Anticardiolipin, anti- β 2-glycoprotein I and antiprothrombin antibodies in black South African patients with infectious disease. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62 (11): 1106-11.
19. Centers for Disease Control and Prevention. Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. *MMWR Recomm Rep.* 1997; 46 (RR-10): 46-7.

Maja Bombek¹, Andrej Golle², Jana Rejc Marko²

Pojavnost bakterij iz rodu *Pasteurella* v kliničnih vzorcih in prikaz primera

Pasteurella spp. in Clinical Specimens and a Case Report

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Pasteurella*, okužbe ugriznih ran, sepsa, mačka, pes

Bakterije iz rodu *Pasteurella* povzročajo pri ljudeh največkrat okužbe ran po živalskih ugrizih ali opraskaninah, redkeje okužbe dihal, globljih tkiv, kosti in sklepov, zelo redko pa sistemske okužbe. Okužbe dokazujemo z mikrobiološko kulturo kužnin iz ran in prizadetih tkiv, pri sistemskih okužbah pa iz telesnih tekočin. V prispevku prikazujemo kratek pregled značilnosti bakterije in opisanih okužb, pregled pojavnosti bakterije v kliničnih vzorcih v našem laboratoriju v zadnjih treh letih ter predstavljamo primer sepsa, povzročene z bakterijo iz rodu *Pasteurella*.

ABSTRACT

KEY WORDS: *Pasteurella*, bite wound infection, sepsis, cat, dog

Pasteurella spp. are the most frequent cause of wound infections in humans due to animal bites or scratch wounds. Less frequent sites of infection include the respiratory tract, deep tissues, bones, joints and, rarely, sterile body fluids. The diagnosis is established by examining the microbiological culture of wound and tissue specimens or body fluids in the case of systemic disease. This article presents a short review of *Pasteurella* spp. infection with the description of cases in our laboratory during the past three years as well as a case report of *Pasteurella* spp. sepsis.

¹ Maja Bombek, dr. med., Zavod za zdravstveno varstvo Maribor, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; maja.bombek@zzv-mb.si

² Andrej Golle, dr. med., Zavod za zdravstveno varstvo Maribor, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

³ Jana Rejc Marko, dr. med., Oddelek za nalezljive bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ulica 5, 2000 Maribor

UVOD

Bakterije iz rodu *Pasteurella* so po Gramu negativni kokobacili, ki naseljujejo ustno votlino in prebavila številnih domačih in divjih živali. Pri ljudeh povzročajo vrsto okužb, ki so večinoma posledica pasjih in mačjih ugrizov ali opraskanin, možne pa so tudi okužbe brez znanega stika z živalmi. Večina okužb je omejenih na kožo in mehka tkiva, kjer se razvijejo celulitis in lokalizirani povrhnji kožni abscesi. Drugo najpogostejše mesto okužbe so dihala, bistveno manjši delež pa predstavlja okužbe globljih tkiv, sklepov ter sistemske okužbe (1–6).

ZNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU PASTEURELLA

Taksonomija rodu *Pasteurella* iz družine *Pasteurellaceae* je v času od prvega opisa doživela kar nekaj sprememb, še posebej z razvojem molekularnih metod. Trenutno so bakterije taksonomsko razdeljene v dve skupini. V prvo skupino, *Pasteurella* spp. sensu stricto, uvrščamo vrste *Pasteurella multocida* s tremi podvrstami (*P. multocida* subsp. *multocida*, *septica* in *gallicida*): *Pasteurella canis*, *Pasteurella dagmatis* in *Pasteurella stomatis*. V drugo skupino uvrščamo *Pasteurelli* podobne vrste, ki so genetsko bližje rodovoma *Haemophilus* spp. in *Actinobacillus* spp. Sem spadajo *Pasteurella pneumotropica*, *Pasteurella bettyae*, *Pasteurella aerogenes* in *Pasteurella caballi* (2, 3).

Bakterije iz rodu *Pasteurella* so majhni, fakultativno anaerobni, glede katalaze in oksidaze pozitivni, po Gramu negativni kratki bacili ali kokobacili. Običajno dobro zrastejo na neselektivnih gojiščih (krvni agar, čokoladni agar). Fermentirajo glukozo in saharozo, tvorijo indol ter reducirajo nitrate. Ob klasičnih mikrobioloških in biokemičnih metodah za identifikacijo navadno uporabljamo tudi različne avtomatizirane sisteme, vendar so se ti v več primerih izkazali kot nezanesljivi (2, 7, 8). Najbolj zanesljiva je identifikacija z molekularnimi metodami (določanje nukleotidnega zaporedja genov za 16S rDNA in *sodA*), ki omogoča tudi identifikacijo do nivoja podvrst *P. multocida* (1, 2, 7, 8). Chen s sodelavci pa je v študiji, kjer so iskali povezavo med podvrstami *P. multocida* in klinično sli-

ko, ugotovil tudi odlično korelacijo med zaporedjem 16S rDNA in biokemičnimi testi (trehaloza, sorbitol) za ločevanje med *P. multocida* subsp. *septica* (trehaloza +, sorbitol variabilen) in *P. multocida* subsp. *multocida* (trehaloza –, sorbitol +) (1).

Bakterije iz rodu *Pasteurella* so v splošnem občutljive za penicilin, cefalosporine druge in tretje generacije, tetracikline, kinolone in trimetoprim-sulfametoksazol, pogosto pa odporne proti cefalosporinom prve generacije, makrolidom in amikacinu. Ostali aminoglikozidi so zmerno učinkoviti (2, 3). Opisani so tudi redki primeri odpornosti proti penicilinu, posredovane z betalaktamazo, ki jo nevtalizira klavulanska kislina (2).

EPIDEMIOLOŠKE ZNAČILNOSTI IN PATOGENEZA

Bakterije iz rodu *Pasteurella* naseljujejo ustno-žrelni prostor mačk, psov, prašičev, glodavcev ter drugih domačih in divjih živali. Prvi in daleč najpogostejši tip okužbe pri ljudeh so zato okužbe kože in mehkih tkiv po ugrizih, opraskanjih ali lizanju odprtih ran (1–4). Najvišja stopnja kolonizacije je pri mačkah (50–90%), nekaj nižja pri psih (50–66%) in prašičih (51%) (9). To se odraža tudi v pogostejši osamitvi teh vrst iz mačjih (50–75%) kot iz pasjih ugrizov (20–50%) (1, 3, 10, 11). Tudi sicer se rane po mačjih ugrizih okužijo pogosteje (> 50%) kot po pasjih (15–20%) zaradi tanjših mačjih zob, ki povzročajo vbodne rane (3). Porazdelitev posameznih vrst rodu *Pasteurella* je tudi nekoliko drugačna pri okužbah po stiku s psom kot z mačko. V multicentrični študiji 50 pasjih in 57 mačjih ugrizov je pri pasjih ugrizih prevladovala *P. canis* (26%), sledila je *P. multocida* subsp. *multocida* (12%). Ta je bila pri mačjih ugrizih daleč na prvem mestu s 54%, drugo mesto pa je zasedala *P. multocida* subsp. *septica* z 28% (9). Ostale vrste so bile zastopane v manj kot 10%. Podobne ugotovitve navaja tudi študija 146 okužb s *Pasteurella* pri ljudeh (87, povezanih z mačkami, in 55 s psi), kjer je bilo od 159 izoliranih sevov 95 identificiranih kot *P. multocida* subsp. *multocida*, 21 kot *P. multocida* subsp. *septica* in 28 kot *P. canis* (4).

Z bakterijo iz rodu *Pasteurella* se lahko okužimo tudi posredno, najverjetneje preko

stika s predmeti, kontaminiranimi z živalsko slino ali z vdihovanjem mikroorganizmov. Večje tveganje za okužbo je opisano pri veterinarjih, živinorejcih, kmetih, lastnikih hišnih ljubljencev, predvsem pri imunsko oslajenih in kroničnih bolnikih. Možna je tudi kolonizacija dihalnih poti pri ljudeh, predvsem pri tistih s kroničnimi boleznimi le-teh (kronični sinusitis, kronična obstruktivna pljučna bolezen (KOPB), bronhiektazije), opisana pa je tudi pri zdravih študentih veterine (1, 3). Poleg okužb kože in mehkih tkiv se pri tem načinu okužbe pojavljajo še okužbe kosti in sklepov ter sistemske okužbe, najpogosteje pljučnica, kot posledica neposredne širitve ali hematogenega razsoja pa tudi sepsa, meningitis, endokarditis, peritonitis (3). Sistemske okužbe in pljučnico povzroča največkrat *P. multocida* subsp. *multocida*, *P. multocida* subsp. *septica* pa je bolj povezana z okužbami ran, imela pa naj bi tudi poseben tropizem za osrednje živčevje (4, 8). Tretjo skupino predstavljajo okužbe z bakterijo iz rodu *Pasteurella* brez znanega stika z živalmi, ki so zelo redke, zajemajo pa podoben spekter boleznih, kot so opisane zgoraj (3, 4, 8, 10).

Natančni mehanizmi patogeneze niso popolnoma dognani, najbrž igra vlogo več virulentnih dejavnikov (polisaharidna kapsula – serotipi od A do F, citotoksin, površinski adhezini, proteini pridobivanja železa) (2, 3). Nekoliko več pozornosti je bilo namenjeno toksinu, ki je zelo močan mitogen, zato ga proučujejo tudi v povezavi z rakom, vendar so sevi, ki so jih osamili pri ljudeh, zelo redko toksigeni (12). Osnova delovanja toksina in njegova vloga v patogenezi nista znani, v že omenjeni študiji 146 okužb sta bila od 56 testiranih izolatov samo dva seva toksigena in oba sta povzročila le manjšo okužbo rane (4).

KLINIČNA SLIKA

Najpogosteje se okužba kaže kot celulitis in lokalizirani povrhnji kožni abscesi z znaki vnetja, zatekanjem in bolečino v rani v 24 urah po okužbi. V 30–40 % je prisotna regionalna limfadenopatija, v 21–39 % serosangvinozen do gnojen izcedek iz rane, v 20 % tudi vročina. V več kot 50 % so prizadete zgornje okončine, sledijo spodnje okončine, glava, obraz, vrat. Najpogostejši zapleti so abscesi in tenosino-

vitis, redkeje septični artritis in/ali osteomielitis, do česar pride zaradi širjenja iz podkožnega tkiva ali zaradi neposredne inokulacije v periostrico ob ugrizu (3). Opisanih je kar nekaj primerov okužb kooperativnih ran, z znanim stikom z živalmi in brez znanega stika ter okužb umetnih sklepov (5, 6).

V osrednjem živčevju bakterije iz rodu *Pasteurella* najpogosteje povzročajo meningitis pri otrocih in odraslih, redko možganski absces in epi- ali subduralni empiem (4, 13). Do okužbe najpogosteje pride s hematogenim razsojem, lahko pa tudi z neposrednim širjenjem iz bližnjih struktur, kadar gre za poškodbo lobanje ali kirurške posege na lobanji. Smrtnost pri meningitisu je okrog 30 %, zato je pri meningitisu z anamnezo izpostavljenosti živalim treba pomisliti tudi na to vrsto bakterij, še posebej pri otrocih, pri katerih je tveganje prisotno zaradi slabše higiene rok po stiku z živalmi in fekalno-oralnega prenosa (13).

Endokarditis in sepsa sta zelo redka zapleta okužbe, primarni vir so navadno lokalna okužba (celulitis, artritis), pljučnica, peritonitis ali meningitis, vedno pa so prisotne pridružene bolezni, najpogosteje jetrna ciroza (3). Dihala so na drugem mestu po pogostosti osamitve bakterij iz rodu *Pasteurella* takoj za kožo in mehki tkivi, saj je tukaj možna tudi kolonizacija. Praviloma je izolirana *P. multocida* subsp. *multocida*. V zgornjih dihalih lahko povzroča sinusitis ali bronhitis, v spodnjih pa lobarno pljučnico in/ali empiem ob pridruženih boleznih pljuč (KOPB, pljučni rak, bronhiektazije). V trebušni votlini lahko povzroči spontan bakterijski peritonitis pri bolnikih z alkoholno cirozo in ascitesom, apendicitis s peritonitisom ali brez ter peritonitis ob peritonealni dializi. Vir je najverjetneje orofaringealna kolonizacija, pri vseh opisanih primerih pa je bila vir bakterije mačka (3, 11). Druge okužbe z bakterijami iz rodu *Pasteurella* so opisane zelo redko, le kot posamezni primeri endoftalmitisa, epiglotitisa, okužb genitourinarnega trakta (*P. bettiae*) (2, 3).

ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE

Prva izbira zdravljenja okužb s *Pasteurella* so penicilinski antibiotiki (penicilin G in

V, ampicilin, amoksicilin, amoksicilin s klavulansko kislino). Okužbe povrhnjih ran zdravimo ambulantno 10–14 dni. Protistafilokokni penicilini so manj učinkoviti, zato se ne priporočajo. Druga izbira so oralni cefalosporini cefiksim in cefuroksim ter parenteralni ceftriakson in cefoperazon, pri čemer učinkovitost narašča s kasnejšimi generacijami. Ne priporočajo se cefaleksin, cefaklor in cefadrok-sil.

Ob okužbah globljih tkiv je potrebno parenteralno zdravljenje v bolnišnici z betalaktamskimi antibiotiki v kombinaciji z zaviralci betalaktamaze. Pri bolnikih, ki ne prenašajo betalaktamskih antibiotikov, uporabljamo fluorokinolone ali doksiciklin ali trimetoprim-sulfametoksazol. Pri vseh okužbah, ki vključujejo kosti in sklepe, traja zdravljenje 4–6 tednov.

Prognosa pri sistemskih okužbah je slaba, v glavnem zaradi pridruženih bolezni, ki so v prvi vrsti sploh privedle do okužbe. Pri bakteriemiji, endokarditisu, pljučnici in spontanem bakterijskem peritonitisu je smrtnost zelo visoka. Preventivna raba protimikrobnih zdravil pri bolnikih z ugriznimi ranami kmalu po poškodbi brez znakov okužbe je sporna. Priporoča se pri raztrganinah, pri ranah na roki ali v bližini kosti in sklepov. Zaenkrat je narejenih le nekaj premajhnih študij, da bi lahko ocenili učinek. Večina teh okužb je polimikrobnih, zato priporočajo preventivno uporabo amoksicilina, pri bolnikih, ki so nanj alergični, pa cefuroksim ali doksiciklin ali kinolon ali trimetoprim-sulfametoksazol v kombinaciji z metronidazolom ali s klindamicinom 3–5 dni (3, 14).

PREGLED POJAVNOSTI BAKTERIJ IZ RODU *PASTEURELLA* V KLINIČNIH VZORCIH V NAŠEM LABORATORIJU

V letih 2009, 2010 in 2011 smo v našem laboratoriju pri 38 bolnikih iz 42 vzorcev izolirali bakterije iz rodu *Pasteurella*. Štirinajst izolatov smo identificirali kot *P. multocida*, 13 kot *P. canis*, dva kot *P. pneumotropica*, ostalih 13 pa smo identificirali do ravni rodu. Za identifikacijo smo uporabljali avtomatiziran sistem VITEK 2 z GN-kartico v kombinaciji s klasičnimi mikrobiološkimi metodami. Kadar je bilo treba, smo izvedli še priporočene dodatne teste. Kljub temu v 13 primerih (30 %) nismo prišli do identifikacije vrste. Pri 21 od 38 bolnikov je bil znan podatek o stiku z živalmi, od teh jih je bilo 11 (52 %) po ugrizu ali opraskanju mačke, 9 (43 %) po ugrizu psa in eden (5 %) po ugrizu navedene živali. Pri 17 od 38 bolnikov (45 %) ni bilo podatka o stiku z živalmi. V tabeli 1 so prikazani izolati glede na vrsto kužnine.

Pri pasjih ugrizih smo od skupno devet primerov v petih izolirali *P. canis*, v treh *P. multocida* in v enem *P. pneumotropica*. Pri mačjih ugrizih smo od skupno 11 primerov v dveh izolirali *P. multocida*, v dveh *P. canis*, v kar sedmih primerih pa identifikacija do vrste ni uspela.

V primerjavi s podatki iz literature je tudi v našem laboratoriju bilo obdelanih več kužnin po opraskaninah ali ugrizih mačk kot psov, čeprav je razlika nekoliko manjša. Lahko da bi bil delež drugačen, če bi bili za vse primere znani anamnestični podatki o stiku z živalmi. Tudi pri nas so prevladovale povrh-

Tabela 1. Prikaz izoliranih vrst *Pasteurelle* v različnih kužninah.

