

# Virološke, kliničke i epidemiološke osobitosti adenovirusnih dišnih infekcija u djece u Zagrebu i okolici

---

**Tabain, Irena**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2011**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:846771>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-30**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





## Središnja medicinska knjižnica

**Tabain, Irena (2011) *Virološke, kliničke i epidemiološke osobitosti adenovirusnih dišnih infekcija u djece u Zagrebu i okolici [Virological, clinical and epidemiological features of adenovirus respiratory infections in children in Zagreb region]*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/1418>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Irena Tabain**

**Virološke, kliničke i epidemiološke  
osobitosti adenovirusnih dišnih infekcija  
u djece u Zagrebu i okolici**

**DISERTACIJA**



**ZAGREB, 2011.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Irena Tabain**

**Virološke, kliničke i epidemiološke  
osobitosti adenovirusnih dišnih infekcija  
u djece u Zagrebu i okolici**

**DISERTACIJA**

**ZAGREB, 2011.**

Ovaj rad je izrađen u Odjelu za virologiju i Odjelu za molekularnu dijagnostiku i BSL 3/4 Službe za mikrobiologiju, Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u Zagrebu.

Istraživanje je u potpunosti financirano iz sredstava projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske br. 005-0053443-3447 pod naslovom *Virusne infekcije dišnog sustava* voditeljice prof. dr. Gordane Mlinarić Galinović, dr. med., a koji je nastavak projekta broj 005-002 *Uzročnici bolesti koji se šire kapljičnim putem* iste voditeljice.

Voditelji rada: prof. dr. sc. Gordana Mlinarić Galinović

doc. dr. sc. Sunčanica Ljubin Sternak

## ZAHVALA

Najiskrenije zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Gordani Mlinarić Galinović i komenotrici doc. dr. sc. Sunčanici Ljubin Sternak na kontinuiranoj nesebičnoj pomoći, uloženom trudu, stručnim savjetima, razumijevanju i prijateljskoj pomoći.

Zahvaljujem prim. Jasni Čepin-Bogović iz Klinke za dječje bolesti, KBC-a Sestre milosrdnice, Zagreb na pomoći pri obradi podataka kliničkog dijela istraživanja kao i djelatnicima Odjela za medicinsku dokumentaciju Klinike za infektivne bolnice „dr. Fran Mihaljević“ na pomoći u prikupljanju kliničkih podataka: voditeljici Elviri Čeljuski-Tošev, dr. med. te referentima Mirjani Pokrovac, med. sestri i Mariju Krčeliću, tehn. za računarstvo.

Svim djelatnicima Službe za mikrobiologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo veliko hvala na pomoći tijekom izrade ovoga rada, a posebno Mireli Josipović lab. tehn., Renati Sim, dr. vet. med. i Nataši Bauk, dipl. ing. biol. u pripremi i izvođenju laboratorijskih metoda te Gordani Vojnović, dipl. ing. biol. na suradnji u tehničkoj izvedbi nove metode.

Posebno se zahvaljujem i doc. dr. sc. Vladimiru Trkulji na vrijednim savjetima tijekom pisanja ovog rada.

I na kraju, veliko hvala mojoj obitelji na strpljenju, razumijevanju i bezrezervnoj podršci.

# SADRŽAJ

SADRŽAJ .....	1
POPIS KRATICA .....	3
1. UVOD .....	5
1.1 Povijest .....	5
1.2 Klasifikacija adenovirusa .....	6
1.3 Građa i umnožavanje adenovirusa .....	8
1.4 Onkogeni potencijal adenovirusa .....	12
1.5 Patogeneza i imunost .....	14
1.6 Epidemiologija .....	15
1.7 Kliničke karakteristike .....	17
1.8 Mikrobiološka dijagnostika adenovirusa .....	22
1.9 Liječenje .....	30
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA .....	31
2.1 Ciljevi istraživanja .....	31
2.2 Hipoteza .....	32
3. MATERIJAL I METODE .....	33
3.1 Ispitanici i klinički materijal .....	33
3.2 Mikrobiološka dijagnostika infekcije adenovirusom .....	34
3.3 Kliničko-laboratorijske metode .....	42
3.4 Statistička analiza podataka .....	44
4. REZULTATI .....	45
4.1 Ispitanici i tipovi, odnosno vrste adenovirusa .....	45
4.2 Raspodjela prema dobi .....	46
4.3 Raspodjela prema spolu .....	52
4.4 Sezonske varijacije .....	55

4.5	Kliničke osobitosti.....	58
4.6	Laboratorijski nalazi.....	68
4.7	Testiranje hipoteza .....	79
5.	RASPRAVA .....	85
6.	ZAKLJUČCI .....	103
7.	KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU.....	105
8.	KRATKI SADRŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU.....	107
9.	POPIS LITERATURE .....	109
10.	ŽIVOTOPIS.....	118



## POPIS KRATICA

ARI	akutne infekcije dišnog sustava (eng. <i>Acute Respiratory Infections</i> )
CAR	coxsackie-adenovirus receptor
CPU	citopatični učinak
CRP	C-reaktivni protein
DFA	izravna imunofluorescencija (eng. <i>Direct Immunofluorescence Assay</i> )
DKS	diferencijalna krvna slika
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (eng. <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
EIA	imunoenzimske metode (eng. <i>Enzyme Immunoassay</i> )
EM	elektronski mikroskop
ET	eksudativni tonzilitis
HAART	visokoaktivna antiretrovirusna terapija (eng. <i>Highly Active Antiretroviral Treatment</i> )
HZJZ	Hrvatski zavod za javno zdravstvo
ICTV	eng. <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IDDS	infekcije donjeg dišnog sustava
IFA	neizravna imunofluorescencija (eng. <i>Indirect Immunofluorescence Assay</i> )
IGDS	infekcije gornjeg dišnog sustava
IHA	inhibicija hemaglutinacije
IL-1	interleukin-1
IL-6	interleukin-6
ITR	obrnuti ponavljajući slijed (eng. <i>Inverted Terminal Repeat</i> )
KBC	klinički bolnički centar
LA	lakteks aglutinacija
MABs	monoklonalna protutijela (eng. <i>Monoclonal Antibodies</i> )
MEM	Earlov minimalni osnovni medij (eng. <i>Minimum Essential Medium</i> )

MLTU	glavna jedinica za kasni prijepis (eng. <i>Major Late Transcription Unit</i> )
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (eng. messenger <i>Ribonucleic Acid</i> )
NFS	nazofaringealni sekret
NK	stanice urođene ubojice (eng. <i>Natural Killer Cell</i> )
NT	neutralizacijski test
Nt	neutralizirajuća protutijela
OMA	upala srednjeg uha (lat. <i>otitis media acuta</i> )
PCR	lančana reakcija polimeraze (eng. <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
pIIIa	protein IIIa
pV	protein V
pVI	protein VI
pVII	protein VII
pIX	protein IX
RK	respiratorni katar
RSV	respiratorni sincicijski virus
RVK	reakcija vezanja komplementa
SE	sedimentacija eritrocita
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizirajući faktor- $\alpha$
TT	tjelesna temperatura
VA-RNA	ribonukleinske kiseline povezane s virusom (eng. <i>Virus Associated-Ribonucleic Acid</i> )

# 1. UVOD

## 1.1 Povijest

Adenoviruse su prvi put izolirali 1953. godine Rowe i sur. (1). Oni su pokušali izolirati „virus obične prehlade“ iz 33 uzorka kirurški odstranjenog dječjeg adenoidnog tkiva. U stanicama koje su porasle iz odstranjenog tkiva uočili su citopatske promjene u obliku baloniranih stanica koje su kasnije tvorile grozdaste nakupine. Na osnovi toga su zaključili da su uočene citopatske promjene uzrokovane nepoznatim mikroorganizmom kojega su tada nazvali „uzročnik degeneracije adenoida“ (1). Gotovo istovremeno, Hilleman i Werner (2) izolirali su nepoznati virus iz sekreta gornjeg dijela dišnog sustava oboljelih vojnih ročnika sa simptomima nalik gripi (2). Uskoro se pokazalo da su novoizolirani uzročnici povezani te da odgovaraju virusu koji je i tijekom II svjetskog rata uzrokovao epidemije teških infekcija dišnog sustava u vojnika (3). Prema tkivu u kojem je virus prvi put izoliran, čitava je porodica (*Adenoviridae*) dobila ime 1956. godine (4).

Od tada je identificirano više od 50 tipova adenovirusa koji su izolirani iz gotovo svih ljudskih organskih sustava, kao i ostalih kralješnjaka, a jasno su uzročno povezani s bolestima dišnog, probavnog i mokraćnog sustava te oka (3, 5).

U laboratorijskim uvjetima Trentin i sur. (6) su 1962. godine uočili da tip 12 humanog adenovirusa uzrokuje nastanak zloćudnog tumora u mladim glodavaca. To je rezultiralo brojnim istraživanjima tumorskog potencijala adenovirusa. Do danas nije utvrđeno da adenovirusi mogu uzrokovati zloćudne tumore u ljudi (7).