Vrsta bakterije	Število izolatov glede na vrsto kužnine					Skupaj
	Rane	Tkiva, gnoj, fistule, sklep	Razjede	Respiratorni vzorci	Hemokulture	
<i>Pasteurella multocida</i>	6	3	1	3	1	14
<i>Pasteurella canis</i>	8	1	3	1	–	13
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	1	1	–	–	–	2
<i>Pasteurella</i> spp.	8	3	1	–	1	13
SKUPAJ	23 (55%)	8 (19%)	5 (12%)	4 (9%)	2 (5%)	42 (100%)

nje rane, bilo pa je tudi nekaj kužnin iz globljih tkiv. Tudi delež ostalih kužnin (sterilne tekočine, respiratorni vzorci) je primerljiv s podatki iz literature. Glede na vrsto izoliranih bakterij je bil pri nas večji delež *P. canis*. Lahko pa bi tudi ta podatek bil drugačen, če bi vsi izolati bili identificirani do vrste. Identifikacija je mnogokrat težavna, saj so fenotipske lastnosti posameznih vrst tako podobne, da jih avtomatizirani sistemi, ki so največ v uporabi, večkrat slabo ločijo ali pa prihaja celo do napačnih identifikacij (2, 7, 8). Prva poročila uporabe ionizacije v matriksu z desorpcijo z laserjem in masnim analizatorjem časa preleta ionov (angl. *matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight*, MALDI-TOF) za identifikacijo bakterij iz rodu *Pasteurella* se zdijo obetavna, zaenkrat pa lastnih izkušenj še nimamo, saj so izolati redki (14).

PRIMER BOLNIKA S SEPTIČNIM POTEKOM BOLEZNI

Sedemindesetletni bolnik je bil sprejet na Ortopedski oddelek Univerzitetnega kliničnega centra Maribor julija 2010 zaradi suma na izpah kolka v predelu leve kolčne proteze. Bolnik je imel vstavljen kolčno protezo na obeh nogah, levo pred šestimi meseci, desno pa pred 12 meseci. Zdravil se je zaradi sladkorne bolezni, KOPB, arterijske hipertenzije, srčnega popuščanja in kronične atrijske fibrilacije.

Zbolel je tri tedne pred sprejemom z bolečinami v križu, ki so sevale v levo nogo, ob tem je imel občasno vročino z mrzlico. V bolnišnici je bil prve dni brez vročine, navajal je močne bolečine v predelu ledvene hrbtenice, zaradi česar je prejemal protibolečinska zdravila. Laboratorijski pokazatelji vnetja so bili zmerno povišani (levkociti (L) $10,1 \times 10^9/L$, C-reaktivni protein (CRP) 83 mg/L). Opravljena je bila scintigrafija okostja s tehnecijem, ki je kazala na vnetje v predelu kolčne proteze levo, ob tem je bila gibljivost kolka neboleča, kar je govorilo proti vnetju. Peti dan zdravljenja se je bolnikovo stanje iznenada poslabšalo, dobil je visoko vročino (39 °C), krvni tlak mu je izrazilo padel (70/40 mmHg), ob tem je bil prizadet, zaspan, blede, poten. Laboratorijske preiskave so pokazale porast kazalcev vnetja (L $8 \times 10^9/L$, CRP 225 mg/L). Pri bolniku so bili izraženi znaki septičnega

šoka z večorgansko prizadetostjo, zaradi česar je bil prehodno zdravljen v enoti za intenzivno zdravljenje, nato pa na oddelku za nalezljive bolezni. Iz hemokulture smo osamili bakterije iz rodu *Pasteurella*, ki je bila občutljiva za ceftriakson in ciprofloksacin. Bolnik ju je prejemal 14 dni. Bolnikovo stanje se je postopoma izboljševalo, telesna temperatura je upadla, bolečine v levi nogi so izzvenele, laboratorijski kazalci vnetja so upadli (L $6 \times 10^9/L$, CRP 22 mg/L), še naprej je imel bolečine v ledveni hrbtenici.

V času zdravljenja smo pri bolniku opravili številne preiskave, s katerimi smo poskušali opredeliti izvor okužbe. Bolnik je bil brez vidnih poškodb oz. ran na koži. Scintigrafija z označenimi levkociti, ki smo jo opravili štiri dni po pojavu vročine, je kazala na vnetje v predelu kolčne proteze levo. Iz punktata levega kolčnega sklepa, odvzetega deseti dan protimikrobnega zdravljenja, bakterije niso porasle, računalniška tomografija (angl. *computerised tomography*, CT) medenice, opravljena 16. dan zdravljenja, vnetja v predelu kolčnih protez ni potrdila. Rentgen in CT hrbtenice sta potrdila zlom prvega vretenca ledvene hrbtenice, ki je bil posledica osteporoze. Ultrazvočne preiskave trebuha in srca so bile brez posebnosti.

Bolnik je bil po štirih tednih bolnišničnega zdravljenja odpuščen domov z diagnozo: sepsa, povzročena s *Pasteurella* spp., brez jasnega izvora okužbe.

RAZPRAVA

Opisani primer ima vrsto značilnosti, ki kažejo na zelo neobičajen potek bolezni. Pri bolniku je nastopila klinična slika septičnega šoka peti dan bolnišničnega zdravljenja, kar zadošča kriterijem za bolnišnično pridobljeno okužbo, vendar pa je glede na vrsto povzročitelja bolezni bolnišnično pridobljena okužba malo verjetna. Tudi podatek o občasnih vročinah z mrzlico, ki so bile prisotne že pred sprejemom v bolnišnico, govori v prid doma pridobljene okužbe. Večina objavljenih primerov sepse, povzročene z bakterijo iz rodu *Pasteurella*, povezuje okužbo s predhodnim ugrizom oz. opraskanino mačke ali psa (15–18, 19, 20). Podatka o predhodnem stiku našega bolnika z živalmi žal ni na voljo, vendar znakov poškodbe kože pri bolniku v bolnišnici niso ugotovili.

Pri bolniku je šlo za izrazito težek potek bolezni s klinično sliko septičnega šoka. V literaturi so opisani posamezni primeri bolnikov s sepsa, povzročeno s *Pasteurella* spp., ki kot najpomembnejši dejavnik tveganja za sepsa navajajo jetrno cirozo, pogosto tudi splenektomijo oz. imunsko oslabeledost (16, 17, 20). V izraelski raziskavi, ki je zajela 77 bolnikov z okužbo s *Pasteurella* spp., je znašala smrtnost 2,6%. Večje tveganje za smrtni izid bolezni so imeli starejši od 65 let, bolniki s sladkorno boleznijo, cirozo in tisti z bakteriemijo (21). Naš bolnik je bil starejši od 65 let, imel je sladkorno bolezen, kronično bolezen pljuč in srca, potrdili smo tudi bakteriemijo.

Zanimivo je, da sta scintigrafski preiskavi, opravljeni prve dni po sprejemu v bolnišnico, kazali na znake vnetja v predelu kolčne proteze levega kolka, ki je bolnika bolel. Možno je, da je imel bolnik tudi septični artritis v predelu leve kolčne proteze. Punkcija sklepne tekočine je bila zaradi težkega kliničnega stanja bolnika opravljena šele deset dni po usmerjenem protimikrobnem zdravljenju, zato negativen rezultat bolezni ne izključuje. Bolečine v levem kolku so po 14-dnevnem zdravljenju izzvenele in CT medenice, opravljena po 14-dnevem zdravljenju, je bila v tem času že lahko brez znakov vnetja.

ZAKLJUČEK

Najpogostejše okužbe s *Pasteurella* so lokalizirani povrhnji kožni abscesi in celulitis po ugrizih ali opraskanih mačk, psov in ostalih domačih ali divjih živali. Večkrat pride do okužbe po stiku z mačko kot s psom, pri čemer prevladujejo okužbe z vrsto *P. multocida*. Okužbe se redko zapletejo, do razsoja prihaja večinoma pri imunsko oslabljenih in kroničnih bolnikih, prognoza pri takih bolnikih je slaba. Do okužbe lahko pride tudi posredno preko kontaminiranih predmetov ali z vdihavanjem mikroorganizmov, opisani pa so tudi primeri brez znanega predhodnega stika z živalmi.

Osnova diagnostike je mikrobiološka kultura kužnin iz ran in prizadetih tkiv. Ob sistemski prizadetosti jo iščemo v telesnih tekočinah. Najbolj zanesljiva identifikacija je določanje nukleotidnega zaporedja genov za 16S rDNA, avtomatizirani sistemi so večkrat nezanesljivi. Veliko si obetamo od novejših metode identifikacije z masno spektrometrijo (MALDI-TOF). Podatki iz našega laboratorija so primerljivi z navajani v literaturi, nekoliko večji je delež pasjih ugrizov in posledično tudi delež *P. canis*, vendar je naše število primerov statistično premajhno za sklepanje tehtnih zaključkov.

LITERATURA

- Chen HI, Hulten K, Clarridge JE. Taxonomic subgroups of *Pasteurella multocida* correlate with clinical presentation. *J Clin Microbiol.* 2002; 40 (9): 3438-41.
- Zbinden R, Graevenitz A von. *Actinobacillus, Capnocytophaga, Eikenella, Kingella, Pasteurella*, and other fastidious or rarely encountered gram-negative rods. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, eds. *Manual of clinical microbiology.* 10th ed. Washington: ASM Press; 2011. p. 574-87.
- Zurlo JJ. *Pasteurella* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases.* 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2010. p. 2939-42.
- Holst E, Roloff J, Larsson L, et al. Characterization and distribution of *Pasteurella* species recovered from infected humans. *J Clin Microbiol.* 1992; 30 (11): 2984-7.
- Baillot R, Voisine P, Côté LM, et al. Deep sternal wound infection due to *Pasteurella multocida*: the first case report and review of literature. *Infection.* 2011; 39 (6): 575-8.
- Heydemann J, Heydemann JS, Antony S. Acute infection of a total knee arthroplasty caused by *Pasteurella multocida*: a case report and a comprehensive review of the literature in the last 10 years. *Int J Infect Dis.* 2010; 14 Suppl 3: e242-5.
- Akahane T, Nagata M, Matsumoto T, et al. A case of wound dual infection with *Pasteurella dagmatis* and *Pasteurella canis* resulting from a dog bite - limitations of VITEK-2 system in exact identification of *Pasteurella* species. *Eur J Med Res.* 2011; 16 (12): 531-6.
- Boerlin P, Siegrist HH, Burnens AP, et al. Molecular identification and epidemiological tracing of *Pasteurella multocida* meningitis in a baby. *J Clin Microbiol.* 2000; 38 (3): 1235-7.

9. Mugambi SM, Ullian ME. Bacteremia, sepsis, and peritonitis with *Pasteurella multocida* in a peritoneal dialysis patient [pismo]. *Perit Dial Int.* 2010; 30 (3): 381-3.
10. Weber DJ, Wolfson JS, Swartz MN, et al. *Pasteurella multocida* infection. Report of 34 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 1984; 63 (3): 133-54.
11. Abrahamian FM, Goldstein EJC. Microbiology of animal bite wound infections. *Clin Microbiol Rev.* 2011; 24 (2): 231-46.
12. Lax A. The *Pasteurella multocida* toxin: a new paradigm for the link between bacterial infection and cancer [izvleček]. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2012; 361: 131-44.
13. Per H, Kumandas S, Gümüş H, et al. Meningitis and subgaleal, subdural, epidural empyema due to *Pasteurella multocida*. *J Emerg Med.* 2010; 39 (1): 35-8.
14. Satta G, Gorton RL, Kandil H. Prosthetic valve endocarditis caused by *Pasteurella* in a penicillin allergic patient: challenges in diagnosis and treatment. *Infect Dis Rep.* 2012; 4 (e32): 126-7.
15. Fernández-Valencia JA, García S, Prat S. *Pasteurella multocida* septic shock after a cat scratch in an elderly otherwise healthy woman: a case report. *Am J Emerg Med.* 2008; 26 (3): 380-3.
16. Adler AC, Cestero C, Brown RB. Septic shock from *Pasteurella multocida* following a cat bite: case report and review of literature. *Conn Med.* 2011; 75 (10): 603-5.
17. Drenjancevic IH, Ivic D, Drenjancevic D, et al. Fatal fulminant sepsis due to a cat bite in an immunocompromised patient. *Wien Klin Wochenschr.* 2008; 120 (15-16): 504-6.
18. Penketh C. An unusual case of *Pasteurella multocida* septicaemia. *Postgrad Med J.* 1983; 59 (688): 116-7.
19. Boinett C, Gonzalez A. *Pasteurella multocida* septicaemia in a patient on haemodialysis. *BMJ Case Rep.* 2009; 2009. pii: bcr01.2009.1492.
20. Ashley BD, Noone M, Dwarakanath AD, et al. Fatal *Pasteurella dagmatis* peritonitis and septicaemia in a patient in a patient with cirrhosis: a case report and review of the literature. *J Clin Pathol.* 2004; 57 (2): 210-2.
21. Nseir W, Giladi M, Moroz I, et al. A retrospective six-year national survey of *P. multocida* infections in Israel. *Scand J Infect Dis.* 2009; 41 (6-7): 445-9.

Luka Fajs¹, Miša Korva², Katarina Resman³, Tatjana Avšič - Županc⁴

Avtohtoni primeri okužb z virusom denga in Toscana v Južni Dalmaciji

Autochthonous Dengue and Toscana Virus Infections in Southern Dalmatia

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: virus denga, vročica denga, virus Toscana, Hrvaška, avtohtoni primer, Dalmacija, arbovirus, flavivirus, flebovirus, meningitis

Virusa denga in Toscana sta virusa, ki ju prenašajo členonožci in lahko povzročata različne klinične slike okužb, od klinično nezaznavnih ali blagih vročinskih bolezni do smrtno nevarnih okužb. Do nedavnega so se okužbe z obema virusoma na Hrvaškem pojavljale le pri bolnikih, ki so prišli iz krajev, kjer sta virusa endemična. Leta 2010 so poročali o prvem primeru avtohtone okužbe z virusom denga pri nemškem državljanu, ki se je vrnil z letovanja v Južni Dalmaciji. Kmalu za tem so opisali avtohtono okužbo z virusom denga pri hrvaški državljanici. Epidemiološka raziskava je dodatno potrdila prisotnost protiteles proti virusu pri zdravih prebivalcih v Južni Dalmaciji. Avtohtono okužbo z virusom Toscana smo dokazali v retrospektivni analizi vzorcev bolnikov z aseptičnim meningitisom v Južni Dalmaciji. Akutno okužbo smo potrdili pri štirih bolnikih, pri katerih smo dokazali le protitelesa razreda IgM ali protitelesa razredov IgM in IgG hkrati. Virusno RNA smo v likvorju dokazali pri enem bolniku. Filogenetska analiza nukleotidnega zaporedja virusa je pokazala, da se različica virusa uvršča v svojo, ločeno filogenetsko linijo, ki je značilno drugačna od predhodno opisanih.

ABSTRACT

KEY WORDS: dengue virus, dengue fever, Toscana virus, Croatia, autochthonous case, Dalmatia, arbovirus, flavivirus, phlebovirus, meningitis

Dengue and Toscana viruses are arthropod-borne viruses causing infections that manifest themselves as asymptomatic, mild flu-like or severe, life-threatening diseases. Until recently, infections with both viruses in Croatia were associated with patients who returned from endemic regions. The first case of autochthonous dengue virus infection in Croatia was reported in 2010 in a German citizen, returning from vacation in Southern Dalmatia. Soon after, a second autochthonous case of a Croatian citizen infected with the dengue virus, was identified. Epidemiological investigation further confirmed the presence of dengue virus-specific antibodies in a healthy population of residents in Southern Dalmatia. The first autochthonous case of Toscana virus infection was discovered in a retrospective analysis of patients

¹ Luka Fajs, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana, luka.fajs@mf.uni-lj.si

² Dr. Miša Korva, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

³ Katarina Resman, univ. dipl. bioteh., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁴ Prof. dr. Tatjana Avšič - Županc, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

with aseptic meningitis in Southern Dalmatia. Overall, four acute patients were identified based on the presence of Toscana virus-specific IgM and IgG antibodies. Furthermore, viral RNA was detected in the cerebrospinal fluid of one patient. Phylogenetic analysis of partial viral genome confirmed the infection with Toscana virus. Moreover, the phylogenetic analysis revealed that the viral variant formed a new phylogenetic lineage, which differed significantly from the two lineages previously reported.