## 1.2 Klasifikacija adenovirusa

Adenovirusi pripadaju u porodicu *Adenoviridae* koja je podijeljena u 5 rodova prema posljednjoj međunarodnoj klasifikaciji virusa (*International Committee on Taxonomy of Viruses 2009 - ICTV*) ovisno o domaćinu (slika 1):

*Mastadenovirus* - patogeni za sisavce (8)

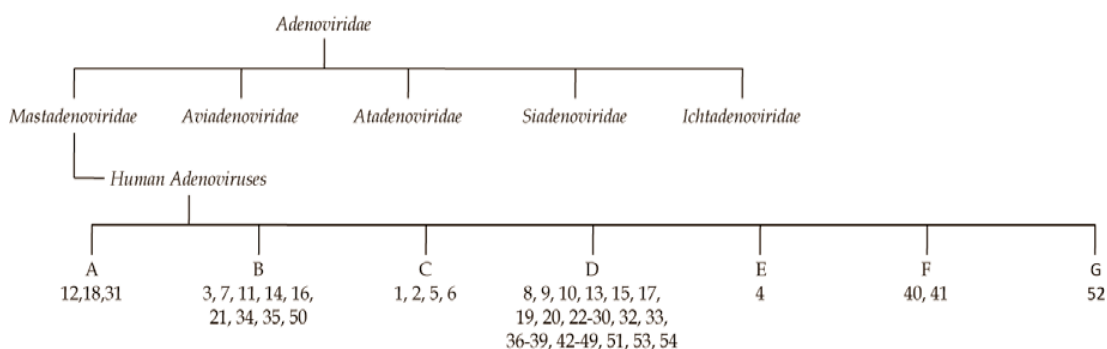
*Aviadenovirus* – patogeni za ptice (8)

*Atadenovirus* – patogeni za ptice, reptile i preživače (8)

*Siadenovirus* - patogeni za vodozemce (9)

*Ichtadenovirus* – patogeni za ribe (10).

**Slika 1. Shematski prikaz klasifikacije porodice *Adenoviridae***



Svi tipovi adenovirusa koji su patogeni za ljude pripadaju u rod *Mastadenovirus* i mogu se svrstati u 7 vrsta (A-G) ovisno o njihovim hemaglutinacijskim osobinama, podudarnosti deoksiribonukleinske kiseline (eng. *Deoxyribonucleic Acid* - DNA) i onkogenom potencijalu kod imunosuprimiranih glodavaca (11). Vrsta B se dodatno dijeli u dvije grupe: B1 i B2, ovisno o DNA restrikcijskim obrascima (tablica 1) [12]. Do danas su poznata 54 različita tipa adenovirusa (HAdV-1-54) koji se međusobno razlikuju u neutralizacijskom testu (NT) s tipno-specifičnim protuserumom (9, 13), odnosno prema hipervarijabilnim regijama na heksonu koje tvore tipno-specifične

petlje na površini proteina (14). Nemogućnost neutralizacije nekog tipa adenovirusa s prethodno poznatim tipno-specifičnim protuserumima uz filogenetsku udaljenost veću od 10% (temeljem analize matriksa proteaze proteina VIII i slijeda aminokiselina DNA polimeraze) svrstava dva tipa u različite vrste. Međutim, ako je razlika manja od 5% i dodatno je prisutan grupni kriterij različiti tipovi svrstavaju se u istu vrstu (10).

**Tablica 1. Klasifikacija ljudskih adenovirusa**

Vrsta	Tip	Tkivni tropizam
A	12, 18, 31	Probavni sustav
B1	3, 7, 16, 21, 50	Dišni sustav
B2	11, 14, 34, 35	Mokraćni i dišni sustav
C	1, 2, 5, 6	Dišni sustav
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54	Oči i probavni sustav
E	4	Dišni sustav
F	40, 41	Probavni sustav
G	52	Probavni sustav

Prilagođeno iz Robinson & Echavaria (3)

Humani adenovirusi se prema svojoj sposobnosti da aglutiniraju eritrocite sisavaca mogu podijeliti u 4 skupine (tablica 2) [15, 16].

**Tablica 2. Klasifikacija adenovirusima ovisno o hemaglutinacijskim svojstvima**

Skupina	Vrsta: Tip	Hemaglutinacija eritrocita
I	B: 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35	aglutiniraju eritrocite rezus majmuna
II	D: 8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51	aglutiniraju eritrocite štakora
III	C, E, F: 1, 2, 4-6, 40, 41	djelomično aglutiniraju eritrocite štakora
IV	A: 12, 18, 31	nemaju sposobnost aglutinacije

Prilagođeno iz Hierholzer (16)

### **1.3 Građa i umnožavanje adenovirusa**

#### **1.3.1 Građa**

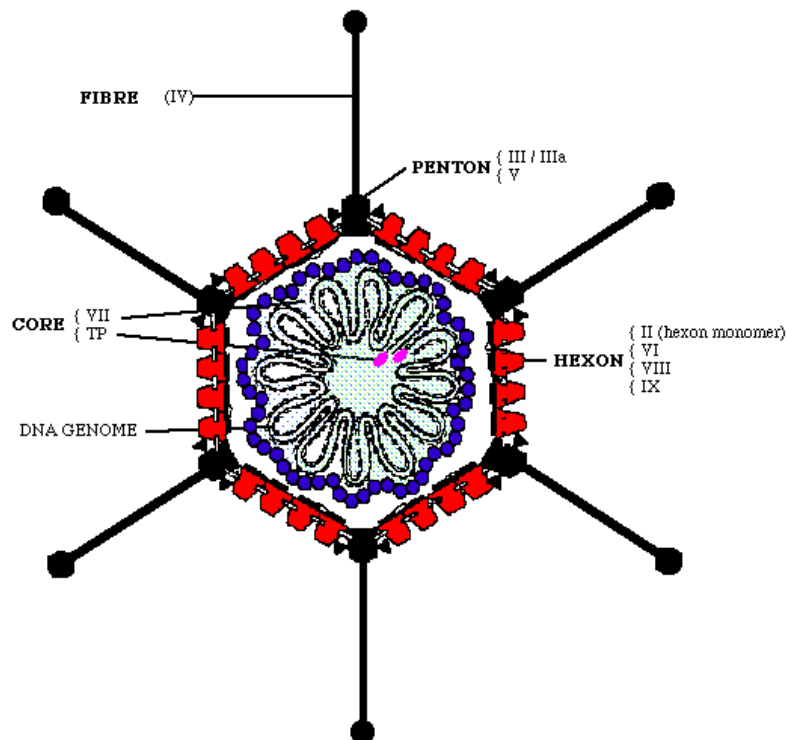
Adenovirusi su srednje veliki (promjera 70-90 nm), neovijeni virusi, ikozaedrične kapside s vlaknastim nastavcima na svakom vrhu ikozaedra (slika 2). Građeni su od vanjske kapside i unutarnje nukleoproteinske jezgre s dvolančanom DNA. Virusna kapsida je kubične simetrije i sastoji se od 252 kapsomera, od kojih je 240 heksona (eng. *hexon*) i 12 pentona (17).

Heksoni se nalaze na površini istostraničnih trokuta i bridovima, a svaki vrh ikozaedra tvore pentoni (12 vrhova ikozaedra). Hekson je najzastupljeniji protein od strukturnih proteina i čini 63% ukupne mase proteina (14). Svaki penton se sastoji od 5 istovjetnih proteina (pentomera) i vlaknastog nastavka koji je na kraju kuglasto zadebljan, a čija duljina varira od 9 do 30 nm ovisno o tipu virusa. Vlaknasti nastavak (eng. *fiber*) sastoji se od tri domene: N-terminalne domene kojom je nekovalentno vezan za bazu pentona, središnjeg dijela i C-terminalnog kraja kojim se veže za receptor na stanici domaćina. Vlaknasti nastavak ima važnu ulogu u

adsorpciji virusa na stanicu domaćina te dodatno pospješuje ulazak virusa u stanicu domaćina interakcijom sa specifičnim proteinima (integrinima) na površini stanice. Heksoni i vlaknasti nastavak su tipno-specifični antigeni i na njih se stvaraju neutralizirajuća protutijela (Nt). Heksoni su i grupno specifični antigeni koji se dokazuju reakcijom vezanja komplementa (RVK). Tipno-specifični antigeni vlaknastih nastavaka i pentona određuju se inhibicijom hemaglutinacije (IHA-om) životinjskih eritrocita (18).

Dodatni mali strukturni proteini učvršćuju hekson i stabiliziraju kapsidu: protein IIIa (pIIIa) koji se nalazi ispod baze pentona, protein VI (pVI) i protein IX (pIX) koji se nalazi u centru svake stranice ikozaedra te pVIII koji gradi unutarnji sloj kapside (19, 20).

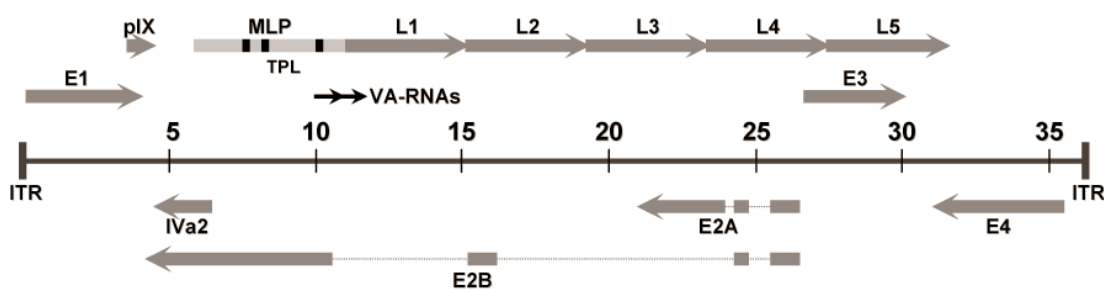
**Slika 2. Pojednostavljeni shematski prikaz građe adenovirusa**  
(Prikaz nije proporcionalan prirodnim veličinama.)