UVOD

Virusa denga in Toscana sta virusa, ki ju prenašajo členonožci in lahko povzročata različne klinične oblike okužb, od klinično nezaznavnih ali blagih vročinskih bolezni do smrtno nevarnih okužb (1, 2). Oba virusa veljata za porajajoča se patogena, katerih zemljepisna razširjenost se zaradi podnebnih, ekoloških in človeških vplivov nenehno spreminja (3). Do nedavnega so se okužbe z virusoma na Hrvaškem pojavljale le pri bolnikih, ki so se vrnili s področij, kjer sta virusa endemična (4, 5). Življenjski krog obeh virusov je tesno povezan s prisotnostjo ustreznih prenašalcev (1, 2). Ker so prenašalci obeh virusov razširjeni na Hrvaškem, so zagotovljeni pogoji za razvoj avtohtonih primerov okužb z virusoma na tem področju, ki jih opisujemo v nadaljevanju prispevka.

VIRUS DENGA

Virus denga (DENV) uvrščamo v rod *Flavivirus*, družino *Flaviviridae*. DENV je virus z ovojnico, katerega genom predstavlja pozitivno polarna, enovijačna RNA. DENV povzroča različne klinične oblike bolezni, od asimptomatske in blage ter samoomejujoče vročinske bolezni, do klasične mrzlice denga in smrtno nevarnih oblik bolezni, denga hemoragične mrzlice in denga s sindromom šoka. Glavni prenašalci DENV so komarji iz rodu *Aedes* (predvsem vrsti *A. aegypti* in *A. albopictus* – tigrasti komar). DENV je zemljepisno najbolj razširjen virus, ki ga prenašajo členonožci (arbovirus, iz angl. *arthropod borne virus*). Virus je endemičen v jugovzhodni Aziji in v Srednji in Južni Ameriki (1). Okužbe z DENV so se Evropi pojavljale le pri bolnikih, ki so se vrnili z endemičnih področij DENV. Od

leta 2007 je bilo na Hrvaškem prijavljenih šest primerov t. i. uvoženih okužb z virusom denga, pri čemer je bilo pet primerov blagih, pri enem pa je prišlo do razvoja hemoragične oblike bolezni (4). V seroepidemiološki raziskavi, ki so jo izvedli leta 1980 na severovzhodu Hrvaške, so dokazali protitelesa proti DENV v populaciji zdravih prebivalcev, vendar je zanesljivost teh podatkov omejena zaradi slabe specifičnosti takratnih testov in navzkrižne reaktivnosti z drugimi flavivirusi (6). Razširjenost prenašalca, komarja *A. albopictus*, ki so ga na Hrvaškem prvič zaznali leta 2004 in se je od takrat razširil na celotno področje jadranske obale, odpira možnost za razširitev DENV na to področje in pojav ne le uvoženih, temveč tudi avtohtonih primerov okužb z DENV (7).

Prvi primer avtohtone okužbe z DENV v Evropi so opisali leta 2010 v južni Franciji (8). Kmalu za tem so epidemiološko službo Hrvaškega nacionalnega inštituta za javno zdravje (angl. *Croatian national institute of public health*, CNIPH) obvestili z inštituta Robert Koch v Nemčiji o primeru okužbe z DENV pri nemškem državljanu, ki je letoval v Južni Dalmaciji na Hrvaškem. Okužbo z DENV so dokazali pri 72-letniku iz Nemčije, ki se je vrnil z dvotedenskega dopusta na polotoku Pelješac. Pri bolniku so se 16. avgusta 2010 pojavili znaki vročinske bolezni: povišana telesna temperatura (do 39 °C), mrzljenje, bolečine v sklepih, glavobol in retroorbitalna bolečina. Po kratkem obdobju izboljšanja kliničnih znakov so se le-ti ponovili 21. avgusta. Serumske vzorce za virološke preiskave so odvzeli 23. in 30. avgusta ter 2. septembra. Virološke preiskave so potrdile akutno okužbo z DENV: ugotovili so DENV-specifična protitelesa razreda IgM, odsotnost DENV-specifičnih protiteles razreda IgG in prisotnost DENV-antigena

NS1 v prvih dveh serumski vzorcih. Rezultat DENV-specifične obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (angl. *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, RT-PCR) v realnem času je bil negativen. Pri serumskem vzorcu, ki je bil odvzet 2. septembra, so ugotovili porast titra specifičnih protiteles razreda IgG, raven specifičnih protiteles razreda IgM je ostala nespremenjena, encimskoimunski test za dokaz DENV antigena NS1 je bil negativen. V času inkubacijske dobe, ki je značilna za okužbe z virusom denge, bolnik ni potoval v področja, kjer je virus sicer endemičen, prav tako bolnik ni bil cepljen proti virusu klopnega meningoencefalitisa ali rumeni mrzlici. Virološke preiskave so izključile možnost okužbe s sorodnima flavivirusoma (virus zahodnega Nila in virus klopnega meningoencefalitisa). Na podlagi viroloških in epidemioloških podatkov so tako potrdili prvi primer avtohtone okužbe z DENV na Hrvaškem (9).

V CNIPH so začeli z epidemiološko raziskavo ugotavljanja novih ali prebolelih okužb z DENV na področju polotoka Pelješac in otoka Korčule. Področne epidemiološke službe in oddelke za nalezljive bolezni v lokalnih bolnišnicah so obvestili o možnosti avtohtonih okužb z DENV na Hrvaškem. Hkrati so obvestili prebivalstvo o vseh kliničnih znakih akutne okužbe z DENV.

Rezultat aktivnega obveščanja prebivalstva in zdravstvenih delavcev je bilo odkritje drugega avtohtonega primera okužbe pri hrvaški državljanke, ki prebiva v isti vasi, kjer je letoval nemški bolnik. Pri bolnici so se 17. oktobra 2010 pojavili povišana telesna temperatura, kožni izpuščaj, mrazenje, glavobol ter bolečine v sklepih in mišicah. Bolnico so sprejeli v dubrovniško bolnišnico šesti dan bolezni. Z virološkimi preiskavami so potrdili akutno okužbo z DENV: dokazali so DENV-specifična protitelesa razreda IgM in odsotnost DENV-specifičnih protiteles razreda IgG v prvem serumskem vzorcu. Za DENV-specifičen RT-PCR v realnem času je bil negativen. V drugem serumskem vzorcu, ki so ga odvzeli 19 dni po pojavu kliničnih znakov, so dokazali porast DENV-specifičnih protiteles IgM in IgG. Bolnica ni potovala v področja, kjer je virus sicer endemičen, prav tako ni bila cepljena proti virusu klopnega meningoencefa-

litisa ali rumeni mrzlici. Na podlagi omenjenih viroloških in epidemioloških podatkov so potrdili drugi primer avtohtone okužbe z DENV na Hrvaškem.

V nadaljnji epidemiološki raziskavi so zbrali 14 serumskih vzorcev zdravih prebivalcev, ki živijo v bližini hrvaške bolnice. Pri devetih posameznikih so dokazali DENV-specifična protitelesa IgG in hkrati pri sedmih posameznikih tudi DENV-specifična protitelesa IgM. Nadalje so zbrali 122 serumskih vzorcev anonimnih bolnikov, ki so iskali zdravniško pomoč v oktobru 2010. Od 122 serumskih vzorcev so pri šestih bolnikih dokazali DENV-specifična protitelesa IgG in hkrati pri petih bolnikih tudi DENV-specifična protitelesa IgM. Pri nobenem bolniku niso dokazali protiteles proti virusu zahodnega Nila (10). Izsledki te raziskave kažejo na prisotnost DENV v Južni Dalmaciji in hkrati nakazujejo možnost novih primerov okužb na tem področju. V prihodnosti je zato ključnega pomena aktivno spremljanje primerov okužb, katerih klinični znaki sovpadajo s kliničnimi znaki okužbe z DENV tako pri prebivalcih Južne Dalmacije kot tudi pri bolnikih, ki se vračajo s tega področja.

VIRUS TOSCANA

Virus Toscana (TOSV) uvrščamo v rod *Phlebovirus*, družino *Bunyaviridae*. TOSV je virus z ovojnico, katerega genom predstavljajo trije odseki negativno polarne, enovijačne RNA. TOSV je arbovirus, ki ga na človeka prenašajo peščene muhe iz rodu *Phlebotomus*. Peščene muhe najverjetneje prav tako omogočajo ohranjanje virusa v naravi. Okužba s TOSV poteka v večini primerov brez kliničnih znakov ali kot blaga vročinska bolezen, lahko pa vodi v hudo okužbo osrednjega živčevja, z meningitisom ali meningoencefalitisom (2). TOSV so prvič izolirali leta 1971 iz peščene muhe vrste *Phlebotomus perniciosus* v Toskani v Italiji (11). Virus je endemičen v sredozemskih državah, kjer krožita dve različni genetski liniji virusa (2). Danes predstavlja TOSV enega glavnih povzročiteljev aseptičnega meningitisa v poletnih mesecih v Italiji, Španiji, Portugalski, Franciji, Turčiji in na Cipru (12). Kljub ustreznim zemljepisni legi in

prisotnosti ustreznega prenašalca na Hrvaškem še niso zabeležili okužb s TOSV.

Punda-Poličeva in sodelavci so želeli preveriti vlogo TOSV kot povzročitelja aseptičnega meningitisa v poletnih mesecih pri prebivalcih Južne Dalmacije. S tem namenom so zbrali vzorce likvorja in serumske vzorce 30 bolnikov, ki so kazali znake akutne okužbe osrednjega živčevja. Vsi bolniki so bili bolnišnično zdravljeni v univerzitetni bolnišnici v Splitu med junijem in oktobrom 2007 in 2008. V osmih serumskih vzorcih so dokazali TOSV-specifična protitelesa razreda IgM in/ali IgG: pri enem bolniku so dokazali le protitelesa razreda IgM, pri treh bolnikih so dokazali protitelesa obeh razredov, pri štirih bolnikih pa le protitelesa razreda IgG. Dokaz protiteles razreda IgM ali dokaz protiteles obeh razredov kaže na akutno okužbo s TOSV. Pri bolnikih, pri katerih so dokazali le protitelesa razreda IgG, akutne okužbe niso potrdili, saj je dokaz le protiteles razreda IgG lahko povezan bodisi s pozno fazo bolezni ali z že prebolelo okužbo. Pri enem bolniku so prav tako dokazali virusno RNA v vzorcu likvorja, z metodo RT-PCR v realnem času. Filogenetska analiza dela virusnega genoma je potrdila okužbo s TOSV. Poglobljena filogenetska analiza je nadalje pokazala, da se virus ni uvrstil v nobeno od dveh do danes znanih filogenetskih linij TOSV, vendar je oblikoval svojo, ločeno filogenetsko linijo. Rezultati raziskave so jasno dokazali prisotnost nove različice virusa TOSV na Hrvaškem in hkrati nakazali, da sodi TOSV med možne povzročitelje aseptičnega meningitisa v poletnih mesecih pri prebivalcih Hrvaške, kot tudi pri tistih, ki se vračajo s Hrvaške (5).

ZAKLJUČEK

Pojav avtohtonih primerov okužb z DENV in TOSV ima velik pomen za javno zdravje na

področju Hrvaške, saj se lahko obe bolezni razvijeta v klinično težko obliko, tudi s smrtnim izidom. Prisotnost ustreznih prenašalcev virusov na Hrvaškem prav tako omogoča ustalitev obeh virusov na tem področju in širitev na sosednja, neendemična področja, kjer sta prenašalca prav tako prisotna. Pojav avtohtonih primerov okužb z DENV in TOSV igra pomembno vlogo tudi pri obravnavanju bolnikov z neendemičnih področij, ki se vračajo s Hrvaške in imajo značilne klinične znake. To velja tudi za slovenske bolnike, predvsem zaradi priljubljenosti Hrvaške kot turistične destinacije, pa tudi zaradi same zemljepisne bližine in možnosti pojava avtohtonih primerov bolezni v Sloveniji. V zadnjih letih se je namreč tudi v Sloveniji razširil komar vrste *A. albopictus*, ki omogoča prenos DENV (13). Spremljanje prisotnosti DENV v Sloveniji bo zato igralo veliko vlogo v naslednjih letih tako na nivoju prepoznave kliničnih primerov, pripravljenosti mikrobioloških laboratorijev kot tudi pripravljenosti epidemioloških služb v primeru izbruhov bolezni.

Podatkov o prisotnosti prenašalca TOSV v Sloveniji ni, zato je verjetnost pojava avtohtonih primerov okužb s TOSV neznana. Po drugi strani zemljepisna lega in podnebje v delih Slovenije predstavljata ugodno okolje za razširitev peščenih muh, zato bo v prihodnosti nujno potrebno spremljanje pojavnosti tega prenašalca, saj je s tem povezano tudi tveganje za pojav okužb s TOSV in drugimi flebovirusi. Pojav avtohtonih primerov okužb z DENV in s TOSV v naši bližnji okolici hkrati predstavlja resno svarilo pred vnosom tudi drugih arbovirusnih bolezni, ki se širijo v Evropi, kot sta na primer virus zahodnega Nila in virus chikungunya, katerih prenašalci so prisotni tudi v Sloveniji (12). Zaradi tega je pri diferencialni diagnostiki treba upoštevati možnost okužb z virusi, ki do danes niso bili prisotni na našem ozemlju.

LITERATURA

1. Avšič - Županc T, Saksida A. Flavivirusi. In: Poljak M, Petrovec M, eds. Medicinska virologija. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011. p. 151-67.
2. Saksida A. Bunjavirusi. In: Poljak M, Petrovec M, eds. Medicinska virologija. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011. p. 169-81.
3. Weaver SC, William KR. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* 2010; 85 (2): 328-45.

4. Pinazo MJ, Munoz J, Betica L, et al. Imported dengue hemorrhagic fever, Europe. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14 (8): 1329–30.
5. Punda - Polić V, Mohar B, Duh D, et al. Evidence of an autochthonous Toscana virus strain in Croatia. *J Clin Virol.* 2012; 55 (1): 4–7.
6. Ropac D, Gould E, Punda V, et al. Dengue viruses in northeastern Croatia. *Lijec Vjesn.* 1988; 110 (6–7): 177–80.
7. Klobucar A, Merdic E, Benic N, et al. First record of *Aedes albopictus* in Croatia. *J Am Mosq Control Assoc.* 2006; 22 (1): 147–8.
8. La Ruche G, Souares Y, Armengaud A, et al. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill* [internet]. 2010 [citirano 2012 Jun 30]; 15 (39): 19676. Dosegljivo na: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19676>
9. Schmidt - Chanasit J, Haditsch M, Schöneberg I, et al. Dengue virus infection in a traveller returning from Croatia to Germany. *Euro Surveill* [internet]. 2010 [citirano 2012 Jun 30]; 15 (40): 19677. Dosegljivo na: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19677>
10. Gjenero - Margan I, Aleraj B, Krajcar D, et al. Autochthonous dengue fever in Croatia, August–September 2010. *Euro Surveill* [internet]. 2011 [citirano 2012 Jun 30]; 16 (9): 19805. Dosegljivo na: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19805>
11. Verani P, Nicoletti L, Ciufolini MG. Antigenic and biological characterization of Toscana virus, a new Phlebotomus fever group virus isolated in Italy. *Acta Virol.* 1984; 28 (1): 39–47.
12. 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.
13. Petrić D, Zgomba M, Ignjatovic Cupina A, et al. Invasion of the *Stegomyia albopicta* to a part of Europe [izvleček]. 15th European SOVE Meeting; 2006 Apr 10–14; Serres, Greece. Abstract: 58.