Izvor: [www.mcb.uct.ac.za/cann/335/Adenoviruses.html](http://www.mcb.uct.ac.za/cann/335/Adenoviruses.html)

Genom virusa čini linearna, dvolančana DNA veličine 30-38 Kbp koja je usko povezana s proteinima jezgre proteinom V (pV), proteinom VII (pVII) i proteinom  $\mu$  (21). Na svakom kraju DNA nalazi se obrnuti ponavljajući slijed (eng. *inverted terminal repeat-ITR*) od 100 do 140 bp na koji je kovalentno vezan završni protein (eng. *terminal protein-TP*) koji je neophodan za početak virusne DNA replikacije (7). Genom se prepisuje s oba lanca i u oba smjera, a kodira oko 40 regulatornih i strukturnih proteina organiziranih u 9 transkripcijskih jedinica te jednu do dvije (ovisno o tipu) male, s virusom povezane ribonukleinske kiseline (eng. *virus associated-ribonucleic acid - VA-RNA*). Transkripcijske jedinice uključuju pet jedinica za rani prijepis (eng. *early - E1A, E1B, E2, E3 i E4*), dvije za odgođeni rani prijepis (eng. *early delayed - IX i IVa2*) i jednu glavnu jedinicu za kasni prijepis (eng. *major late transcription unit - MLTU*). MLTU se dalje obrađuje te tvori 5 grupa (L1- L5) kasnih glasničkih ribonukleinskih kiselina (eng. *messenger ribonucleic acid - mRNA*) (slika 3). Sve transkripcijske jedinice prepisuje RNA-polimeraza-II, dok VA-RNA prepisuje RNA-polimeraza-III (21, 22).

**Slika 3. Shematski prikaz organizacije genoma adenovirusa**



Kratice: E=rani (eng. *early*); L=kasni (eng. *late*); ITR=obrnuti ponavljajući slijed (eng. *inverted terminal repeat*); MLP=glavni kasni promotor (eng. *major late promoter*); pIX=protein IX; TPL=eng. *tripartite leader*; VA RNA=s virusom povezane ribonukleinske kiseline (eng. *virus associated-ribonucleic acid*)

Izvor: [http://ediss.sub.uni-hamburg.de/voltexte/2010/4876/pdf/PhD\\_THESIS.pdf](http://ediss.sub.uni-hamburg.de/voltexte/2010/4876/pdf/PhD_THESIS.pdf)



### 1.3.2 Umnožavanje virusa

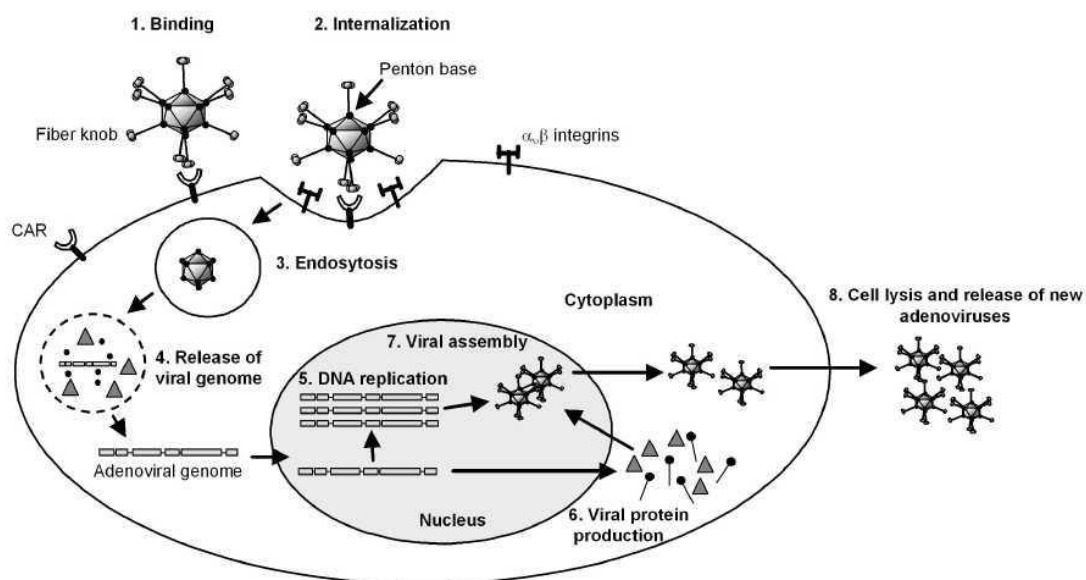
Umnožavanje virusa podijeljeno je u dvije faze (ranu i kasnu fazu) s obzirom na početak virusne DNA replikacije. Rana faza uključuje adsorpciju i ulazak virusa u stanicu te ekspresiju gena za rani prijepis. Glavni cilj ove faze je priprema optimalnih uvjeta za DNA replikaciju u stanici domaćina (21). Virus se veže za stanicu domaćina pomoću vlaknastog nastavka za stanični coxsackie-adenovirus receptor (CAR) za sve ljudske adenoviruse (23, 24), osim za vrstu B adenovirusa koja se specifično veže za CD46 receptor (25), odnosno tip 37 vrste D za koji je važnije prisustvo sijalične kiseline nego CAR-a na površini stanice (26). Nakon adsorpcije, pentonske baze se vežu za izvanstaničnu domenu integrina te tako omogućuju ulazak virusa u citoplazmu endocitozom (27). Proces ulaska je jako efikasan jer 85% adsorbiranih virusa se nađe u citoplazmi već nakon 10-ak minuta. U citoplazmi se proteini kapside otklanjaju i konačno virusna DNA ulazi u jezgru stanice kroz jezgrine pore tzv. mikrotubule (28). Uloga gena rane faze je: omogućiti da stanica domaćina uđe u S-fazu staničnog ciklusa, inhibicija stanične obrane te stvaranje odgovarajućih genskih produkata potrebnih za DNA replikaciju (21). Transkripcija adenovirusa započinje ekspresijom neposrednog ranog gena E1A (eng. *immediate early E1A gene*) koji omogućuje transkripciju ostalih ranih gena E1B-E4 (29). Pojednostavljeni prikaz umnožavanja adenovirusa prikazan je na slici 4.

Sinteza virusne DNA počinje na kraju linearne dvostruko zavijene uzvojnice i za taj proces su potrebna barem tri rana virusna proteina (prekursor TP, DNA polimeraza i protein vezan uz DNA) i tri stanična proteina (21).

Kasna faza započinje s početkom replikacije virusne DNA i obilježena je punom aktivacijom kasnog glavnog promotora (eng. *major late promotor* - MLP) kao i selektivnim transportom i translacijom virusnih mRNA. Na kraju replikacije virusne DNA aktiviraju se L1-L5 geni što dovodi do stvaranja 20-ak virusnih mRNA grupiranih u L1-L5 te stvaranja strukturnih proteina virusa. Tijekom kasne faze u stanici domaćina odvija se sinteza, transport i translacija isključivo virusne mRNA

kasne faze. Sinteza proteina kapside odvija se u citoplazmi, a sazrijevanje virusne čestice zbiva se u jezgri stanice. Heksoni ulaze u jezgru stanice vezanjem na pVI koji stabilizira kapsidu i putuje između jezgre i citoplazme. Zatim se u jezgri formira prazna kapsida od prethodno stvorenih heksona i pentona nakon čega ulazi genom (DNA) i proteini središnjeg dijela virusa. Sazrijevanje virusne čestice započinje aktivacijom L3-proteaze i njenim djelovanjem na pVI, a nastavlja se kaskadom proteolitičkih aktivnosti koja konačno dovodi do formiranja zrele čestice (21).

**Slika 4. Pojednostavljeni prikaz umnožavanja adenovirusa**



Izvor: Hakkarainen & Hemminki (30)

Životni ciklus virusa traje 24-36 sati i tijekom tog ciklusa sazrijeva oko  $10^4$  virusnih čestica koje se oslobađaju lizom stanice domaćina (21).

#### **1.4 Onkogeni potencijal adenovirusa**

Ovisno o učestalosti i vremenu potrebnom da uzrokuju tumor u glodavaca, ljudski adenovirusi dijele se u: one s izrazitim onkogenim potencijalom, sa slabim

onkogenim potencijalom i one bez onkogenog potencijala (tablica 3). Vrsta A adenovirusa najjače pokazuje ova svojstva i dovodi do stvaranja tumora u mladim glodavaca (do 4 mjeseca starosti). Adenovirusi vrste C i E za sada nisu pokazali tumorigena svojstva. Tipovi adenovirusa 12, 18 i 31 imaju najniži postotak guanin-citozin baza (47-49%) i najveću mogućnost izazivanja tumora u životinja (31, 32). Međutim, neovisno o razlici u onkogenom potencijalu između različitih tipova adenovirusa, svi testirani humani adenovirusi mogu jednako učinkovito onkogeno transformirati kulture stanica glodavaca (33). Suprotno njihovom onkogenom potencijalu u životinja i visokom transformirajućem potencijalu u kulturama stanica glodavaca, transformacija primarnih humanih staničnih linija posredovanih ljudskim adenovirusima je vrlo neučinkovita (34). Do danas nema uvjerljivog dokaza da adenovirusi mogu izazvati zloćudni tumor u ljudi (33, 35).