Maja Rupnik¹, Valerija Zidarič², Matjaž Ocepek³, Sandra Janežič⁴

Zoonotski potencial bakterije *Clostridium difficile*

Zoonotic Potential of *Clostridium difficile*

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Clostridium difficile*, PCR-ribotip, mleto meso, farmske živali, spore

Clostridium difficile spada med pomembnejše povzročitelje bolnišničnih črevesnih okužb pri ljudeh, narašča pa tudi število doma pridobljenih okužb pri bolnikih brez predhodne hospitalizacije. Ker postaja vse pogostejši povzročitelj tudi pri farmskih živalih (prašiči, govedo), dobro pa se ujemajo tudi genotipi (PCR-ribotipi), prisotni tako pri ljudeh kot živalih, se zanimanje za zoonotski potencial bakterije *C. difficile* povečuje. Med PCR-ribotipi ki jih najdemo pri obeh gostiteljih, je v številnih državah najpogostejši PCR-ribotip 078. Za Slovenijo imamo podatke o primerjavi sevov *C. difficile* med ljudmi in živalmi od leta 2008 naprej. PCR-ribotip 078 pri ljudeh v Sloveniji izoliramo le redko, pri živalih pa ga do sedaj še nismo. Vendar je kar 19 drugih PCR-ribotipov takšnih, ki se v Sloveniji pojavljajo tako pri ljudeh kot pri živalih, predvsem pri prašičih in perutnini. Možne poti prenosa med živalmi in ljudmi so stik, okolje (uporaba farmskih odpadkov, aerogeni prenosi v okolico farm) in hrana. *C. difficile* je bil največkrat dokazan v mletem mesu, pa tudi v mesnih izdelkih, solatah, zelenjavi in školjkah. Načini kontaminacije hrane niso dobro dokumentirani, znano pa je, da so živali v času zakola le redko kolonizirane s *C. difficile*. Prav tako ni poznan pomen kontaminirane hrane kot vira okužbe, saj je količina prisotnih spor običajno majhna, odstotek pozitivnih vzorcev v novejših študijah pa sega do 12 % v Severni Ameriki in do 5 % v Evropi.

ABSTRACT

KEY WORDS: *Clostridium difficile*, PCR-ribotype, minced meat, farm animals, spores

Clostridium difficile is one of the important etiological agents of nosocomial intestinal infections, but the proportion of community-acquired cases without any previous hospitalization is also increasing. The prevalence of *C. difficile* in farm animals (in particular pigs and cattle) is increasing as well. Due to a considerable overlap of PCR-ribotypes, present in humans and in animals, there is an increased interest in zoonotic potential of *C. difficile*. PCR-ribotype 078 is the most prevalent type associated with both host types in several countries worldwide. In Slovenia, however, this ribotype has not yet been detected in animals and is only rarely

¹ Izr. prof. dr. Maja Rupnik, univ. dipl. biol., Zavod za zdravstveno varstvo Maribor, Center za mikrobiologijo, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor; Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Slomškov trg 15, 2000 Maribor; Center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov (Cipkebiip), Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana; maja.rupnik@zzv-mb.si

² Valerija Zidarič, univ. dipl. mikrobiol., Zavod za zdravstveno varstvo Maribor, Center za mikrobiologijo, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

³ Viš. znan. sod. dr. Matjaž Ocepek, dr. vet. med., Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, 1000 Ljubljana

⁴ Asist. dr. Sandra Janežič, univ. dipl. mikrobiol., Zavod za zdravstveno varstvo Maribor, Center za mikrobiologijo, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

isolated from humans. According to data on *C. difficile*, available for Slovenia since 2008, we have 19 PCR-ribotypes present in both humans and animals (mainly pigs and poultry). Transmissions between animals and humans can include contact, environmental spread (e.g. use of farm sewage, aerogenic transmission of the spores to the farm surroundings) and food. *C. difficile* is most often detected in minced meat, but also in meat products, salads, vegetables and seafood. Contamination pathways are not clarified, yet it is documented that animals at slaughter are only rarely colonized with *C. difficile*. The role of contaminated food as a source of infection is also not known as the spore numbers are very low. The proportion of *C. difficile* positive samples reported in recent studies from North America (up to 12%) and Europe (5%) is also low.

UVOD

Clostridium difficile je po Gramu pozitivna, sporogena anaerobna bakterija. Odkar je bila pred 35 leti dokazana kot povzročitelj črevesnih okužb pri človeku, jo uvrščamo med povzročitelje bolnišničnih okužb (1). Večina objav je opisovala večje ali manjše izbruhe okužb v bolnišnicah, študije pa so pokazale, da odstotek koloniziranih bolnikov narašča s časom hospitalizacije, kar prav tako kaže na bolnišnično okolje kot vir okužbe. Določen delež okužb z bakterijo *C. difficile* se pojavlja tudi pri ljudeh v domačem okolju, število izvenbolnišničnih okužb pa v zadnjem desetletju narašča (2, 3). Ta porast je verjetno delno posledica sprememb pri prehajanju bolnikov iz bolnišničnega v domače okolje, saj je bil velik del bolnikov z izvenbolnišnično okužbo s *C. difficile* v preteklih šestih mesecih hospitaliziran. Pojavljajo pa se tudi bolniki z izvenbolnišnično okužbo, ki v zadnjih nekaj mesecih niso imeli posrednega ali neposrednega stika z bolnišničnim okoljem. Poleg bolnišničnega okolja so zato pomembni tudi drugi rezervoarji, predvsem asimptomatski klicenosci in živali.

Kot za večino klostridijev so tudi za bakterijo *C. difficile* naravno okolje prebavila živali in ljudi. Bakterija *C. difficile* je bila občasno izolirana iz zelo različnih živalskih vrst, največ študij pa je bilo povezanih s konji (4). Z objavami o prisotnosti bakterije *C. difficile* pri farmskih živalih (npr. sesni prašički in telički) ter predvsem z objavo kanadske raziskave, ki je opisovala prisotnost spor bakterije *C. difficile* v 20% vzorcev mesa, namenjenega prodaji, pa se je zanimanje za zoonotski potencial

bakterije *C. difficile* začelo povečevati (2, 3, 5–12).

CLOSTRIDIUM DIFFICILE PRI ŽIVALIH

Bakterijo *C. difficile* so izolirali iz različnih živalskih vrst, kot so laboratorijski glodavci (miši, hrčki), divje živali (zajec, pingvin, kamelela, medved, slon, itd.), farmske živali in hišni ljubljenci (konji, prašiči, govedo, drobnica, perutnina, psi, mačke) (11). Za razliko od ljudi, kjer so otroci do dveh let pogosto kolonizirani, vendar redko zbolijo, najpogostejšo skupino bolnikov pa predstavljajo starejši nad 65 let, je pri živalih situacija obratna. Bakterija *C. difficile* je pogosta predvsem pri mladih živalih z drisko ali brez, s starostjo pa odstotek koloniziranih živali upada. V času zakola je odstotek koloniziranih živali nizek, npr. 1,8% pri govedu v Združenih državah Amerike (ZDA), 4,5% pri govedu, 3,3% pri prašičih in 5% pri perutini v Avstriji ter 0,5% pri govedu in 0% pri prašičih v Švici (13–15). Starejše živali podobno kot ljudje zbolijo le, če so zdravljene z antibiotiki. Ne glede na starost živali so bolezenski znaki (driska, hemoragični kolitis, psevdomembranozni kolitis) podobni kot pri ljudeh, prav tako je podobna histologija sprememb na črevesni steni (3, 5, 16). Kljub omenjenim podobnostim pa tako pri pujskih kot pri teletih povezava med prisotnostjo bakterije *C. difficile* in boleznijo ni v sozmerju, saj so v nekaterih raziskavah našli bakterijo v visokih odstotkih tudi pri asimptomatskih živalih (6, 16, 17).

V Sloveniji smo z raziskavami o prisotnosti bakterije *C. difficile* pri nekaterih farmskih

živalih (prašiči, perutnina) pričeli zelo zgodaj, medtem ko so podatki za konje, teleta, drobnico, pse in mačke precej sporadični (18–20). Na vseh devetih prašičjih farmah, ki so bile vključene v raziskavo, smo pri sesnih prašičkih lahko dokazali bakterijo *C. difficile*, odstotki pozitivnih vzorcev na posamezni farmi pa so se gibali od 10 % do 80 % (18). V Sloveniji smo bili tudi prvi v Evropski uniji (EU), ki smo objavili raziskave o *C. difficile* pri perutnini in pokazali, da je odstotek koloniziranih živali visok ter da podobno kot pri drugih živalih upada z njihovo starostjo (20).

CLOSTRIDIUM DIFFICILE V HRANI

Spore bakterije *C. difficile* najdemo predvsem v svinjskem, govejem, puranjem in piščančjem mesu ter v različnih mesnih izdelkih, pa tudi v školjkah in ribah, pripravljenih solatah in na surovi zelenjavi (11, 12, 21–25). Rodriguez-Palacios in sodelavci poročajo tudi o možnem sezonskem pojavljanju bakterije *C. difficile* v hrani, saj so imeli januarja in februarja 11,5 % pozitivnih vzorcev, od marca do avgusta pa le 4 % (26).

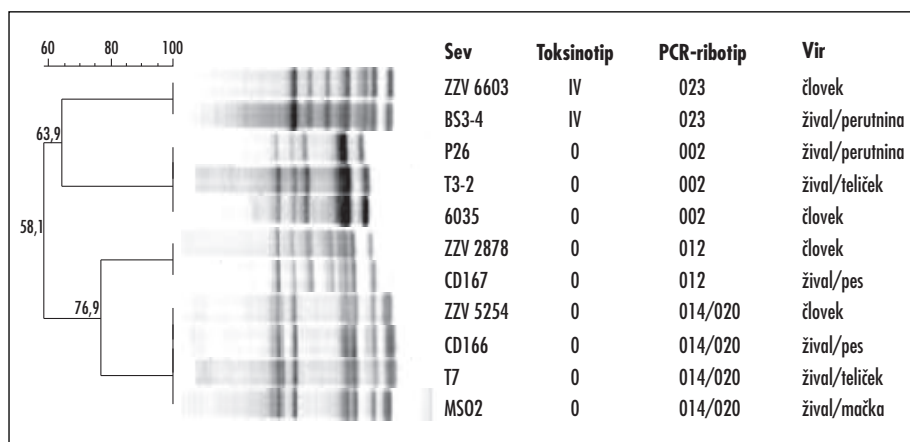
Sprva so v Severni Ameriki poročali o zelo visokih odstotkih vzorcev mletega mesa in mesnih izdelkov, ki so vsebovali *C. difficile*: 20 % v Kanadi in 37–50 % v ZDA (7, 27). V kasnejših raziskavah iz istih držav so bili odstotki precej nižji; v Kanadi 4,6–12,8 % ter 2 % v ZDA (11, 28). Samo v eni raziskavi so poro-

čali, da so našli bakterijo *C. difficile* v kar 20 % vzorcev že pripravljene mesne hrane v bolnišnici (Koo in sodelavci, 2010 IDSA, abstrakt LB-50). V vseh evropskih državah, za katere so na voljo raziskave o prisotnosti bakterije *C. difficile* v hrani, je delež pozitivnih vzorcev konstantno nizek: 0–3 % vzorcev govejega ali mešanega govejega in svinjskega mesa, 6,3 % vzorcev jagnjetine in 2,4 % vzorcev piščančjega mesa (2). Naši podatki za Slovenijo (Zidarč in Rupnik, neobjavljeni podatki) se s temi rezultati ujemajo, saj med 59 vzorci govejega, svinjskega in piščančjega mesa ali mesnih izdelkov ni bil niti eden pozitiven. Prav tako je bilo negativnih osem vzorcev solat in kalčkov. Bakterijo *C. difficile* smo izolirali le s površine enega od skupno 49 kokošjih jajc, ki smo jih pregledali.

Kot je bilo predhodno omenjeno, je prekuženost različnih živali ob zakolu zelo majhna ali pa bakterije *C. difficile* sploh ne zaznamo. Načini in mesta kontaminacije mesa s sporami do sedaj niso bili opisani, verjetno pa je, da gre večinoma za dogodke med procesiranjem in pripravo za prodajo (7, 28).

CLOSTRIDIUM DIFFICILE – TOKSINI, TOKSINOTIPIZACIJA IN PCR-RIBOTIPIZACIJA

C. difficile dela tri toksine. Dva med njimi, toksin A (TcdA, enterotoksin) in toksin B (TcdB,



Slika 1. Primerjava vzorcev fragmentov (pomnožene medgenske regije ribosomskih operonov), ki jih dobimo pri PCR-ribotipizaciji za človeške in živalske izolate. PCR – verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction).

citotoksin), sta glavna dejavnika virulence in odgovorna za nastanek bolezenskih znakov (1). Vloga tretjega toksina, binarnega toksina CDT, še ni pojasnjena v celoti. Zapis za toksina A in B leži v kromosomu in glede na razlike v toksinskih genih lahko seve razdelimo v 31 toksinotipov, ki jih označimo z rimskimi številkami (1).

Prav tako lahko seve bakterije *C. difficile* nadalje razlikujemo s pomočjo številnih molekularnih tipizacijskih metod, med katerimi se kot mednarodni standard uveljavlja PCR-ribotipizacija (29). PCR-ribotipizacija temelji na pomnoževanju medgenskih regij ribosomskih operonov, ki so v kromosomu bakterije *C. difficile* prisotne v več kopijah in se med seboj razlikujejo v dolžini (slika 1). Z enim parom začetnih oligonukleotidov in eno samo PCR (angl. *polymerase chain reaction*) tako dobimo vzorec fragmentov, na podlagi katerega določimo PCR-ribotip. Trenutno je znanih več kot 350 PCR-ribotipov, primerljivost med študijami pa je možna, če so označeni s standardno Cardiff nomenklaturto (npr. 001, 002, itd.).

Določeni PCR-ribotipi so pogosteje povezani z izbruhi ali s težjim potekom bolezni, npr. PCR-ribotip 027 (30). Nedavna evropska študija pa je pokazala, da so v državah EU trenutno s težjimi obolenji povezani drugi PCR-ribotipi (018, 056) (31).

CLOSTRIDIUM DIFFICILE – ZONOTSKI POTENCIAL

Dokazi prenosov med ljudmi in živalmi so v primeru bakterije *C. difficile* posredni in so povezani predvsem z ugotovitvijo, da je večina PCR-ribotipov, ki jih najdemo pri ljudeh, lahko prisotna tudi pri živalih in v hrani (2, 32). PCR-ribotip 078/toksintip V je eden izmed najpogostejših tipov pri različnih živalih, npr. pujskih, teličkih in konjih (8, 11, 12, 32). Ta PCR-ribotip je bil nekdaj med humanimi izolati redek, leta 2008 pa je bil v presečni evropski študiji naveden kar kot tretji najpogostejši PCR-ribotip pri hospitaliziranih bolnikih (31, 33, 34). Prav tako se PCR-ribotip 078/toksintip V zelo pogosto pojavlja tudi pri izvenbolnišničnih okužbah v Ameriki in Evropi (2, 3). Podatki iz Nizozemske kažejo, da je pojavnost okužb s sevi

ribotipa 078 pogostejša v predelih s prašičji farmami (2). Z bolj diskriminatorskimi tipizacijskimi metodami (npr. s hkratno analizo večjega števila lokusov z variabilnim številom tandemskih ponovitev (angl. *multiple-locus variable-number tandem repeat analysis*, MLVA) ali s pulzno gelsko elektroforezo (angl. *pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE)) so pokazali, da so človeški in živalski sevi *C. difficile* ribotipa 078 lahko identični (34–37).

Tudi podatki za Slovenijo kažejo, da se 19 od 90 PCR-ribotipov, ki smo jih zaznali v letih 2008–2010, pojavlja pri ljudeh in živalih (38). Nekateri izmed njih so prikazani na sliki 1. Med temi 19 ni PCR-ribotipa 078, ki ga v Sloveniji občasno izoliramo pri ljudeh, pri živalih pa sploh ne. Namesto PCR-ribotipa 078 so pri slovenskih živalih (predvsem pujskih) prisotni drugi PCR-ribotipi znotraj toksinotipa V (PCR-ribotip 045) (38).

Načini prenosa med živalmi in ljudmi so lahko hrana, stik ali okoljski dejavniki. Med slednjimi je lahko pomembna uporaba gnoja ali vode iz farm za gnojenje obdelovalnih površin, fekalna kontaminacija vodnih virov ali aerogeni prenos spor v okolico prašičjih farm (3, 39). Prenos s stikom morda najbolje ponaazarjata dokumentirana primera iz Kanade, kjer sta psa, ki sta sodelovala v programu obiskovanja bolnikov, bila nosilca bakterije *C. difficile*. V enem primeru so bakterijo našli v vzorcu blata psa, v drugem pa so pri psu po obisku bolnika bakterijo *C. difficile* našli na tačkah, medtem ko je bil pred obiskom rezultat testiranja negativen (40, 41).