**Tablica 3. Onkogeni potencijal adenovirusa**

Vrsta	Tip	Onkogeni potencijal
A	12, 18, 31	visok
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50	umjeren
C	1,2,5,6	slab ili nema
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54	slab ili nema (tumori mliječnih žlijezda- tip 9, 10)
E	4	slab ili nema
F	40, 41	nema
G	52	nepoznat

Prilagođeno iz Robinson & Echavaria (3)

## 1.5 Patogeneza i imunost

Epitelne stanice su ciljane stanice za adenoviruse. Virus ulazi u organizam preko usta, nazofarinksa ili konjunktive oka. Primarno mjesto umnožavanja virusa je respiratorni epitel u nazofarinksu. Umnožavanje tipova adenovirusa koji uzrokuju infekcije dišnog sustava odvija se u stanicama respiratornog epitela bez cilija koje na svojoj površini posjeduju odgovarajuće receptore (CAR). Epitelne stanice donjeg dijela dišnog sustava imaju cilije, a na apikalnoj površini nemaju izražene odgovarajuće receptore. No, infekcija je moguća ako postoji oštećenje integriteta površine epitela.

Rijetko se javlja viremija. Međutim, adenovirusna infekcija mokraćnog mjehura, prvenstveno vrstom C adenovirusa, upućuje na zaključak da je viremija moguća. Nema dokaza o ascendentnom putu ulaska virusa u mokraćni mjehur. Ova infekcija se češće javlja u mladih muškaraca nego u žena.

Mnogi se adenovirusi umnožavaju u epitelu crijeva ne izazivajući gastroneuritis, ipak tipovi 40 i 41 mogu uzrokovati crijevnu bolest.

Kad se adenovirus veže za stanični receptor na ciljnoj stanici pokreće kaskadu događaja koji dovode do lučenja interleukina i kemokina (36). Svaki proupalni medijator kojeg izlučuje inficirana stanica ima sposobnost pokretanja specifičnih upalnih stanica čime doprinosi upalnom odgovoru. Jačina i obrazac ranog upalnog odgovora utječe na razvoj infekcije. Kad je odgovor odgovarajući, domaćin uspješno ukloni inficirane stanice s najmanje oštećenja okolnog tkiva. Imuni odgovor protiv virusa posredovan je specifičnim efektorskim stanicama kao što su: stanice urođene ubojice (engl. *natural killer cell*-NK), makrofagi te antigen specifični limfociti T i B. Odgovarajuća aktivacija ovih komponenti imunog odgovora omogućuje kontrolu i/ili prevenciju infekcije adenovirusom *in vivo* (37). Prirodna antivirusna imunost posredovana je prvenstveno NK stanicama, neutrofilima i monocitima/makrofagima koji ograničavaju virusnu infekciju tako što direktno unište zaraženu stanicu ili

indirektno tako što stvaraju protuupalne citokine poput tumor nekrotizirajućeg faktora- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukina-1 (IL-1), interleukina-6 (IL-6), interferona- $\beta$  i kemokina (38). Dodatno, prirođena imunost pokreće antigen prezentirajuće stanice koje pospješuju stvaranje optimalnog stečenog imunog odgovora (39). Povišene vrijednosti IL-6, interleukina-8 i TNF- $\alpha$  nađene su u djece s adenovirusnom infekcijom (40).

Stečena imunost posredovana je virus specifičnim B i T staničnim odgovorom. Nakon infekcije ovim virusom stvaraju se grupno-specifična i tipno-specifična protutijela. Grupno-specifična protutijela općenito nemaju neutralizacijsko djelovanje, dok tipno-specifična Nt na hipervarijabilnu regiju na virusnoj kapsidi mogu učinkovito neutralizirati virus izvan stanice te tako spriječiti širenje virusa (38, 41). Kad je virus u stanici, zaštićen je od specifičnih protutijela, no tada se aktivira stanični imuni odgovor koji obično dovodi do eradikacije zaraženih stanica preko CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> stanica (42, 43).

Poznato je i da bolesnik, unatoč zadovoljavajućem humoralnom odgovoru, može izlučivati adenovirus intermitentno, posebno u stolici, više mjeseci nakon infekcije. Poslije svake preboljele infekcije stvaraju se zaštitna Nt koja štite od reinfekcije istim tipom, ali ne eliminiraju kliconoštvo (38).

## **1.6 Epidemiologija**

Adenovirusne infekcije su česte i javljaju posvuda u svijetu. Akutne infekcije dišnog sustava (eng. *acute respiratory infections* - ARI) uzrokovane adenovirusima javljaju se sporadično, endemijski ili epidemijski. Epidemije se obično javljaju u dječjim vrtićima, ustanovama za skrb starih i nemoćnih, intenzivnim jedinicama, školama i vojarnama, odnosno u zatvorenim prostorima u kojima boravi veći broj ljudi te na bazenima (3, 38). Iako se adenovirusne infekcije javljaju tijekom cijele godine, nešto

je veća učestalost tijekom zime i proljeća, no i to varira ovisno o tipu adenovirusa i populaciji (44).

Većina adenovirusnih infekcija javlja se u prvim godinama života. Adenovirusne infekcije dišnog sustava u djece najčešće se javljaju u dobi od 6 mjeseci do 5 godina (45). Do 10. godine života većina ljudi je bila inficirana s jednim ili više tipova adenovirusa (46). Oko polovine svih infekcija prođe asimptomatski. Nema značajne razlike u osjetljivosti s obzirom na spol ili etničku pripadnost. Infekcije se javljaju posvuda u svijetu uz neke razlike u pojavnosti pojedinih tipova u određenim područjima svijeta (3).

Adenovirusi su odgovorni za 1-5% svih infekcija dišnog sustava te 5-15% svih akutnih proljeva (3). Djeca su posebno osjetljiva. Prevalencija adenovirusnih infekcija dišnog sustava u djece kreće se od 2 do 14%, a tijekom epidemija može biti i značajno viša (3, 45). Adenovirusi imaju važnu ulogu u etiologiji teških ARI, posebno u dojenčadi i djece (45). Adenovirusi su odgovorni za 2-7% ARI u djece mlađe od 5 godina i za oko 10% svih uzroka hospitalizacija u toj dobnoj skupini. (46, 48). ARI je u vojnih ročnika u 30-70% slučajeva uzrokovan adenovirusima (3). Adenovirusne infekcije se često javljaju i u imunokompromitiranih bolesnika (49).

Infekcije dišnog sustava najčešće uzrokuju adenovirusi koji pripadaju vrstama B, C i E. Tipovi 1, 2, 5 i 6 adenovirusa su sveprisutni, posebno u male djece koja ih mogu izlučivati mjesecima, najduže stolicom. Oni se obično javljaju kao endemske infekcije dišnog sustava. Tipovi 4, 7, 14 i 21 uzrokuju male epidemije, većinom zimi i u rano ljeto (3). Velike epidemije keratokonjunktivitisa obično su uzrokovane tipovima 8, 9 i 37 adenovirusima. Manje epidemije konjunktivitisa obično uzrokuju tipovi 3, 4 te 7 i one se obično javljaju ljeti među plivačima u bazenima (38). Epidemije ARI među vojnim ročnicima, uključujući i upalu pluća, javljaju se u zimskom i proljetnom periodu, a obično su uzrokovane tipovima 4 i 7 adenovirusa (3).

Glavni put prijenosa adenovirusnih infekcija dišnog sustava u svim dobnim skupinama je aerosol, a moguć je i prijenos preko kontaminiranih predmeta. U dojenčadi i male djece značajan je i fekalno-oralni put (46). Adenovirusi se jednostavno prenose u imunokompromitiranih bolesnika i male djece te u bolničkim uvjetima (38).

### **1.7 Kliničke karakteristike**

Ovisno o tipu postoje značajne razlike u tkivnoj prijemljivosti i virulenciji adenovirusa. Stoga, adenovirusi mogu uzrokovati infekcije različitih organskih sustava, većinom dišnog i probavnog sustava, a rijetko mokraćnog sustava i jetre (3). Ponekad mogu uzrokovati i bolest nekih drugih organskih sustava kao što su gušterača, srčani mišić (miokard) ili središnji živčani sustav (tablica 4). Iako je poznato više od 50 različitih tipova adenovirusa, većinu bolesti u ljudi uzrokuje trećina ovih tipova.

**Tablica 4. Adenovirusne infekcije, povezanost s tipovima, domaćini**

Klinička slika	Tip adenovirusa		Domaćin
	Često	Manje često	
Infekcije gornjeg dišnog sustava (IGDS)	1-3, 5, 7	4, 6, 11, 14, 15, 18, 21, 29, 31	dojenčad, djeca
Epidemijski keratokonjunktivitis	8, 19, 37	2-5, 7, 10, 11,13-17, 19, 21, 23, 29	pojedinci svih dobnih skupina
Faringokonjunktivalna groznica	3, 4, 7	1, 2, 5, 6, 8, 11-17, 19-21, 29, 37	djeca
Akutni hemoragijski konjunktivitis	11	2-8,14,15,19,37	djeca
Krup	5	1-3, 12, 19	djeca
Infekcije donjeg dišnog sustava (IDDS)	3, 4, 7, 21	1, 2, 5, 7, 8, 11, 35	dojenčad, djeca, imunokompromitirani
ARI u vojnih ročnika	4, 7	2, 3, 5, 8, 11, 14, 21, 35	vojni ročnici
Gastroenteritis	40, 41	1-3, 5, 7, 12-18, 21, 25, 26, 29, 31	djeca
Hepatitis	1-3, 5, 7	4, 31	dojenčad, djeca, imunokompromitirani
Akutni hemoragijski cistitis	11	7, 21, 34, 35	djeca, imunokompromitirani
Spolno prenosive bolesti	2, 37	1, 5, 7, 11, 18, 19, 31	adolescenti, odrasli
Miokarditis	7, 21		djeca
Meningoencefalitis	7	1-3, 5, 6, 11, 12, 32	djeca, imunokompromitirani
Diseminirana bolest	1, 2, 5, 11, 34, 35	3, 6, 7, 14, 21, 29-31, 37-39, 43, 45	novorođenčad, imunokompromitirani

(kratica: ARI= akutne infekcije dišnog sustava)

Prilagođeno iz Robinson & Echavaria (3)



Brojne adenovirusne infekcije prolaze supklinički. U oko 50% zaražene djece ne razviju se simptomi infekcije, ali se stvore odgovarajući Nt-i koji ih onda štite od ponovne infekcije istim tipom adenovirusa (38, 50). Novorođenčad, mala djeca i imunokompromitirani bolesnici imaju visoki rizik da se infekcija adenovirusima očituje težom kliničkom slikom sustavne infekcije (49, 51).

Oko 5% ARI uzrokuju adenovirusi i većinom su to infekcije gornjeg dijela dišnog sustava (IGDS-a) u djece mlađe od 5 godina (53). Adenovirusi svrstani u vrstu B (tipovi 3, 7, 14, 16, 21, 34, 35), vrstu C (tipovi 1, 2, 5, 6) i vrstu E (tip 4) uzrokuju ARI u dojenčadi i male djece te u vojnih ročnika (46, 47, 49). Adenovirusne infekcije prezentiraju se simptomima obične prehlade. Adenovirusi isto tako često izazivaju faringitis i tonzilitis (52). Uobičajeni simptomi ovih infekcija su: nosna kongestija, iscjedak iz nosa i kašalj. No, u nekih bolesnika javlja se eksudativni tonzilitis (ET) kojeg je klinički teško razlikovati od onog uzrokovanog beta-hemolitičnim streptokokom grupe A. Respiratorne simptome obično prate i opći simptomi poput: opće slabosti, vrućice, tresavice, bolova u mišićima i glavobolje (38). IGDS u djece najčešće uzrokuju tipovi 1, 2, 5 i 6 adenovirusa, a zatim sljede tipovi 3 i 7 koji se većinom javljaju epidemijski. Infekcije donjeg dijela dišnog sustava (IDDS), kao što je upala pluća, najčešće uzrokuju tipovi 3, 7 i 21. Neki se tipovi, kao što su tipovi 7 i 14, češće povezuju s teškim kliničkim oblicima ARI-ja s mogućim fatalnim ishodom (38, 53, 54).

Prema rezultatima istraživanja provedenog u Hrvatskoj 1981. godine u 50-oro djece s adenovirusnom infekcijom dišnog sustava najčešće je bio izoliran tip 7 (42%) adenovirusa, a zatim su sljedili tipovi 1 i 2 (svaki po 16%), tip 3 (12%), tip 5 (10%) te tip 6 (4% izolata). Tip 4 nije bio izoliran. U istraživanju nije bila navedena klinička prezentacija bolesti dišnog sustava (55). Do sličnih su rezultata došli i u prethodnom istraživanju provedenom u Hrvatskoj 1979. godine (56). Od ukupno 102 izolirana soja virusa u bolesnika s akutnim IGDS-om 70 je pripadalo porodici adenovirusa. U tih bolesnika najčešće je bio izoliran tip 7 (32/70; 46%) adenovirusa, a zatim su

slijedili tip 2 (13/70; 19%), tip 1 (10/70; 14%), tip 3 (8/70; 11%) i tip 5 (7/70; 10%) adenovirusa. S druge strane, od ukupno 57 izolata virusa kod akutnog IDDS-a bio je 31 izolat adenovirusa i opet je najčešće bio izoliran tip 7 (11/31; 35%) adenovirusa, a zatim tip 1 (7/31; 23%), tip 2 (5/31; 16%), tip 3 (4/31; 13%), tip 5 (3/31; 10%) i tip 4 (1/31; 3%) adenovirusa (56).

Iako je u većini slučajeva infekcija samoograničavajuća i ne zahtijeva bolničko liječenje, ipak se dosta djece liječi u bolnici i prima antibiotik (44).

Adenovirusne infekcije dišnog sustava u djece kliničkom slikom mogu oponašati teške bakterijske infekcije s vrućicom  $>39^{\circ}\text{C}$  koje prate i povišene koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP  $>40\text{ mg/l}$ ) te leukocitoza  $>15000\text{ mm}^3$  (57-60). Kliničke slike ARI-ja uzrokovanih adenovirusima teško se razlikuju od onih uzrokovanih drugim respiratornim uzročnicima kao što su respiratorni sincicijski virus (RSV), virusi influence i virusi parainfluence te nekih bakterija (59). Ipak u većine djece s ARI-jem uzrokovanim RSV-om, virusima influence i virusima parainfluence nisu zabilježene tako visoke vrijednosti leukocita i koncentracije CRP-a kao kod onih uzrokovanih adenovirusima (58-60).

Adenovirusi mogu uzrokovati i IDDS u djece, kao što su: bronhitis, bronhiolitis i pneumoniju (3). Adenovirusi uzrokuju 4-10% pneumonija u dojenčadi i male djece (53, 61, 62). Većina bolesnika se nakon IDDS-a oporavi bez posljedica, ali neke infekcije mogu biti teške i ponekad fatalne, posebno u djece mlađe od 2 godine (3, 38). Adenovirusi mogu samostalno uzrokovati krup, ali su dokazane i koinfekcije s *Bordetellom pertusis* (3). Tip 7 adenovirusa posljednjih godina 20. stoljeća bio je značajan problem u zemljama Južne Amerike uzrokujući teške IDDS-e u djece(63).

ARI u vojnih ročnika je sindrom kojeg najčešće uzrokuju tipovi 4 i 7 adenovirusa. Može se očitovati kao prehlada s vrućicom, faringitis s ili bez tonzilitisa, bronhitis ili pneumonija. Udio hospitaliziranih je visok, čak do 50% tijekom epidemije, a mogući su i fatalni ishodi (64, 65). Obično se javlja u mladih vojnih ročnika u stanju

malaksalosti. Širenju bolesti doprinosi i boravak većeg broja ljudi u zatvorenim prostorima (38).

Adenovirusne infekcije oka su česte. Inkubacija je obično 6-9 dana. Najčešće se javlja akutni folikularni konjunktivitis koji je obično površinski i prolazi bez posljedica kroz nekoliko tjedana (66). Faringokonjunktivalna groznica je folikularni konjunktivitis praćen simptomima gornjeg dijela dišnog sustava, vrućicom, limfadenopatijom, faringitisom i općom slabošću. Najčešće ih uzrokuju tipovi 3 i 7 adenovirusa te nešto rjeđe tip 14. Obično su zahvaćena oba oka (38, 66).

Suprotno blagom obliku bolesti oka, epidemijski keratokonjunktivitis je izrazito zarazan i ozbiljniji oblik bolesti. Nakon inkubacije od 8 do 10 dana javlja se folikularni konjunktivitis s edemom kapaka, boli, suženjem oka i fotofobijom. Nakon početnog konjunktivitisa slijede infiltrati i erozije rožnice (67). Bolest obično zahvaća samo jedno oko s hipertrofijom istostranih periaurikularnih limfnih čvorova. Ponekad budu zahvaćeni i drugi limfni čvorovi, a mogu se javiti i opći simptomi, posebno u djece. Bolest je ipak najčešće ograničena samo na zahvaćeno oko i pripadajuće limfne čvorove. Simptomi obično prolaze nakon 2 tjedna. Zamućenja rožnice, u nekim slučajevima, mogu trajati nekoliko godina, a iznimno još i duže. Epidemijski keratokonjunktivitis najčešće uzrokuju tip 8, zatim tip 19 i rijetko tip 37 adenovirusa (68, 69). Može se prenijeti tijekom oftalmoloških procedura. Obično se javlja krajem ljeta i u jesen. U Japanu, Tajvanu i Vijetnamu javlja se i u obliku epidemija (38).

Gastroenteritise uzrokuju tzv. crijevni tipovi adenovirusa (tipovi 40 i 41). Inkubacija je 3-10 dana. Stolice su obično vodenaste, bez primjesa krvi i bez leukocita, a proljev obično traje 10 dana. Mogu se javiti i blaga vrućica, povraćanje i bolovi u abdomenu. Nerijetko su prisutni i respiratorni simptomi. Bolest prolazi bez posljedica i komplikacija, osim što su u imunokompromitiranih bolesnika zabilježeni i fatalni ishodi (3). Gastrointestinalni sindromi povezani s ostalim ne-crijevnim tipovima adenovirusa uključuju: invaginaciju crijeva, akutni mezenterični limfadenitis i apendicitis (3, 38).