PCR-ribotipi, ki so prisotni v hrani, se večinoma ujemajo s PCR-ribotipi, ki krožijo v istem času in istem geografskem območju pri ljudeh. V ZDA in Kanadi je ponovno najpogostejši PCR-ribotip 078, prav tako je pogost PCR-ribotip 027 (2). V Evropi so ribotip 078 našli le v školjkah, medtem ko so PCR-ribotipi v mesu in mesnih izdelkih drugačni in se ponavadi deloma ujemajo z lokalnimi človeškimi PCR-ribotipi, npr. v Avstriji in na Nizozemskem (42, 43). Pomen prisotnosti spor bakterije *C. difficile* v hrani ni znan, saj ni znana infektivna doza za okužbo z omenjeno bakterijo. So pa spore prisotne tudi v živilih, ki jih ni potrebno termično obdelati (solate, mesni izdelki), in termično obdelanih živilih (Koo in sodelavci, 2010, IDSA, abstrakt LB-50).

ZAKLJUČEK

Razlike med PCR-ribotipi pri živalih in ljudeh so bile pred 15 leti veliko večje, kot so danes (9). Zelo verjetno je, da so farmske živali eden od

porajajočih se rezervoarjev za bakterijo *C. difficile* in so predvsem vir za izvenbolnišnične okužbe (2, 3). Poti prenosa so lahko stik z živalmi, okolje ali hrana, ki pa je kontaminirana z manjšimi količinami spor in še to le občasno.

LITERATURA

1. Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. Clostridium difficile infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7 (7): 526–36.
2. 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.
3. Squire MM, Riley TV. Clostridium difficile infection in humans and piglets: A 'One Health' opportunity. *Curr Top Microbiol Immunol.* V tisku 2012.
4. Baverud V. Clostridium difficile infections in animals with special reference to the horse. A review. *Vet Q.* 2002; 24 (4): 203–19.
5. Songer JG, Anderson MA. Clostridium difficile: an important pathogen of food animals. *Anaerobe.* 2006; 12 (1): 1–4.
6. Rodriguez-Palacios A, Stampfli HR, Duffield T, et al. Clostridium difficile PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12 (11): 1730–6.
7. Rodriguez-Palacios A, Staempfli HR, Duffield T, et al. Clostridium difficile in retail ground meat, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13 (3): 485–7.
8. Gould LH, Limbago B. Clostridium difficile in food and domestic animals: a new foodborne pathogen? *Clin Infect Dis.* 2010; 51 (5): 577–82.
9. Rupnik M. Is Clostridium difficile-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13 (5): 457–9.
10. Rupnik M. Clostridium difficile: (re)emergence of zoonotic potential. *Clin Infect Dis.* 2010; 51 (5): 583–4.
11. Rupnik M, Songer JG. Clostridium difficile its potential as a source of foodborne disease. *Adv Food Nutr Res.* 2010; 60: 53–66.
12. Weese JS, Reid-Smith RJ, Avery BP, et al. Detection and characterization of Clostridium difficile in retail chicken. *Lett Appl Microbiol.* 2010; 50 (4): 362–5.
13. Rodriguez-Palacios A, Koochmaria M, LeJeune JT. Prevalence, enumeration, and antimicrobial agent resistance of Clostridium difficile in cattle at harvest in the United States. *J Food Prot.* 2011; 74 (10): 1618–24.
14. Indra A, Lassnig H, Baliko N, et al. Clostridium difficile: a new zoonotic agent? *Wien Klin Wochenschr.* 2009; 121 (3–4): 91–5.
15. Hoffer E, Haechler H, Frei R, et al. Low occurrence of Clostridium difficile in fecal samples of healthy calves and pigs at slaughter and in minced meat in Switzerland. *J Food Prot.* 2010; 73 (5): 973–5.
16. Hammitt MC, Bueschel DM, Keel MK, et al. A possible role for Clostridium difficile in the etiology of calf enteritis. *Vet Microbiol.* 2008; 127 (3–4): 343–52.
17. Alvarez-Perez S, Blanco JL, Bouza E, et al. Prevalence of Clostridium difficile in diarrhoeic and non-diarrhoeic piglets. *Vet Microbiol.* 2009; 137 (3–4): 302–5.
18. Avbersek J, Janezic S, Pate M, et al. Diversity of Clostridium difficile in pigs and other animals in Slovenia. *Anaerobe.* 2009; 15 (6): 252–5.
19. Pirs T, Ocepek M, Rupnik M. Isolation of Clostridium difficile from food animals in Slovenia. *J Med Microbiol.* 2008; 57 (Pt 6): 790–2.
20. Zidaric V, Zemljic M, Janezic S, et al. High diversity of Clostridium difficile genotypes isolated from a single poultry farm producing replacement laying hens. *Anaerobe.* 2008; 14 (6): 325–7.
21. Pasquale V, Romano V, Rupnik M, et al. Occurrence of toxigenic Clostridium difficile in edible bivalve molluscs. *Food Microbiol.* 2012; 31 (2): 309–12.
22. Metcalf D, Avery BP, Janecko N, et al. Clostridium difficile in seafood and fish. *Anaerobe.* 2011; 17 (2): 85–6.
23. Bakri MM, Brown DJ, Butcher JP, et al. Clostridium difficile in ready-to-eat salads, Scotland. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15 (5): 817–8.
24. al Saif N, Brazier JS. The distribution of Clostridium difficile in the environment of South Wales. *J Med Microbiol.* 1996; 45 (2): 133–7.
25. Metcalf DS, Costa MC, Dew WM, et al. Clostridium difficile in vegetables, Canada. *Lett Appl Microbiol.* 2010; 51 (5): 600–2.

26. Rodriguez-Palacios A, Reid-Smith RJ, Staempfli HR, et al. Possible seasonality of *Clostridium difficile* in retail meat, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15 (5): 802–5.
27. Songer JG, Trinh HT, Killgore GE, et al. *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15 (5): 819–21.
28. Curry SR, Marsh JW, Schlackman JL, et al. Prevalence of *Clostridium difficile* in uncooked ground meat products from Pittsburgh, Pennsylvania. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78 (12): 4183–6.
29. Janezic S, Rupnik M. Molecular typing methods for *Clostridium difficile*: pulsed-field gel electrophoresis and PCR ribotyping. *Methods Mol Biol.* 2010; 646: 55–65.
30. Kuijper EJ, Coignard B, Tull P. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12 Suppl 6: 2–18.
31. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet.* 2011; 377 (9759): 63–73.
32. Keel K, Brazier JS, Post KW, et al. Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *J Clin Microbiol.* 2007; 45 (6): 1963–4.
33. Barbut F, Mastrantonio P, Delmee M, et al. Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13 (11): 1048–57.
34. Jhung MA, Thompson AD, Killgore GE, et al. Toxinotype V *Clostridium difficile* in humans and food animals. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14 (7): 1039–45.
35. Bakker D, Corver J, Harmanus C, et al. Relatedness of human and animal *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 isolates determined on the basis of multilocus variable-number tandem-repeat analysis and tetracycline resistance. *J Clin Microbiol.* 2010; 48 (10): 3744–9.
36. Debast SB, van Leengoed LA, Goorhuis A, et al. *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 toxinotype V found in diarrhoeal pigs identical to isolates from affected humans. *Environ Microbiol.* 2009; 11 (2): 505–11.
37. Koene MG, Mevius D, Wagenaar JA, et al. *Clostridium difficile* in Dutch animals: their presence, characteristics and similarities with human isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18 (8): 778–84.
38. 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 (1): 48.
39. Keessen EC, Donswijk CJ, Hol SP, et al. Aerial dissemination of *Clostridium difficile* on a pig farm and its environment. *Environ Res.* 2011; 111 (8): 1027–32.
40. Lefebvre SL, Arroyo LG, Weese JS. Epidemic *Clostridium difficile* strain in hospital visitation dog. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12 (6): 1036–7.
41. Lefebvre SL, Weese JS. Contamination of pet therapy dogs with MRSA and *Clostridium difficile*. *J Hosp Infect.* 2009; 72 (3): 268–9.
42. Jobstl M, Heuberger S, Indra A, et al. *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. *Int J Food Microbiol.* 2010; 138 (1–2): 172–5.
43. de Boer E, Zwartkruis-Nahuis A, Heuvelink AE, et al. Prevalence of *Clostridium difficile* in retailed meat in the Netherlands. *Int J Food Microbiol.* 2011; 144 (3): 561–4.

Jerneja Ambrožič - Avguštin¹, Irena Zdovc², Izток Štrumbelj³

***Escherichia coli* z betalaktamazami z razširjenim spektrom delovanja – primerjava genotipov izolatov iz obolelih živali in živil živalskega izvora z genotipi iz človeških kužnin**

***Escherichia coli* Producing Extended-Spectrum Beta-Lactamases – Genotypes of Isolates from Diseased Animals and Food of Animal Origin Compared with Genotypes of Human Clinical Isolates**

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: *Escherichia coli*, betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja, dejavniki virulence, filogenetske skupine, živila živalskega porekla

Bakterija *Escherichia coli* je pri človeku in drugih toplokrvnih živalih sestavni del komezalne mikrobne združbe prebavnega trakta. Z ustreznim naborom genskih zapisov za dejavnike virulence pa lahko povzročijo različne črevesne in zunajčrevesne okužbe. Zdravljenje slednjih je v zadnjem času pogosto oteženo ali celo neuspešno zaradi povečanja števila izolatov, ki izločajo betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja. Možni vir odpornih in virulentnih sevov *E. coli* je sodobna živinoreja in posledično hrana živalskega izvora. V naši raziskavi smo primerjali genotipe sevov *E. coli*, ki so bili izolirani iz človeških in živalskih kužnin ter zdravih živali, namenjenih prehrani, ob zakolu. Ugotovili smo, da ima velik delež izolatov iz zdravih živali genske zapise za betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja, predvsem iz skupine CTX-M. Ti izolati imajo nekatere genske zapise za dejavnike virulence, ki so značilni za patogene seve, hkrati pa se v velikem deležu uvrščajo v filogenetsko skupino, ki je povezana z zunajčrevesnimi okužbami pri človeku. Iz naših preliminarnih rezultatov je razvidno, da je hrana živalskega porekla lahko vir odpornih in patogenih sevov *E. coli*, zato je nujno potrebna čimprejšnja poglobljena primerjava in analiza genotipov izolatov iz zdravih in obolelih živali in ljudi ter prehranskih izdelkov živalskega porekla.

ABSTRACT

KEY WORDS: *Escherichia coli*, extended-spectrum beta-lactamases, virulence factors, phylogenetic groups, food of animal origin

Escherichia coli is a part of the normal gut microbiota of humans and warm-blooded animals. Strains carrying (encoding) specific virulence factor genes can cause either intestinal or extraintestinal infections. The treatment of the latter has recently been rendered difficult or even unsuccessful due to an increasing number of extended-spectrum beta-lactamases-producing isolates. Industrialized animal-food production systems and subsequently food of animal origin

¹ Doc. dr. Jerneja Ambrožič - Avguštin, univ. dipl. biol., Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, 1000 Ljubljana; jerneja.ambrozic@bf.uni-lj.si

² Doc. dr. Irena Zdovc, dr. vet. med., Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva ulica 60, 1000 Ljubljana

³ Mag. Izток Štrumbelj, dr. med., Zavod za zdravstveno varstvo Murska Sobota, Ulica arhitekta Novaka 2b, 9000 Murska Sobota

are a potential source of antimicrobial-resistant and virulent strains. The aim of our study was to compare genotypes of *E. coli* strains, isolated from infected humans and animals, and those from healthy animals at slaughter. The results corroborated recent findings, showing that a high percentage of animal food isolates carried genes for enzymes of the CTX-M group. Additionally, these isolates encoded several virulence factor genes and belonged to the same phylogenetic group as human extraintestinal pathogenic *E. coli*. This supports the presumption that food of animal origin can be the source of antimicrobial-resistant and pathogenic strains. This is why a detailed analysis of the isolate genotypes from healthy and diseased animals and humans as well as from food of animal origin is necessary and should be performed as soon as possible.

IZHODIŠČA

Bakterija *Escherichia coli* je del črevesne mikrobne flore človeka in toplotrvnih živali. Že iz razlik v velikosti njenega genoma, ki se lahko med sevi razlikuje tudi za milijon baznih parov, lahko sklepamo, da se sevi razlikujejo med seboj po morfoloških, fizioloških in metabolnih lastnostih, kar lahko vpliva tudi na stopnjo njihove patogenosti za človeka (1). Razlikujemo med nepatogenimi komenzalnimi sevi in sevi, ki lahko zaradi prisotnosti genskih zapisov za dejavnike virulence povzročijo pri človeku in toplotrvnih živalih različne črevesne in zunajčrevesne okužbe. Na podlagi dejavnikov virulence, mehanizmov patogenosti, kliničnih znakov in seroloških lastnosti lahko seve, ki povzročajo črevesne okužbe (angl. *intestinal pathogenic Escherichia coli*, IPEC), nadalje razvrstimo v enterotoksigene, enteropatogene, enteroagregativne, enteroinvazivne in enterohemoragične ali vero/Šiga toksin izdelujoče *E. coli*. Med zoonoze, povzročene z *E. coli*, za zdaj uvrščamo le okužbe s sevi enterohemoragične *E. coli*, s katerimi se ljudje okužijo z nezadostno termično obdelanimi mesnimi, predvsem govejimi, izdelki (2). Ostale skupine črevesnih sevov povzročajo v razvitih državah manj resne okužbe z redkimi zapleti, ki se jih redko zdravi s protimikrobnimi učinkovinami (v nadaljnjem besedilu za te učinkovine uporabljamo besedo antibiotik). Morda je bilo zato do nedavnega malo pozornosti posvečene drugim skupinam sevov, ki jih človek predvsem s hrano, pa tudi z neposrednim stikom iz okolja, pridobi od živali in obratno. Verjetno je pomanjkanje pozornosti tudi posledica miš-

ljenja, da sevi, ki jih na tak način vnesemo v telo, niso virulentni (razen enterohemoragičnih) in da tam ostanejo le prehodno. Ob tem pogosto pozabljamo, da so za horizontalne prenose genov (za virulenco in odpornost proti antibiotikom) dovolj že kratkotrajni stiki med vnesenimi bakterijami in stalno mikrobno floro. Hkrati pa lahko genetska rekombinacija med sevi vodi tudi v nastanek novih patogenih sevov, kot npr. sev O104:H4 (3). Zunajčrevesni patogeni sevi *E. coli* (angl. *extraintestinal pathogenic Escherichia coli*, ExPEC) z različnim naborom dejavnikov virulence najpogosteje povzročijo okužbe sečil, sepse nejasnega izvora, trebušne abscese, peritonitis, bolnišnične okužbe dihal in meningitis pri novorojenčkih (4, 5).

V številnih študijah, ki so bile objavljene v zadnjih dveh desetletjih, so raziskovalci ugotavljali povezavo med prisotnostjo genskega zapisa za določen dejavnik virulence z zmožnostjo seva, da je komezal ali pa da povzroči bolezen pri ljudeh in/ali živalih oziroma okužbo določenega tkiva ali organa. Najpogosteje se preučuje prisotnost oziroma odsotnost genskega zapisa za adhezine oziroma fimbrije, ki omogočajo pritrditev bakterij (*fim*, *pap*, *sfa*, *afa/dra*, *bmaE*, *gaf*), za dejavnike, ki omogočajo izogibanje imunskemu sistemu (*kps*, *neu*, *cvaC*, *iss*, *tra*), pridobivanje železa (*iucD*, *iutA*, *iroN*, *fyuA*), izločanje toksinov in avtotransporterjev (*cnf*, *cdtB*, *hlyA*, *sat*, *vat*) ter nekaterih drugih genskih zapisov, kot npr. *usp* (angl. *uropathogenic specific protein*) in markerskih genov za prisotnost t. i. otokov patogenosti (6-10).

Genotipizaciji na podlagi genskih zapisov za dejavnike virulence se je leta 2000 pridru-

žila še metoda razvrščanja sevov v t. i. filogenetske skupine po Clermoutu. Na podlagi kombinacije prisotnosti oziroma odsotnosti genov *chuA* in *yjaA* ter fragmenta DNA Tsp-E4.C2 lahko seve vrste *E. coli* delimo v štiri glavne filogenetske skupine, ki jih označujemo z A, B1, B2 in D (11). Po uveljavitvi te metode so sledile številne objave, v katerih so raziskovalci ugotavljali povezanost med uvrstitvijo seva v filogenetsko skupino, prisotnostjo genskih zapisov za dejavnike virulence in odpornosti proti antibiotikom ter patogenostjo za človeka in živali (6–10, 12–17). Ugotovili so, da se človeški komenzalni sevi praviloma uvrščajo v filogenetski skupini A in B1, virulentni sevi, to so tisti, ki so bili pogosteje prepoznani kot povzročitelji okužb, pa predvsem v skupino B2 in manjkrat v skupino D. Sevi iz skupin A in B1 imajo praviloma manj genskih zapisov za dejavnike virulence kot sevi iz skupin B2 in D. Povezava med virulenco in odpornostjo proti antibiotikom pa je bila ravno obratna: sevi iz skupin B2 in D so bili praviloma manj odporni proti antibiotikom kot sevi iz skupin A in B1. V humani medicini se je to stanje spremenilo po letu 2006, ko so se začele pandemsko širiti nekatere klonalne skupine, kot npr. sevi iz sekvenčne skupine 131 (ST131) (18). Ti sevi so pogosto večkratno odporni, med drugim izločajo betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja (angl. *extended-spectrum beta-lactamases*, ESBL) iz skupine CTX-M, imajo številne zapise za dejavnike virulence in se uvrščajo v filogenetsko skupino B2 in le izjemoma v D (19, 20). Nastal je nov zaskrbljujoč položaj, ko so postali virulentni sevi odporni proti številnim antibiotikom. Temu je sledilo spoznanje, da so postali sevi, ki jih izoliramo iz živali in živil živalskega porekla, zaradi množične uporabe antibiotikov v živinoreji, odporni proti antibiotikom, ki so pomembni za zdravljenje okužb pri človeku (21). Izhodiščni tezi nadaljnjih raziskav sta bili: sevi, izolirani iz živali ali živil živalskega izvora, lahko povzročijo pri ljudeh zunajčrevesne okužbe (npr. okužbe sečil), ki jih običajno zdravimo z antibiotiki, in sevi, s katerimi se okužimo od rejnih živali preko prehranske verige, z neposrednim stikom z živaljo ali preko okolja, kolonizirajo prebavila človeka. Ti sevi lahko neposredno, kot povzročitelji zunajčrevesnih okužb, ali posredno, zaradi

horizontalnega prenosa svojih genskih zapisov za odpornost na druge povzročitelje okužb zmanjšajo učinkovitost zdravljenja okužb z antibiotiki. Slednjo tezo morda potrjuje hitro širjenje sevov, ki izločajo ESBL, zlasti pri doma pridobljenih okužbah (18). Iz številnih podatkov je namreč razvidno, da v svetu in v Sloveniji narašča delež sevov *E. coli*, ki so odporni proti cefalosporinom 3. in 4. generacije (19, 20, 22).

V raziskovalnem delu tega prispevka smo primerjali izolate *E. coli* z ESBL, ki so bili v zadnjem desetletju izolirani iz človeških in živalskih kužnin in iz zdravih živali ob zakolu. Izolate smo primerjali na podlagi uvrstitve v filogenetsko skupino in glede na prisotnost genskih zapisov za izbrane dejavnike patogenosti. Na podlagi rezultatov smo skušali oceniti, ali gre za genotipsko bolj ali manj podobne seve, ter primerjati naše ugotovitve z ugotovitvami iz strokovne in znanstvene literature.

METODE

V raziskavo smo vključili 133 človeških izolatov *E. coli*, ki izločajo ESBL in so bili izolirani pri bolnikih z zunajčrevesnimi okužbami. Od tega je bilo 113 (85 %) izolatov povezanih z okužbami sečil, ostalih 20 (15 %) pa z okužbami dihalnih poti in sepsa. Sedeminpetdeset izolatov je bilo izoliranih med letoma 2000 in 2006 na Inštitutu za varovanje zdravja Republike Slovenije v Ljubljani, 25 izolatov v laboratoriju Bolnišnice Golnik, od tega 10 med letoma 2006 in 2007 in 15 v letih 2008 in 2009, 51 izolatov pa je bilo izoliranih v laboratoriju Zavoda za zdravstveno varstvo Murska Sobota, od tega 22 v letih 2006 in 2007 in 29 v letu 2010. V raziskavo smo vključili tudi pet živalskih kliničnih izolatov (iz okužb pri dveh psih, dveh morskih prašičkih in mačku), ki so bili izolirani v obdobju med 2008 in 2010, ter 72 izolatov, pridobljenih v klavnica h iz vzorcev mesa (piščanci) v obdobju med oktobrom 2011 in majem 2012.

Bakterije *E. coli* smo iz kužnin izolirali na neselektivnih gojiščih, predvsem na krvnem agarju oz. na drugih, selektivnih gojiščih, odvisno od vrste kužnine. Vzorce mesa smo pregledali z usmerjeno bakteriološko preiskavo na selektivnih gojiščih z dodatkom antibiotikov

(chromID ESBL, bioMérieux), ki dopuščajo samo rast odpornih sevov.

Pri vseh izolatih *E. coli* smo prisotnost ESBL določili fenotipsko na osnovi testiranja občutljivosti za indikatorske antibiotike. Testiranje smo opravili z disk difuzijsko metodo (DD) in mikrodilucijsko metodo za ugotavljanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) antibiotika, v skladu s priporočili *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (23).

Za genotipizacijo smo z verižno reakcijo s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) namnožili izbrane genske zapise, kot vzorčno DNA pa smo v vseh primerih uporabili genomsko DNA iz bakterijskih lizatov, ki smo jih pripravili po predhodno opisanem postopku (24). Za potrditev prisotnosti in določitev vrste ESBL smo uporabili začetne oligonukleotide, ki so specifični za gene iz skupine encimov TEM, SHV in CTX-M. Med slednjimi smo razlikovali tudi podskupine CTX-M-1, -M-2, -M-8, -M-9 in -M-25 (25, 26). Za uvrstitev sevov v filogenetske skupine smo uporabili postopek, ki ga je opisal Clermont s sodelavci, za pomnoževanje genskih zapisov za dejavnike virulence *fimH*, *iha*, *kpsMTII*, *issfyuA*, *iutA*, *fluA*, *usp*, *ompT*, *vat* in *sat* pa postopke, ki so opisani drugod (11, 27).

REZULTATI

Zaradi preglednosti smo dobljene rezultate predstavili po skupinah. Humane ExPEC-izolate iz obdobja 2000–2007 smo združili v skupino I, humane ExPEC-izolate iz obdobja 2008–2010 v skupino II, klinične veterinarske izolate v skupino III, izolate živali iz klavnic pa v skupino IV. Med 89 izolati iz skupine I smo ugotovili prisotnost genskega zapisa za encime CTX-M pri 49 (55%) izolatih, in sicer v 43 (48%) primerih za podskupino CTX-M-1 in 6 (7%) primerih za podskupino CTX-M-9. Pri ostalih 40 (45%) izolatih so bili prisotni encimi iz skupin TEM in SHV. Štirinajst (15,7%) izolatov smo uvrstili v filogenetsko skupino A1, 7 (7,9%) v skupino B1, 16 (18%) v skupino B2 in 52 (58,4%) v skupino D. Med 32 izbranimi izolati smo pri vseh (100%) pomnožili gen za fimbrijski adhezín (*fimH*), pri 16 (50%) gen za nefimbrijski adhezín (*iha*), pri 25 (78%) gen za tvorbo kapsule (*kpsMTII*) in pri 2 (7,8%) gen, katerega produkt posre-

duje povečano odpornost proti serumu (*iss*). Gena *iha* in *kpsMTII* smo zasledili izključno pri izolatih iz filogenetskih skupin B2 in D, gen *iss* pa pri izolatu iz skupine A in B1.

Pri ExPEC-izolatih iz skupine II smo pri 41 (93%) ugotovili prisotnost genov za encime CTX-M, od tega pri 37 (84%) za encime iz skupine CTX-M-1, pri 2 (4,6%) iz skupine CTX-M-9 ter pri po enem izolatu (2,2%) gen za encim iz skupin CTX-M-8 in CTX-M-2. Genski zapis *fimH* smo ugotovili pri 43 (98%), *iha* pri 36 (82%) in *kpsMTII* pri 35 (80%) izolatih, ki so bili vedno iz skupin B2 ali D. Tudi gen *iha* je bil, razen pri enem izolatu iz skupine A, vedno povezan z izolati iz skupine B2 ali D.

Pri kliničnih veterinarskih izolatih iz skupine III smo pri treh izolatih ugotovili prisotnost encimov iz podskupine CTX-M-1. Dva smo uvrstili v filogenetsko skupino B1, enega pa v skupino A. Pri enem izolatu iz skupine D smo ugotovili prisotnost encima iz skupine CTX-M-9. Pri sevu iz filogenetske skupine B1, ki je bil izoliran iz vnetja fascije pri mačku, smo ugotovili prisotnost genov za encime iz skupine CTX-M-2.

Med izolati iz skupine IV smo pri 55 (76,3%) ugotovili zapis za encime skupine CTX-M-1, pri enem (1,3%) za skupino CTX-M-2 in pri 16 (22,2%) za encime iz skupine SHV (SHV-12 in SHV-2a). Enaindvajset (29%) izolatov smo uvrstili v filogenetsko skupino A, 23 (31%) v skupino B1 in 29 (40%) v filogenetsko skupino D. Pri izbranih 29 izolatih smo poleg genov *fimH*, *iha*, *kpsMTII* preverjali še prisotnost genov *fyuA*, *iutA*, *fluA*, *usp*, *ompT*, *vat* in *sat*. Ugotovili smo, da ima 25 (86%) izolatov gen *fimH*, 4 (13,7%) izolati gen *iha*, 6 (20%) izolatov gen *kpsMTII*, 10 (34%) izolatov gen *vat*, 9 (31%) izolatov gen *fluA* in 3 (10%) izolati gen *usp*. Slednja gena sta značilna za slovenske izolate klonalne linije ST131. Med *iha* pozitivnimi izolati smo dva uvrstili v filogenetsko skupino A in dva v skupino B1. Gen *kpsMTII* pa smo tudi v tej skupini potrdili le pri izolatih iz filogenetske skupine D.

RAZPRAVA IN ZAKLJUČKI

Povečanje števila izolatov *E. coli*, ki izločajo encime ESBL, zlasti iz skupine CTX-M, postaja vse bolj pereč zdravstveni problem. Hkrati pa se zastavlja vprašanje, od kod izvirajo ti

sevi v domačem okolju. Med možnimi viri se čedalje pogosteje omenja hrana živalskega izvora oziroma okolje, ki je kontaminirano z živalskimi iztrebki iz obratov intenzivne reje (gnojena zemlja).

V naši raziskavi smo na podlagi prisotnosti genov za ESBL, izbranih genskih zapisov za dejavnike virulence in uvrstitvijo v filogenetsko skupino analizirali humane izolote ExPEC (2000–2007; 2008–2010), klinične živalske izolote (2008–2010) ter izolote iz perutninskega mesa (2011–2012). Iz preliminarnih (in nekaterih še neobjavljenih) rezultatov lahko sklepamo, da so ESBL-pozitivni sevi, izolirani iz bolnih domačih živali in mesa zdravih zaklanih živali, ki je namenjeno za prehrano ljudi, genetsko raznoliki. Čeprav se ne uvrščajo v filogenetsko skupino B2, tako kakor večina izolatov klonalne linije ST131 in drugih virulentnih humanih ExPEC sevov po letu 2006, je zaskrbljujoč visok odstotek (40%) sevov iz filogenetske skupine D med izolati iz perutninskega mesa. Filogenetska skupina D je bila namreč prevladujoča med slovenskimi humanimi ESBL-ExPEC-izolati pred letom 2006 (28). Po letu 2006 se je genetska variabilnost med humanimi ESBL-ExPEC-izolati izrazito zmanjšala zaradi prevlade klonalne skupine ST131, za katero je značilna večkratna odpornost (tudi encimi iz skupine CTX-M-1 in CTX-M-9) in prisotnost številnih virulentnih genov, med drugimi *iha*, *kpsMTII*, *usp* in *fluA*. Pri izolatih iz zdrave perutnine smo ugotovili prisotnost genov *iha*, *kpsMTII*, *usp* in *fluA* ter v visokem odstotku tudi gen za avtotransporterski toksin Vat in gena *iutA* ter *fyuA*, ki sodelujeta pri privzemu železa (neobjavljeni podatki). Zaskrbljujoče je pojavljanje genov *iha*, *flu* in *usp* pri perutninskih izolatih iz filogenetskih skupin A in B1. Človeške izolote iz teh dveh skupin so namreč tradicionalno opredeljevali kot komezalne seve z majhnim številom genov za dejavnike virulence. Ugotavljamo, da izsledki naše preliminarne raziskave potrjujejo, da imajo sevi *E. coli* iz zdravih živali, ki so namenjene za prehrano ljudi, genske zapise za encime ESBL in dejavnike virulence, značilne za humane ExPEC-seve, in so torej lahko povzročitelji zunajčrevesnih okužb pri človeku. Sevi, ki npr. povzročajo okužbe sečil pri ženskah, običajno izvirajo iz črevesne mikrobne flore in se

največkrat uvrščajo v filogenetski skupini B2 in D (29).

Ugotovitve bi lahko deloma pojasnile nesorazmeren porast števila sevov v domačem okolju, ki so odporni proti antibiotikom. Da bi lahko natančneje analizirali ta »mikroevolucijska« dogajanja v zadnjih nekaj letih, bi morali nujno analizirati več izolatov iz zdravih in bolnih živali in ljudi. Iz držav, ki so takšne raziskave že opravile, poročajo o povečani prisotnosti *E. coli* z ESBL v iztrebkih zdravih živali na obratih z intenzivno rejo, zlasti pri piščancih in prašičih. V nekaterih študijah so že izsledili enake genotipe *E. coli* v živalskih iztrebkih, prebavnem traktu človeka, pri okužbah ljudi in živali ter v okolici obratov intenzivne reje (30, 31). V podobni raziskavi, kot je bila naša, le da je bila opravljena na večjem številu različnih vzorcev, je Jakobsenova s sodelavci pri izolatih iz piščančjega mesa, piščancev, svinjine in prašičev ugotovila prisotnost genov za sedem virulentnih dejavnikov, ki so povezani s človeškimi izolati ExPEC. Poudarja, da je posebno zaskrbljujoča prisotnost teh genov v izolatih iz filogenetske skupine B2 in D (32). Med sevi, ki so jih Bergeron in sodelavci izolirali iz prebavil piščancev pred zakolom, so prevladovali izolati iz filogenetskih skupin A in D, niso pa izolirali sevov iz skupine B2, kar se ujema z rezultati naše raziskave (33). V zadnjem času vzbujajo pozornost skupina invazivnih sevov in izolatov iz okužb sečnih poti, ki pripadajo klonalni skupini A. Izolati se uvrščajo v filogenetsko skupino D in MLST-klonalni kompleks 69 (angl. *clonal complex*, CC69) ter so odporni proti kombinaciji trimetoprima s sulfametoksazolom (34). Jakobsen in sodelavci so izolirali seve klonalne skupine A iz brojlerjev, piščančjega mesa, zdravih ljudi in ljudi z okužbami sečnih poti. Ko so preverjali njihovo virulenco na mišjem modelu, so ugotovili, da so vsi povzročili okužbe sečnih poti, nekateri izolati, tudi iz brojlerjev in piščančjega mesa, pa celo hudo vnetje ledvic (34). Avtorji predlagajo, da lahko okužbe v takšnem primeru uvrstimo med zoonoze (35). Opisani so bili tudi že primeri izolacije pandemskega seva *E. coli* O25:H4; ST131 iz piščančjega mesa v Kanadi in piščančjih proizvodnih obratih (36, 37). Poleg navedenih, izsledki številnih drugih objav opozarjajo na možnost vnosa odpornih in virulentnih sevov

iz zdravih živali v prebavila ljudi, kjer lahko zaradi sekundarnega prenosa v druge organe povzročijo težko ozdravljive okužbe (29, 35, 38–41).