Kliničke manifestacije adenovirusne infekcije u imunokompromitiranih bolesnika ovise o osnovnoj bolesti, zahvaćenom organu, dobi bolesnika i tipu virusa (49). Stopa mortaliteta varira 12-70% u pedijatrijskih bolesnika nakon transplantacije solidnih organa ili primatelja koštane srži (70). Infekcije adenovirusom u ovih bolesnika mogu se javiti kao pneumonija, hepatitis, kolitis, pankreatitis i diseminirana bolest. Hemoragijski cistitis može biti posebno teškog oblika i značiti diseminaciju bolesti (71). Nakon uvođenja visokoaktivne antiretrovirusne terapije (eng. *highly active antiretroviral treatment* - HAART) u bolesnika s infekcijom virusom humane imunodeficijencije (HIV-om) značajno je smanjena incidencija svih pratećih infekcija pa tako i adenovirusnih. Prije HAART-a u 7-29% ovih bolesnika adenovirusi su izolirani iz uzoraka iz probavnog i mokraćnog sustava (72). Većina izolata bila je vrste D koja se rijetko nalazi u drugih, imunokompetentnih bolesnika (3).

Manje česte kliničke manifestacije adenovirusnih infekcija su teška i često fatalna bolest novorođenčadi, meningoencefalitis i encefalitis, zatim akutni miokarditis u inače zdravih osoba ili infekcija povezana s odbacivanjem transplantata srca. Isto tako se čini da je adenovirus uzročnik i spolnih bolesti kao što su genitalne lezije i uretritis (3).

### **1.8 Mikrobiološka dijagnostika adenovirusa**

U ranoj fazi bolesti adenovirusi se mogu jednostavno dokazati u odgovarajućim uzorcima ovisno o simptomima bolesti. Kvaliteta uzorka ovisi o broju stanica te se stoga za infekcije dišnog sustava preporuča uzimanje nazofaringealnog sekreta (NFS-a), iako se može dokazati i u nazofaringealnom obrisku ili bronhoalveolarnom ispirku.

Uspješnost izolacije adenovirusa najveća je ako su uzorci uzeti u početnoj fazi bolesti te transportirani u odgovarajućem mediju na temperaturi 2-8°C. Preporuča se uzorak obraditi neposredno nakon uzimanja. Uzorak koji je pohranjen na +4°C može se obraditi najkasnije unutar 2-3 dana (3). Adenovirusi su otporni virusi te se uzorke, izolate virusa ili virusnu DNA može čuvati smrzavanjem na -70°C uz minimalni gubitak infektivnosti (3).

Serum treba odvojiti unutar par sati od uzimanja krvi kako bi se izbjegla hemoliza ili degeneracija bijelih krvnih stanica. Za detekciju serokonverzije ili četverostrukog porasta specifičnih protutijela, potrebno je uzeti parne serume, prvi na početku bolesti, a drugi 2-4 tjedna kasnije (3).

### **1.8.1 Izravna dijagnostika**

#### **1.8.1.1 Dokaz antigena**

Adenovirusom zaražena stanica vidljiva je u svjetlosnom mikroskopu kao stanica sa solitarnom, centralno smještenom, bazofilnom inkluzijom u jezgri koju čine virusne čestice (eng. *smudge cell*). S druge strane, karakteristična morfologija adenovirusnih čestica vidi se u elektronskom mikroskopu (EM) i ona ne zahtijeva dodatnu potvrdu. Pomoću EM-a otkriveni su crijevni adenovirusi (tipovi 40 i 41) koje nije bilo moguće izolirati, u tada, uobičajeno korištenim staničnim kulturama (38).

Dokaz antigena u kliničkom uzorku široko se primjenjuje za dijagnozu adenovirusnih infekcija dišnog i probavnog sustava. Testovi novije generacije koriste monoklona protutijela (eng. *monoclonal antibodies* - MAbs) na konzerviranu regiju hekson proteina (3).

Za direktni dokaz virusa u uzorcima iz dišnog sustava najviše se primjenjuje imunofluorescentna metoda jer je jednostavna i brza. Osjetljivost izravne imunofluorescencije (engl. *direct immunofluorescence assay* - DFA) niža je od

izolacije virusa u staničnoj kulturi za dijagnozu adenovirusnih infekcija dišnog sustava (74, 75). Osjetljivost DFA metode varira između 28% i 75%, ovisno o istraživanju (76). Kvaliteta uzorka (broj i očuvanost stanica) značajno utječe na rezultate (77). Zadovoljavajući uzorak je onaj koji sadrži najmanje 50, na virus osjetljivih, stanica (3). DFA metoda daje rezultate u kratkom vremenu, što je posebno korisno u dojenčadi i male djece u kojih simptomi mogu biti varljivi, odnosno oponašati bakterijsku infekciju (52). Zbog manje osjetljivosti DFA metode moguće je koristiti izolaciju virusa u staničnoj kulturi kao potvrdnu metodu (78).

Imunoenzimske metode (eng. *enzyme immunoassay* – EIA) namijenjene za dokaz virusa u uzorku iz dišnog sustava imaju nešto veću osjetljivost od DFA. Osjetljivost ovih metoda kreće se u rasponu 43-89%, ovisno o istraživanju (76). Ipak, glavno mjesto primjene EIA-e je dokaz adenovirusa u stolici. Osjetljivost ovih testova u odnosu na izolaciju virusa, odnosno EM, veća je od 90%, a specifičnost je veća od 97% (79).

Od ostalih metoda za izravni dokaz antigena u uzorku postoji i imunokromatografski test koji je namijenjen primjeni izravno na mjestu skrbi bolesnika. Osjetljivost imunokromatografskog testa za nazofaringealne uzorke je oko 84% u odnosu na izolaciju virusa ili lančanu reakciju polimeraze (eng. *polimerase chain reaction* - PCR). Međutim, praktičan je jedino kod manjeg broja uzoraka (80).

Za dokaz antigena koristi se i lateks aglutinacija (LA) koja se primarno koristi za dokaz adenovirusa u stolici. Osjetljivost LA slična je onoj kod EIA-e, iako oko 13% rezultata nije moguće interpretirati (81).

### **1.8.1.2 Izolacija adenovirusa u staničnoj kulturi**

Standardna metoda, odnosno „zlatni standard“ za dokaz infekcije adenovirusima je izolacija u staničnoj kulturi. Primjenjiva je za sve tipove uzoraka kod infekcija dišnog sustava te infekcija oka (38). Adenovirus se u staničnoj kulturi obično umnoži za 2 do 7 dana, ali ponekad su za uzgoj potrebna 2-3 tjedna. Adenovirusi se mogu

izolirati u primarnim i kontinuiranim linijskim staničnim kulturama humanog porijekla kao što su A549 (stanice adenokarcinoma pluća), HeLa (stanice karcinoma vrata maternice) i Hep-2 (stanice karcinoma larinksa). Za crijevne tipove 40 i 41 adenovirusa najbolja je kontinuirana stanična kultura Graham 293 [HEK stanice s transformiranom DNA tipom 5 adenovirusa] (38).

Jednoslojnu kontinuiranu liniju HeLa stanica uveo je 1951. godine g. Gey (82). Lako ih je umnožavati. Kroz 4-5 dana stanice stvore kompletan sloj na površini epruvete te su pogodne za inokulaciju virusa. Za uzgoj i održavanje stanica primjenjuje se obogaćena hranjiva podloga za uzgoj stanica s dodatkom fetalnog telećeg seruma, glutamina i antibiotika. Antibiotici se dodaju kako bi se spriječila bakterijska infekcija jer su samo zdrave stanice sposobne za replikaciju i umnožavanje virusa u njima.

Citopatični učinak (CPU) se obično javlja nakon 2-7 dana. Karakteristični CPU počinje na rubovima stanične kulture, a zatim se širi prema središnjem dijelu. Stanice se zaokružuju te kasnije tvore oblik grozdastih nakupina baloniranih stanica koje su tamnije od neinficiranih jer drugačije lome svjetlost. Opisane promjene vidljive su svjetlosnim mikroskopom (3, 38). Inficirane stanice se ne raspadaju, nego cijele otpadaju s površine tako da u tekućoj podlozi nalazimo malo virusa, čak manje od 1% (85).

Za dokaz virusa u staničnoj kulturi mogu se koristiti i dodatni dijagnostički postupci kao što su DFA metoda ili neizravna imunofluorescencija (eng. *indirect immunofluorescence assay* - IFA).

U novije vrijeme izolacija adenovirusa je značajno unaprijeđena tehnikom „centrifugiranja uzorka na staničnu kulturu“ (eng. *shell vial technique*). Ova metoda daje pozitivne rezultate u kraćem roku, već nakon 1-2 dana, za većinu uzoraka koji bi bili pozitivni i konvencionalnom izolacijom (3,38). Dokaz adenovirusa u staničnoj kulturi može se izvesti nakon 1-2 dana od inokulacije uzorka primjenom specifičnih MAb-a u DFA ili u IFA metodi (83). Uspješnost dokaza adenovirusa nakon 2 dana je 50-85% u usporedbi s 14-dnevnom konvencionalnom izolacijom virusa u staničnoj

kulturi. Ipak, za maksimalni učinak, preporučuje se dokaz adenovirusa DFA ili IFA metodom provesti 5. dan od inokulacije (84).

### **1.8.1.3 Tipizacija adenovirusa**

U rutinskoj mikrobiološkoj praksi uobičajeno je provoditi rod-specifičnu identifikaciju, odnosno prisutnost adenovirusa u kliničkom materijalu. Daljnja tipno-specifična identifikacija virusa rutinski se ne izvodi. Identifikacija tipa adenovirusa obično se provodi u epidemiološke svrhe, kod istraživanja patogeneze, utvrđivanja uzroka neuobičajenih ili izrazito teških infekcija (3).