Problematični niso samo hrana, ampak tudi druge možnosti prenosa sevov, ki izločajo ESBL, npr. v živalskih vrtovih ali s poljščinami, ki so zrasle na gnojenih njivah (42). V Franciji so primerjali genotipe *E. coli*, ki izločajo

ESBL iz prebavnega trakta živali in iz zemlje, ki je bila gnojena z njihovimi iztrebki. Ugotovili so, da so sevi genetsko sorodni in da lahko preživijo več kot eno leto na njivah (31).

V prispevku so bili uporabljeni tudi podatki, ki smo jih pridobili pri delu v okviru projektne naloge CRP V4-1080.

LITERATURA

1. Lukjancenko O, Wassenaar TM, Ussery DW. Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microb Ecol*. 2010; 60 (4): 708–20.
2. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2 (2): 123–40.
3. Bezuidt O, Pierneef R, Mncube K, et al. Mainstreams of horizontal gene exchange in enterobacteria: consideration of the outbreak of enterohemorrhagic *E. coli* O104:H4 in Germany in 2011. *PLoS One*. 2011; 6 (10): e25702.
4. Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis*. 2007; 4 (2): 134–63.
5. Köhler CD, Dobrindt U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *Int J Med Microbiol*. 2011; 301 (8): 642–7.
6. Bingen-Bidois M, Clermont O, Bonacorsi S, et al. Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. *Infect Immun*. 2002; 70 (6): 3216–26.
7. Rodriguez-Siek KE, Giddings CW, Doetkott C, et al. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*. 2005; 151 (Pt 6): 2097–110.
8. Houdouin V, Bonacorsi S, Bidet P, et al. Phylogenetic background and carriage of pathogenicity island-like domains in relation to antibiotic resistance profiles among *Escherichia coli* urosepsis isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 58 (4): 748–51.
9. Ishii S, Meyer KP, Sadowsky MJ. Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73 (18): 5703–10.
10. Martinez-Medina M, Mora A, Blanco M, et al. Similarity and divergence among adherent-invasive *Escherichia coli* and extraintestinal pathogenic *E. coli* strains. *J Clin Microbiol*. 2009; 47 (12): 3968–79.
11. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*. 2000; 66 (10): 4555–8.
12. Johnson JR, Stell AL, Delavari P, et al. Phylogenetic and pathotypic similarities between *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in dogs and extraintestinal infections in humans. *J Infect Dis*. 2001; 183 (6): 897–906.
13. Ewers C, Li G, Wilking H, et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int J Med Microbiol*. 2007; 297 (3): 163–76.
14. Piatti G, Mannini A, Balistreri M, et al. Virulence factors in urinary *Escherichia coli* strains: phylogenetic background and quinolone and fluoroquinolone resistance. *J Clin Microbiol*. 2008; 46 (2): 480–7.
15. Bukh AS, Schönheyder HC, Emmersen JM, et al. *Escherichia coli* phylogenetic groups are associated with site of infection and level of antibiotic resistance in community-acquired bacteraemia: a 10 year population-based study in Denmark. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 64 (1): 163–8.
16. Johnson JR, Kuskowski MA, Owens K, et al. Virulence genotypes and phylogenetic background of fluoroquinolone-resistant and susceptible *Escherichia coli* urine isolates from dogs with urinary tract infection. *Vet Microbiol*. 2009; 136 (1–2): 108–14.
17. Carlos C, Pires MM, Stoppe NC, et al. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiol*. 2010; 10: 161.
18. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*. 2008; 8 (3): 159–66.
19. Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother*. 2011; 66 (1): 1–14.
20. Peirano G, Pitout JD. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents*. 2010; 35 (4): 316–21.

21. Ambrožič Avguštin J. Animal production systems as a selective environment for antibiotic resistance genes. *Acta agriculturae Slovenica*. 2012; 100 (1): 7–17.
22. Štrumbelj I, Berce I, Čretnik - Žohar T, et al. Pregled občutljivosti bakterij za antibiotike – Slovenija 2011 [internet]. 1st ed. Ljubljana: Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ); 2012 [citirano 2012 Sep 4]. Dosegljivo na: <http://www.imi.si/strokovna-zdruzenja/skuopz/skuopz/files/bakterijska-obcutljivost-v-sloveniji-2011.pdf>
23. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 19th informational supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
24. Le Bouguenec C, Archambaud M, Labigne A. Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992; 30 (5): 1189–93.
25. Woodford N. 2010. Rapid characterization of beta-lactamases by multiplex PCR. *Methods Mol Biol*. 2010; 642: 181–92.
26. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65 (3): 490–5.
27. Šimenc A. Genotipizacija izbranih sevov *Escherichia coli* izoliranih v Bolnišnici Golnik [diplomsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2011.
28. Istinič I. Plazmidne determinante rezistence proti fluorokinolonom in betalaktamskim antibiotikom z razširjenim spektrom delovanja pri izbranih sevih bakterije *Escherichia coli* [diplomsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2008.
29. Jakobsen L, Spangholm DJ, Pedersen K, et al. Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and UTI patients. *Int J Food Microbiol*. 2010; 142 (1–2): 264–72.
30. Leverstein-van Hall MA, Dierixx CM, Cohen Stuart J, et al. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17 (6): 873–80.
31. Hartmann A, Locatelli A, Amoureux L, et al. Occurrence of CTX-M producing *Escherichia coli* in soils, cattle, and farm environment in France (Burgundy region). *Front Microbiol*. 2012; 3: 83.
32. Jakobsen L, Kurbasic A, Skjot-Rasmussen L, et al. *Escherichia coli* isolates from broiler chicken meat, broiler chickens, pork, and pigs share phylogroups and antimicrobial resistance with community-dwelling humans and patients with urinary tract infection. *Foodborne Pathog Dis*. 2010; 7 (5): 537–47.
33. Bergeron CR, Prussing C, Boerlin P, et al. Chicken as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18 (3): 415–21.
34. Jakobsen L, Hammerum AM, Frimodt-Møller N. Detection of clonal group A *Escherichia coli* isolates from broiler chickens, broiler chicken meat, community-dwelling humans, and urinary tract infection (UTI) patients and their virulence in a mouse UTI model. *Appl Environ Microbiol*. 2010; 76 (24): 8281–4.
35. Jakobsen L, Garneau P, Bruant G, et al. Is *Escherichia coli* urinary tract infection a zoonosis? Proof of direct link with production animals and meat. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31 (6): 1121–9.
36. Vincent C, Boerlin P, Daignault D, et al. Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16 (1): 88–95.
37. Cortés P, Blanc V, Mora A, et al. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Appl Environ Microbiol*. 2010; 76 (9): 2799–805.
38. Johnson TJ, Wannemuehler Y, Johnson SJ, et al. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74 (22): 7043–50.
39. Ewers C, Antão EM, Diehl I, et al. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Appl Environ Microbiol*. 2009; 75 (1): 184–92.
40. Bélanger L, Garenaux A, Harel J, et al. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011; 62 (1): 1–10.
41. Wu G, Ehrlich R, Mafura M, et al. *Escherichia coli* isolates from extraintestinal organs of livestock animals harbour diverse virulence genes and belong to multiple genetic lineages. *Vet Microbiol*. V tisku 2012.
42. Wang Y, He T, Han J, et al. Prevalence of ESBLs and PMQR genes in fecal *Escherichia coli* isolated from the non-human primates in six zoos in China. *Vet Microbiol*. 2012; 159 (1–2): 53–9.

Neda Hudopisk¹, Evgen Janet², Marjana Simetinger³, Marta Grgič - Vitek⁴, Edvard Potočnik⁵, Miša Korva⁶, Franc Strle⁷, Tatjana Avšič - Županc⁸

Izbruh klopnega meningoencefalitisa zaradi uživanja surovega kozjega mleka na koroški kmetiji

Tick-Borne Encephalitis after Drinking Raw Goat Milk – the First Outbreak Reported in Slovenia

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: virus klopnega meningoencefalitisa, kozje mleko, Slovenija

Klopni meningoencefalitis je v Sloveniji endemičen in vsako leto zabeležimo okoli 300 primerov bolezni. Poleg z vbodom okuženega klopa se lahko človek okuži tudi z uživanjem surovega mleka ali mlečnih izdelkov. V opisanem izbruhu so se z uživanjem kozjega kolostruma (mleziva) z virusom klopnega meningoencefalitisa okužile štiri osebe, od katerih so tri zbolele. Opisani primer dokazuje pomembnost obveščanja javnosti o nujni toplotni obdelavi surovega mleka in mlečnih izdelkov, kot protiutež vse večji usmerjenosti uživanja presne, biološko pridelane hrane.

ABSTRACT

KEY WORDS: tick-borne encephalitis virus, goat milk, Slovenia

Tick-borne encephalitis is endemic in Slovenia as around 300 cases are registered yearly. Beside tick bites, humans can occasionally be infected by ingestion of unpasteurized milk or milk products from infected livestock. We report the first transmission of the virus due to goat milk consumption where four persons got infected with tick-borne encephalitis virus; three who were unvaccinated fell ill while the vaccinated person remained healthy. The described outbreak demonstrates the importance of public awareness to reduce the risk of exposure by encouraging people to boil/pasteurize milk before consumption as a counterpoise to the increasing trend of using raw, biologically produced eatables.

¹ Neda Hudopisk, dr. med., Zavod za zdravstveno varstvo Ravne na Koroškem, Ob Suhi 5B, 2390 Ravne na Koroškem

² Mag. Evgen Janet, dr. med., Zavod za zdravstveno varstvo Ravne na Koroškem, Ob Suhi 5B, 2390 Ravne na Koroškem

³ Marjana Simetinger, dipl. san. inž., Zavod za zdravstveno varstvo Ravne na Koroškem, Ob Suhi 5B, 2390 Ravne na Koroškem

⁴ Dr. Marta Grgič - Vitek, dr. med., Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Trubarjeva ulica 2, 1000 Ljubljana

⁵ Edvard Potočnik, dr. vet. med., Veterinarska postaja Radlje ob Dravi, d. o. o., Koroška cesta 49, 2360 Radlje ob Dravi

⁶ Dr. Miša Korva, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana

⁷ Prof. dr. Franc Strle, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva ulica 2, 1525 Ljubljana

⁸ Prof. dr. Tatjana Avšič Županc, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; tatjana.avsic@mf.uni-lj.si

UVOD

Virus klopnega meningoencefalitisa (KMEV) je eden od pomembnih povzročiteljev vnetij osrednjega živčevja v Evropi in povzroča bolezen klopni meningoencefalitis (KME). Klopi, ki so glavni prenašalci povzročitelja okužbe, so hkrati tudi naravni rezervoar virusa. Zato je endemično območje KME tesno povezano z življenjskim prostorom in biologijo klopov. Največje število okužb je v mesecih od maja do septembra, ko so klopi najbolj aktivni in se tudi ljudje največ zadržujejo v naravi (1). Ne le človek, ampak tudi domače živali (koze, ovce, krave in prašiči) se lahko okužijo s KMEV (2). Virusno breme je v okuženih domačih živalih nizko, zato le-te ne igrajo vloge naravnega gostitelja. Kljub temu pa okužena žival izloča virus v mleku. Tako se lahko posredno, z zaužitjem nepasterizirane mлека ali mlečnih izdelkov, okužijo ljudje (3). V literaturi je opisanih več epidemij KME, ki so posledica zaužitja surovega mлека ali nepasteriziranih mlečnih izdelkov (4–7). Kljub temu da je v Sloveniji visoka pojavnost KME, je precepljene manj kot 15 % populacije (8). Prav zato je poročanje o možnosti okužbe s KMEV z neobdelanim mlekem in mlečnimi izdelki zelo pomembno, saj so pre-

sni, surovi izdelki vse pogosteje sinonim za zdravo življenje.

OPIS IZBRUHA

V izbruh KMEV na koroški kmetiji so bile vpletene štiri osebe, ki so pred nastopom kliničnih znakov pile surovo kozje mleko (kolostrum). Tri od štirih oseb so dva dni po zaužitju večje količine surovega kozjega mлека razvile klinične znake akutne vročinske bolezni.

Bolnik 1, moški, star 31 let, s presajeno ledvico, je zaradi visoke vročine (38 °C), mrzlice, glavobola in hudih bolečin v mišicah poiskal nujno medicinsko pomoč v lokalni bolnišnici. Ob pregledu so v krvni sliki ugotovili blažjo levkopenijo in rahlo povišane vrednosti jetrnih testov. Čez 14 dni so se pojavili klinični znaki meningealne faze bolezni: visoka vročina, glavobol, bruhanje, občutljivost na svetlobo, moten vid, tresavica in težave s koncentracijo. Bolnik je zavrnil zdravljenje v bolnišnici in lumbalno punkcijo, zato je bil obravnavan le ambulantno (tabela 1).

Bolnica 2, stara 59 let, je isti dan kot bolnik 1 poiskala nujno medicinsko pomoč zaradi vročine (38,6 °C), mrzlice, bolečin v mišicah in driske, vendar je bila krvna slika v mejah normale, z izjemo blažje levkopenije. Tudi pri njej so se čez 14 dni pojavili klinični znaki

Tabela 1. Klinične in laboratorijske značilnosti bolnikov, vpletenih v izbruh prenosa virusa klopnega meningoencefalitisa s kozjim mlekem. ELISA – encimski imunski test (angl. enzyme-linked immunosorbent assay), KME – klopni meningoencefalitis, KMEV – virus klopnega meningoencefalitisa, NEG – negativno, NT – nevtralizacijski test, POZ – pozitivno, NTT – ni testirano, RT-PCR – obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo (angl. reverse transcriptase-polymerase chain reaction).

Bolnik	Razvoj kliničnih znakov	Zdravniška oskrba	Testirani vzorci (datum)	Mikrobiološka potrditev			Cepljenje	
				KMEV ELISA	KMEV NT	KMEV RT-PCR		
				IgM	IgG			
1	dvofazni potek bolezni	ambulantno zdravljenje	8. maj	POZ	POZ	POZ	NEG	NE
2	dvofazni potek bolezni	bolnišnično zdravljenje	8. maj	POZ	POZ	POZ	NEG	NE
3	samo prva faza bolezni	brez zdravniške oskrbe	15. maj 6. junij	POZ POZ	POZ POZ	POZ POZ	NEG NTT	NE
4	ni zbolel		15. maj 6. junij	NEG NEG	POZ POZ	POZ POZ	NEG NTT	DA

meningealne faze bolezni, zaradi česar je bila sprejeta v bolnišnico. Biokemijski testi so v likvorju pokazali spremembe, ki so značilne za aseptični meningitis (tabela 1). Bolnik 3, star 32 let, je zbolel istočasno z enako klinično sliko, vendar zaradi tega ni poiskal medicinske pomoči, prav tako tudi pozneje ni razvil meningealne faze bolezni (tabela 1).

Okužbo s KMEV je mogoče natančno potrditi le z mikrobiološkimi metodami, saj so klinični znaki bolezni pogosto neznačilni in nezadostni za postavitev diagnoze. Prav zaradi blage prve faze bolezni in odsotnosti etiološkega vzroka (vbod klopa) smo sum na okužbo s KMEV postavili šele ob pojavu meningealnih znakov pri bolnikih 1 in 2. Z encimskim imunskim testom (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) smo dokazali specifična protitelesa razreda IgM in IgG v serumu obeh bolnikov. Tudi pri bolniku 3, ki ni razvil meningitisa, smo dokazali specifična protitelesa proti KMEV v serumu. Zaradi prisotnosti specifičnih protiteles virusne RNA v serumu nismo več zaznali (tabela 1).

Bolnik 4, ki je prav tako pil surovo kozje mleko, ni zbolel, saj je bil cepljen proti KMEV. Osnovno shemo cepljenja je bolnik zaključil leta 1995, nato je dobil poživitvene odmerke še leta 2000, 2005 in 2010. Z mikrobiološkim testiranjem smo pri bolniku 4 dokazali v prvem vzorcu, odvzetem 27 dni po zaužitju mleka, visoko koncentracijo specifičnih protiteles razreda IgG proti KMEV (912 U/ml) in odsotnost specifičnih protiteles razreda IgM. Tudi v drugem vzorcu, odvzetem tri tedne kasneje, smo dokazali specifična protitelesa razreda IgG (672 U/ml). Glede na visoko avidnost dokazanih protiteles proti KMEV (85%) lahko sklepamo, da je tudi pri bolniku 4 prišlo do poživitvenega odgovora zaradi pitja okuženega surovega mleka.