Adenoviruse izolirane u staničnoj kulturi može se tipizirati primjenom NT-a, molekularnih metoda ili IHA-e. Tipizacija u NT-u se izvodi na izolatu primjenom pojedinačnih tipno-specifičnih protutijela. Molekularne metode tipizacije mogu se provesti na izolatu ili direktno u kliničkom uzorku (3).

Adenovirusi se dijele u 4 skupine prema sposobnosti da aglutiniraju eritrocite rezus majmuna ili štakora (tablica 2). Kad je izoliranom adenovirusu IHA-om određena hemaglutinacijska skupina, moguće je naknadnom primjenom pojedinačnih tipno-specifičnih protutijela utvrditi tip izoliranog virusa (85).

Iako je izvođenje NT-a dugotrajno i zahtjevno, a rezultati ponekad nisu sasvim jasni, ICTV je prihvatio NT kao kontrolnu metodu za određivanje tipa adenovirusa (3,38).

Ograničenja NT-a su otežana dostupnost tipno-specifičnih protutijela i potreba višestrukog testiranja u staničnoj kulturi svakog pojedinog izolata s protutijelima na različite tipove adenovirusa. Stoga se ponekad koristi kombinacija protutijela kako bi se smanjio broj pojedinačnih reakcija potrebnih za određivanje tipa virusa. Danas postoje tri glavna načina izvođenja NT-a: konvencionalni sedmodnevni test u kulturi humanih epitelnih stanica, trodnevni test u kulturi stanica bubrega majmuna koji je najjednostavniji i najbrži te petodnevni test u kulturi VERO stanica u mikrotitarskoj pločici (85)



Ostale metode tipizacije izoliranog virusa uključuju tehniku imunoperoksidaze i IFA-e primjenom tipno-specifičnih MAbs-a (3).

#### **1.8.1.4 Molekularne metode**

Detekcija virusnog genoma je visoko osjetljiva i optimalna metoda kad je količina virusa mala te ju nije moguće detektirati u staničnoj kulturi ili kad su rezultati brzo potrebni. Nukleinska kiselina adenovirusa detektirana je u gotovo svim kliničkim uzorcima te odabir uzorka ovisi o zahvaćenom organu, odnosno pratećim simptomima (3).

U posljednje vrijeme sve prihvaćenija metoda za detekciju adenovirusa je PCR, konvencionalni ili u realnom vremenu (eng. *real time-polymerase chain reaction; real time-PCR*). Osjetljivost molekularnih metoda je poput izolacije u staničnoj kulturi, ako nije i veća. Danas postoje brojne PCR metode dizajnirane za identifikaciju infekcije adenovirusom. One su bazirane na amplifikaciji segmenata smještenih u konzerviranim regijama genoma pa su tako neke od dosad češće korištenih početnica bile one: u regiji hekson gena (86-89), gena vlaknastog izdanka (90, 91), pIX gena (92) ili VA RNA gena (93). Najčešće se u PCR-u koristi konzervirana regija hekson gena (86-89).

Moguće je detektirati jednu ili više komponenti genoma, odnosno vrstu (A-F) adenovirusa (91, 93) ili dokazati rod adenovirusa u kliničkom uzorku komercijalno dostupnim panelom za dokaz respiratornih virusa (94). Za izvođenje konvencionalnog PCR-a obično treba 1-2 dana. *Real time-PCR* omogućava amplifikaciju određenih virusnih gena i njihovu detekciju unutar nekoliko sati (89, 95).

Allard i sur. (87) opisali su tehniku koja amplificira segment od 308 bp smješten u P1 regiji hekson gena. Hekson gen sastoji se od tri različite regije: središnje varijabilne regije sa sedam hipervarijabilnih regija i dvije visoko konzervirane regije s obje strane središnje regije (3). U odnosu na izolaciju virusa u staničnoj kulturi osjetljivost

ove metode bila je 93% za vrstu C adenovirusa (tipovi 1, 2, 5, 6), ali samo 50% za vrstu B1 (tipovi 3 i 7) koja je osobito povezana s infekcijama dišnog sustava (96). Hierholzer i sur. (86) opisali su PCR metodu koja amplificira segment od 161 bp smješten u P2 regiji hekson gena u kombinaciji s *in situ* hibridizacijom s probom obilježenom fluoresceinom. U studiji koju su proveli Raty i sur. (88) uspoređivane su metode detekcije adenovirusa u 268 nazofaringealnih uzoraka vojnih ročnika sa simptomima ARI. Izolacijom virusa u staničnoj kulturi bilo je 59,1% pozitivnih uzoraka, 31,9% pozitivnih bilo je utvrđeno DFA metodom te 62,9% PCR metodom s početnicama u regiji hekson gena. U odnosu na izolaciju virusa, osjetljivost PCR-a bila je 94%, a specifičnost 85% (88). U studiji Vabret i sur. (93) uspoređivane su različite molekularne metode detekcije adenovirusa u 362 uzoraka NFS-a. Osjetljivost metode pod nazivom *Adenovirus Consensus* bila je 97,9%, a specifičnost 93,2%, a za PCR metodu s početnicom u regiji hekson gena osjetljivost je bila 96,9%, a specifičnost 95%. *Adenovirus Consensus* (Argene) test je komercijalno dostupan i koristi početnice u regiji VA RNA gena. Umnožena DNA se zatim hibridizira probom označenom biotinom te vizualizira EIA-om. Omogućuje detekciju adenovirusa i identifikaciju vrste adenovirusa (A-F) direktno u kliničkom uzorku (93). Kidd i sur. (97) su opisali PCR metodu u jednom koraku (eng. *one step*) kojom bi se moglo utvrditi prisutnost adenovirusa u kliničkom materijalu i odrediti vrstu adenovirusa ovisno o profilu restrikcijskih enzima. Veličina amplificiranog segmenta različita je ovisno o vrsti adenovirusa, a razlikuje se prema broju kopija VA RNA gena. Vrste A, B2 i F imaju jednu kopiju VA RNA gena (amplificirani segment veličine 490-520 bp), dok vrste B1, C, D i E adenovirusa imaju po dvije kopije (amplificirani segment veličine 240-290 bp). Za razlikovanje tih dviju grupa koristili su profile restrikcijskih endonukleaza i od 200 izolata virusa samo 3% rezultata nije bilo u skladu s rezultatima NT-a (97).

Allard i sur. (98) su opisali PCR metodu koristeći početnice na konzerviranu regiju hekson gena nakon čega su primjenom restrikcijskih endonukleaza uspjeli odrediti 51 tip adenovirusa i 44 varijante tipova.

Općenito, potrebno je više od jednog seta početnica i nekoliko proba za detekciju tipa adenovirusa. Neke grupe istraživača razvile su višestruke setove početnica (*eng. multiplex PCR*) koje na temelju gena vlaknastog izdanka mogu identificirati vrstu (A-F) adenovirusa (90, 91), a drugi samo za identifikaciju vrste B, C ili D (38). U istraživanju Xu i sur. (90) uočeno je da se primjenom početnica koje se temelje na regiji hekson gena ne postiže zadovoljavajuća amplifikacija tipova 11, 21, 34 i 35 adenovirusa (B vrste) te su zaključili da primjena početnica na regije gena vlaknastoga nastavka daje jednake rezultate za sve vrste (A-F) adenovirusa (90). Pehler-Harrington i sur. (91) su kasnije razvili multiplex-PCR imunoenzimsko-hibridizacijski test, pod nazivom *Adenoplex*, koji koristeći početnice na gen vlaknastog izdanka omogućuje identifikaciju šest vrsta adenovirusa (A-F) u jednom koraku. Umnožena DNA se hibridizira sa specifičnim probama za vrstu koje su označene biotinom i vizualizira EIA-om. U istraživanje su uključili 150 nazofaringealnih obrisaka u kojima su detektirali prisutnost dvanaest uobičajenih uzročnika (bakterija i virusa) infekcija dišnog sustava i nisu zabilježili niti jednu ukriženu reakciju. Osjetljivost i specifičnost *Adenoplexa* u odnosu na izolaciju adenovirusa u staničnoj kulturi bile su 100%. Metoda je brza, osjetljiva i specifična u identifikaciji vrste A-F adenovirusa, a rezultati dostupni za 5 sati (91).

### **1.8.2 Neizravna dijagnostika**

Neizravnom virološkom dijagnostikom tj. serološkim metodama (RVK, EIA i NT) mogu se dokazati specifična protutijela u serumu bolesnika. Četverostruki porast razine specifičnih protutijela ili serokonverzija između akutnog i konvalescentnog uzorka seruma upućuje na aktivnu adenovirusnu infekciju (38). Nedostatak ovih metoda je da su one retrospektivne te su stoga od malog kliničkog značaja.

## **1.9 Liječenje**

Za sada nema specifičnog antivirusnog lijeka za adenovirusnu infekciju. Na sreću većina adenovirusnih infekcija je asimptomatska ili relativno blage naravi. Ozbiljnija stanja koja zahtijevaju primjenu odgovarajućeg liječenja su pneumonija i epidemijski keratokonjunktivitis te pojava adenovirusne infekcije u imunokompromitiranih bolesnika (38).