Z epidemiološko raziskavo smo odkrili, da bolnika 2 in 3 redno uživata surovo kozje mleko, ki naj bi po njunem mnenju pozitivno vplivalo na zdravje. Da bi potrdili izvor okužbe, smo pregledali vzorce (serum, kri in mleko) živali, ki jih ima bolnik 3 na svoji kmetiji. Z metodo posredne imunofluorescence (angl. *indirect immunofluorescence assay*, IFA) smo dokazali specifična protitelesa proti KMEV v petih od devetih pregledanih vzorcev kozjih serumov (titer od 1:20 do 1:1280) in v enem od

štirih pregledanih vzorcev kozjega mleka (1/4). Vsi vzorci ovac so bili negativni (9/9). Z metodo obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (angl. *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, RT-PCR) v realnem času smo pregledali vzorce serumov in krvi devetih koz in devetih ovac ter štiri vzorce kozjega mleka. Virusno RNA smo dokazali samo v serumu ($1,50 \times 10^3$ kopij RNA/ml) in mleku ($1,88 \times 10^5$ kopij RNA/ml) koze, katere mleko so pili zboleli, in s tem potrdili alimentarni prenos KMEV.

ZAKLJUČEK

Ljudje se najpogosteje okužijo s KMEV z vbodom okuženega klopa, ki ga približno tretjina ljudi ne zazna (9). Pri kar dveh tretjinah ljudi poteka okužba brez kliničnih znakov. Pri večini bolnikov, ki kažejo prizadetost osrednjega živčevja, pa je potek bolezni dvofazen (10). Toda okužba s KMEV je možna tudi z uživanjem nepasteriziranega mleka ali mlečnih izdelkov, pridobljenih iz surovega mleka.

V opisanem primeru izbruha KME po pitju nepasteriziranega kozjega mleka so zbolele tri osebe, pri čemer sta dve osebi potrebovali zdravniško pomoč. Kljub temu da je bil bolnik 1 imunsko oslabiljen, je potekala bolezen pri vseh treh sorazmerno blago, brez dolgotrajnega okrevanja. Pri bolniku 3 se je okužba s KMEV razvila v zelo redki, abortivni obliki, ki smo jo v Sloveniji ugotovili pri manj kot 2% bolnikov (10). Po vbodu okuženega klopa sledi inkubacijska doba bolezni, ki lahko traja 4–28 dni, najpogosteje osem dni (3). V nasprotju s tem je lahko inkubacijska doba pri alimentarni okužbi krajša, v našem primeru le dva dni. Naši izsledki nakazujejo, da je hitrost okužbe večja po pitju surovega mleka (kolostruma) kot v primeru uživanja okuženih mlečnih izdelkov. To je pomembno tudi s stališča, da zelo kratka inkubacijska doba ne sme biti izključitveni kriterij pri sumu na okužbo s KMEV, predvsem pri možnih alimentarnih prenosih virusa. Kljub temu da opisan izbruh pri bolnikih ni pustil hujših zdravstvenih posledic, pa bi se mu lahko izognili, če bi pred uporabo ustrezno toplotno obdelali surovo mleko. Vsekakor bi se izbruhu lahko izognili tudi, če bi bili udeleženi cepljeni proti KMEV. Kljub temu da so štiri osebe

pile okuženo mleko, so zbolele le tri osebe, ki niso bile cepljene. Z vse večjim oglaševanjem »biološko« in »naravno« pridelanih izdelkov ter vse bolj »naravnim« življenjskim stilom se pri ljudeh povečuje tudi povpraševanje po pre-

snih mlečnih izdelkih in mleku, misleč, da je to bolj zdravo. Prav zato je obveščanje javnosti o možnosti prenosa KMEV preko mlečnih izdelkov in mleka zelo pomembno, pa čeprav gre za zelo redek prenos okužbe.

LITERATURA

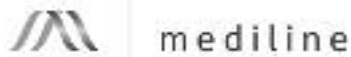
1. Durmisi E, Knap N, Saksida A, et al. Prevalence and molecular characterization of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovenia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011; 11 (6): 659–64.
2. Mansfield KL, Johnson N, Phipps LP, et al. Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis. *J Gen Virol.* 2009; 90 (Pt 8): 1781–94.
3. Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet.* 2008; 371 (9627): 1861–71.
4. Süß J. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine.* 2003; 21 Suppl 1: S19–35.
5. Kríz B, Benes C, Daniel M. Alimentary transmission of tick-borne encephalitis in the Czech Republic (1997–2008). *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2009; 58 (2): 98–103.
6. Holzmann H, Aberle SW, Stiasny K, et al. Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15 (10): 1671–3.
7. Balogh Z, Ferenczi E, Szeles K, et al. Tick-borne encephalitis outbreak in Hungary due to consumption of raw goat milk. *J Virol Methods.* 2010; 163 (2): 481–5.
8. Grgic - Vitek M, Klavs I. Low coverage and predictors of vaccination uptake against tick-borne encephalitis in Slovenia. *Eur J Public Health.* 2012; 22 (2): 182–6.
9. Kaiser R. The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994–98: a prospective study of 656 patients. *Brain.* 1999; 122 (Pt 11): 2067–78.
10. Lotric - Furlan S, Avsic - Zupanc T, Strle F. An abortive form of tick-borne encephalitis (TBE) – a rare clinical manifestation of infection with TBE virus. *Wien Klin Wochenschr.* 2002; 114 (13–14): 627–9.

SIEMENS

BIOMEDIS M.B. COM
BIOMEDICA
GRUPPE 



Johnson+Johnson



mikro+polo
vse za laboratorij...



A black and white photograph of a young child, seen from behind, reaching up with their right hand to touch a horizontal line on a height chart on a wall. The child is wearing a white long-sleeved shirt, a dark vest, and denim pants. The background is a plain, light-colored wall. In the top left corner, there is a white rectangular box containing the word 'SIEMENS' in bold, black, sans-serif capital letters. Below this box is a thin white horizontal line. The bottom of the image features a dark grey horizontal band containing text.

SIEMENS

Who can help me grow?

Only Siemens has the innovative solutions your lab needs to reach the top and the vision to keep you there.

www.siemens.com/diagnostics

Planning for your future starts with choosing the right diagnostics partner today. Siemens provides comprehensive and customizable solutions so laboratorians and clinicians can improve productivity

every day. And, with a 130-year tradition of innovation, you can trust Siemens to stay on the leading edge of emerging trends and technologies, so together we can set a new standard in patient care for years to come.

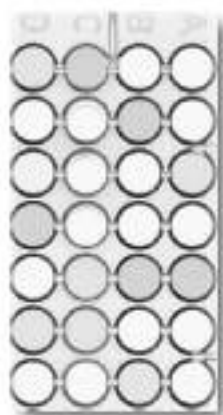
Answers for life.

Kvalitetni serološki testi za širok nabor patogenov

MIKROGEN
D I A G N O S T I K

Presejalni testi (ELISA):

- recomWell *Borrelia* (IgG, IgM)
- recomWell, alphaWell *Toxoplasma gondii* (IgM, IgG, IgG-Avidity)
- alphaWell *Brucella* (IgG, IgM)
- alphaWell *Leishmania infantum* (IgG)
- alphaWell *Taenia solium* (IgG)
- alphaWell *Toxocara canis* (IgG)
- alphaWell *Trichinella* (IgG)
- alphaWell *Ascaris lumbricoides* (IgG)
- alphaWell *Dengue* (IgG, IgM)
- alphaWell *Echinococcus* (IgG)
- recomWell *Campylobacter* (IgG, IgA)
- recomWell *Helicobacter* (IgG, IgM)
- recomWell *Yersinia* (IgG, IgM, IgA)
- alphaWell *Chagas* (IgG)



Potrditveni testi (recomLine):

- recomLine *Borrelia* (IgG, IgM)
- recomLine *Toxoplasma* (IgG, IgM (IgA), IgG-Avidity)
- recomLine *Hantavirus* (IgG, IgM)
- recomLine *Campylobacter* (IgG, IgA)
- recomLine *Helicobacter* (IgG, IgM)
- recomLine *Yersinia* 2.0 (IgA (IgM), IgG)



ALL DIAG je podjetje, specializirano v razvoj hitrih in enostavnih imunokromatografskih diagnostičnih testov za humano in veterinarsko biologijo.

Advanced Technology:
Flexible Solutions.

BIOMEDIS M.B. COM
BIOMEDICA
GRUPPE
www.biomedica.com

KEMOMED

*Prinašamo
rešitve*

*Zvami že
15 let*



*Iščete rešitve na področju znanosti o življenju?
Potrebujete ustrezna orodja za analitiko?*

Mi vam jih ponujamo!

- Reagenti za diagnostiko in biomedicino
- Instrumenti in tehnična podpora
- Potrošni material
- Aplikativna pomoč
- Pipetni program in akreditirane kalibracije
- Plastika

ZAŠČITITE SEBE IN VAŠE PACIENTE PRED INFEKCIJAMI

ASP[®]
GLOSAIR™ 400

Glosair-aparat za dezinfekcijo zraka je primeren za male in velike prostore in omogoča pravo mero varnosti in zanesljivosti.

Dokazana je znatno večja učinkovitost pri preprečevanju bolnišničnih okužb v primerjavi s konvencionalnimi metodami dekontaminacije prostorov.

• VARNO

Nizka koncentracija vodikovega peroksida omogoča varno dekontaminacijo prostorov tako za paciente, osebje kot tudi za opremo

• UČINKOVITO

Mešanica vodikovega peroksida je učinkovita zoper večine patogenih mikroorganizmov kot so MRSA, Clostridium difficile in VRE.

• ENOSTAVNO

Vsi parametri celotnega ciklusa se lahko različno nastavijo, shranijo in izpišejo s pomočjo printerja. Celoten cikel je voden preko daljinskega upravljalca.

Najboljša zaščita v preprečevanju širjenja različnih infekcij tako za vas kot tudi za vaše paciente

Za več informacij nas lahko pokličete na telefon 041 389 700 ali obiščete našo spletno stran www.aspjj.com/glosair

Johnson & Johnson

Johnson & Johnson d.o.o.
Smartinska c. 53, 1000 Ljubljana
Tel: 00 386 41 389 700, fax: 00386 1 401 1801



REMAS

POSREDOVANJE IN ZASTOPSTVO

S STROKOVNO POMOČJO IN ZUNANJO KONTROLO VAM OMOGOČAMO BOLJŠE REZULTATE!



DEDICATED TO MICROBIOLOGY



NOVATEC
IMMUNDIAGNOSTICA GmbH

IMTEC



BIOREBA

Your Partner in Agro-Diagnostics

IDEXX

EUROIMMUN

Medizinische
Labordiagnostika
AG



DSB SÄUREBAU GMBH



Meridian
Bioscience, Inc.
Inspired Science. Trusted Solutions.™



MicroBiLogics®

BOUTY



PALL

Pall Corporation

virion\serion



Z vami že od leta 1992

Medias International d.o.o.
Leskoškova cesta 9D
SI-1000 Ljubljana
Telefon: 01 52 02 300
Fax: 01 52 02 495
info@medias-int.si
www.medias-int.si

BD BIOTEHNOLOGIJA

- Pretočni citometri
- Monoklonska protitelesa
- Celične kulture
- Falcon laboratorijskaplastika
- Molekularna diagnostika

BD MIKROBIOLOŠKI SISTEMI

- Bactec sistemi za hemokulture
- Sensi diski
- Gojišča (Difco, BBL) in reagenti
- Identifikacijski sistemi Crystal, Phoenix ID/AST
- MGIT za TBC sistem

BD VACUTAINER

- Sistemi za odvzem krvi
- Urinski sistemi

BD MEDICAL

- Diabetes - insulinke in igle za peresnike
- IV terapija
- Injekcijski sistemi
- Anestezija



Bimos – Interstuhl
Büromöbel,

Bio-Rad Medical
Diagnostics,

Biolin Scientific,

Bioquell,

Biotage,

Biotest,

Delta T,

Ditabis,

EKF Diagnostic,

Eppendorf,

Eurofins GeneScan,

Eurofins MWG
Operon,

Focus Diagnostics,

Hain Lifescience,

Heipha,

Hoefer,

IDEXX
Laboratories,

Liofilchem,

Mart Microbiology,

Medical Wire
(MWE),

Molecular Devices
(Genetix).

Qiagen,

R-Biopharm,

Rosco Diagnostica,

SalvisLab,

Sarstedt,

Sifin,

Tecan,

Thermo Fisher
Scientific (Revco),

Ultra Violet
Products (UVP)



mediline



- ***laboratorijska oprema***
- ***potrošni materiali***
- ***reagenti***

Mediline mešana trgovska družba, d.o.o.

Perovo 30 | p.p. 5 | SI-1241 Kamnik | Slovenija

T +386 (0)1 830 80 40 | F +386 (0)1 830 80 70 / 63

E info@mediline.si | I www.mediline.si

ZANESLJIVO,
HITRO
PREPROSTO....

....DO PRAVILNIH REZULTATOV!

VIDAS®

VODILNI SISTEM ZA RUTINSKO DETEKCIJO PATOGENIH BAKTERIJ V HRANI NA SVETU!

Salmonella, Listeria spp., Listeria monocytogenes, E. coli O157, Campylobacter in Staphylococcal enterotoxin.

ENA predobogatitev - ENO pipetiranje - EN strip, pripravljen za uporabo

rezultat **NASLEDNI DAN**

Inovativna, premium ponudba z "The phage recombinant protein" tehnologijo za naslednje parametre: *Salmonella, Listeria, E. coli O157*.

ELFA tehnologija

- zmanjšana možnost lažno pozitivnih rezultatov,
- zmožnost detekcije nizkih koncentracij kontaminacije,
- več kot 40 mednarodnih validacij.



Več informacij: MIKRO+POLO d.o.o. | T: 02 614 33 01 | E: biomedicina@mikro-polo.si



mikro+polo
vse za laboratorij...

Medicinski razgledi 2012

Letnik 51
Supplement 6
November 2012

4. Baničevi dnevi – Zoonoze

Zbornik prispevkov

Organizatorji

Sekcija za klinično mikrobiologijo in bolnišnične okužbe Slovenskega zdravniškega društva,
Zavod za zdravstveno varstvo Murska Sobota, Splošna bolnišnica Murska Sobota

Glavni urednik zbornika

prof. dr. Miroslav Petrovec, dr. med.

Organizacijski odbor

mag. Iztok Štrumbelj, predsednik, Zavod za zdravstveno varstvo Murska Sobota; prof. dr. Tatjana Avšič - Županc, prof. dr. Miroslav Petrovec, prof. dr. Katja Seme, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani; mag. Emil Pal, Splošna bolnišnica Murska Sobota; Zdenka Horvat Šardi, Zavod za zdravstveno varstvo Murska Sobota

Recenzenti

prof. dr. Tatjana Avšič - Županc, univ. dipl. biol., prof. dr. Miroslav Petrovec, dr. med., prof. dr. Katja Seme, dr. med.

Uredništvo

Saša Ilovar, Anja Kovač, Miha Oražem, Špela Tevžič

Glavni urednik

Črt Zavrnik

Odgovorna urednica

Saša Ilovar

Tehnični uredniki

Jan Jamšek, Anja Kovač, Sara Mugerli

Uredniški odbor

Petra Bavčar, Alenka Biteznik, Ana Dovč,
Jernej Drobež, Grega Kragelj, Sandra
Mlakar, Miha Oražem, Tomaž Rus, Špela
Tevžič, Bogdan Vidmar, Sonja Žarkovič,
Klemen Žiberna, Jan Žmuc, Danaja Žolger

Lektorji

Mateja Hočevar Gregorič, Aleša Majster

Lektor za angleški jezik

Lara Vidmar

Naslov uredništva

Medicinski razgledi
Korytkova ulica 2, 1000 Ljubljana
Tel., faks: (01) 52 42 356
<http://www.medrazgl.si>
E-pošta: info@medrazgl.si

POR: 02014-0050652588

To revijo indeksirajo in/ali abstrahirajo

Biological Abstracts
Biomedicina Slovenica
Bowker International
Chemical Abstract
Nutritional Abstracts

Prelom

SYNCOMP d. o. o.

Tisk

Tiskarna Pleško d. o. o., Rožna dolina
cesta IV / 32-34, 1000 Ljubljana

Fotografija na naslovnici

Miroslav Petrovec

Copyright © Medicinski razgledi 2012

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