Neki dosad poznati antivirusni lijekovi, kao što su cidofovir i ribavarin pokazali su djelotvornost *in vitro*, no dosadašnja klinička istraživanja nisu dala obećavajuće rezultate, posebno po pitanju neškodljivosti primjene (99, 100). Međutim, cidofovir, sam ili u kombinaciji s ribavarinom, primjenjuje se u imunokompromitiranih bolesnika i prema rezultatima retrospektivnih studija čini se da ipak kontrolira adenovirusnu infekciju (99-101).

Do pred 15-ak godina postojalo je oralno živo cjepivo protiv tipova 4 i 7 adenovirusa koje se primjenjivalo isključivo u vojnih ročnika u SAD-u i nije bilo namijenjeno za primjenu u civilnog stanovništva (38, 102). Oba tipa adenovirusa se nalaze u kapsuli koja se uzima na usta, čime se zaobilazi dišni sustav. Virus se umnožava u crijevnom epitelu te se stvori dobar neutralizirajući imunitet, a infekcija prolazi asimptomatski (102). Proizvodnja cjepiva privremeno je zaustavljena 1996. godine. Međutim, nakon prekida cijepljenja uočeno je da je prevalencija bolesti u vojnih ročnika ponovno dosegla vrijednosti kao i prije ere cijepljenja. Zbog ponovne pojave ARI u vojnih ročnika uzrokovanih tipovima 4 i 7 adenovirusa odlučeno je da se ponovno razvije cjepivo (65, 103). Međutim, prema posljednjim podacima ono još nije odobreno u SAD-u.

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA**

### **2.1 Ciljevi istraživanja**

ARI su vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta u djece u svijetu, a adenovirus je jedan od značajnijih uzročnika virusnih ARI s prevalencijom 2-7% u djece mlađe od 5 godina (45, 53). U rutinskoj kliničkoj praksi obično se samo dokaže prisutnost adenovirusa u kliničkom uzorku, a daljnja identifikacija tipa virusa se ne izvodi. Dokaz adenovirusa koristan je u trenutku odlučivanja o početku antimikrobne terapije, dok je identifikacija tipa, odnosno vrste adenovirusa važna za epidemiološke svrhe. Virološke, epidemiološke i kliničke osobitosti ARI uzrokovanih adenovirusima u djece u Hrvatskoj nisu praćene od 1981. godine.

Stoga su postavljeni sljedeći ciljevi ovog istraživanja:

1. utvrditi raspodjelu pojedinih tipova, odnosno podskupina/vrsta adenovirusa koji uzrokuju ARI u djece do 10 godina starosti u Zagrebu i okolici (Grad Zagreb i Zagrebačka županija)
2. odrediti raspodjelu određenih tipova, odnosno podskupina/vrsta adenovirusa po dobi i spolu djece
3. odrediti pojavnost određenih tipova, odnosno podskupina/vrsta adenovirusa tijekom godine, odnosno njihove sezonske varijacije
4. opisati kliničke osobitosti adenovirusnih infekcija dišnog sustava ovisno o tipu, odnosno podskupini/vrsti adenovirusa
5. odrediti prosječne vrijednosti sedimentacije eritrocita (SE), CRP-a i leukocita kod adenovirusnih infekcija dišnog sustava.

## **2.2 Hipoteza**

Hipoteze ovog istraživanja su:

1. udio pojedinih tipova, odnosno podskupina/vrsta adenovirusa među adenovirusnim infekcijama dišnog sustava u djece do 10 godina starosti u Zagrebu i okolici (Grad Zagreb i Zagrebačka županija) ne razlikuje se u odnosu na njihovu raspodjelu u drugim područjima svijeta s umjerenom klimom
2. fluktuacija određenih tipova, odnosno podskupina/vrsta adenovirusa postoji na godišnjoj kao i sezonskoj razini.

## 3. MATERIJAL I METODE

### 3.1 Ispitanici i klinički materijal

Istraživanje je obuhvatilo 290 ispitanika - djece u dobi do 10 godina starosti s dokazanom adenovirusnom infekcijom dišnog sustava. Ispitanici su regrutirani od djece koja su u razdoblju od 01. siječnja 2006. do 30. studenog 2008. godine stigla u hitnu ambulantu Klinike za dječje bolesti, Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ (KBC-a „Sestre milosrdnice“) te Klinike za infektivne bolesti „dr. Fran Mihaljević“ sa simptomima ARI. U istraživanje su bila uključena djeca u čijem je kliničkom materijalu dokazan adenovirus DFA metodom te potvrđen izolacijom u staničnoj kulturi.

Istraživanje je provedeno u sklopu projekta MZOŠ br. 005-0053443-3447 pod naslovom *Virusne infekcije dišnog sustava* voditeljice prof. dr. Gordane Mlinarić Galinović, dr. med., a koji je nastavak projekta broj 005-002 *Uzročnici bolesti koji se šire kapljičnim putem* iste voditeljice. Oba projekta imaju odobrenja Etičkih povjerenstava Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ), Klinike za dječje bolesti, KBC-a „Sestre milosrdnice“ te Klinike za infektivne bolesti „dr. Fran Mihaljević“.

Od svakog djeteta prikupljeni su osnovni demografski podaci (dob, spol), uputna dijagnoza i klinički materijal.

Klinički materijal za dijagnostiku adenovirusa za sve ispitanike bio je NFS dobiven aspiracijom prema postupku opisanom od Mlinarić-Galinović i Grljušić (104). Obrada uzoraka vršena je u Odjelu za virologiju HZJZ-a. Odmah nakon prispjeća materijala, a najkasnije u roku od 24 sata, pristupalo se obradi uzoraka, s ciljem brze dijagnostike adenovirusa DFA metodom. Dio materijala u kojem je DFA metodom dokazana prisutnost adenovirusa razrijeđen je s jednakom količinom transportnog

medija (Hanksova otopina soli) te je zatim pohranjen na  $-70^{\circ}\text{C}$  do testiranja, odnosno do inokulacije u HeLa staničnu kulturu.

## **3.2 Mikrobiološka dijagnostika infekcije adenovirusom**

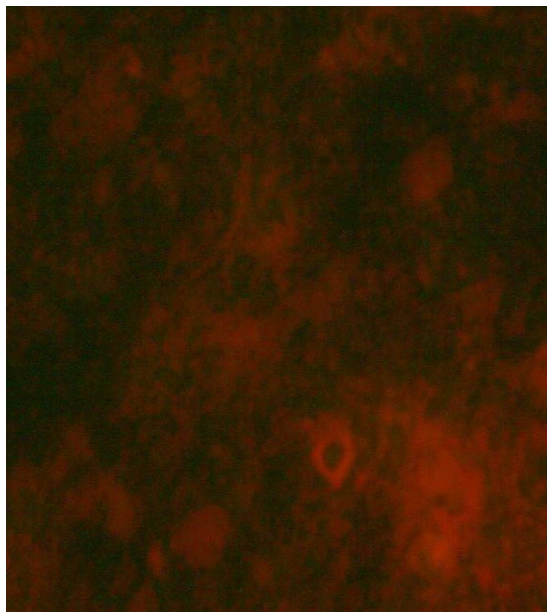
### **3.2.1 Dokaz adenovirusa**

Dokaz adenovirusa u sedimentu NFS-a izvođen je pomoću komercijalnih MAbs-a DFA metodom, prema uputama proizvođača (*Light Diagnostic*, Chemicon International, Inc., Temecula, Kalifornija).

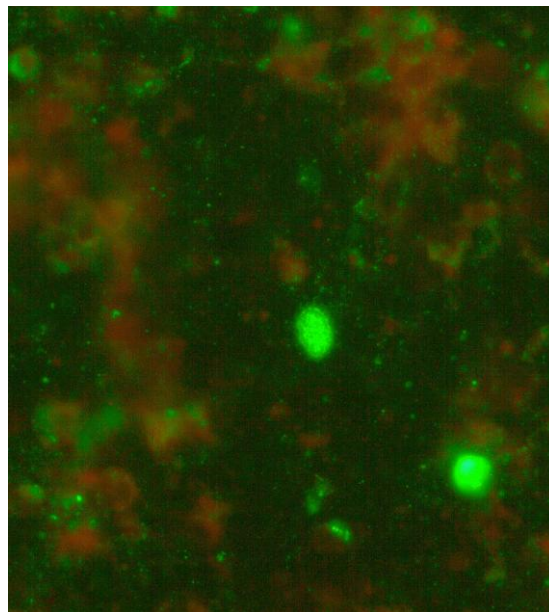
Postupak: klinički materijal (NFS) je resuspendiran s 2-3 ml PBS-a te je centrifugiran na 1500 okretaja/min. kroz 10 min. kako bi se dobio sediment koji je nakapan na predmetno stakalce. Nakon što su se stanice osušile fiksirane su hladnim acetonom tijekom 10 min. Fiksirane stanice su inkubirane s mišjim MAbs-ima označenim fluoresceinom na  $37^{\circ}\text{C}$  kroz 30 minuta, a zatim je slijedilo ispiranje (3x5 minuta u PBS-u). Na kraju je stakalce osušeno te uklopljeno pokrovnim stakalcem i glicerolom. Ako je adenovirus prisutan fluoresceinom označeni MAbs-i su se vezali za virus (slika 5). Za vizualizaciju smo koristili fluorescentni mikroskop (Olympus) i povećanje 400 puta. Pozitivan nalaz je prisutnost najmanje dvije neoštećene stanice s vidljivim inkluzijskim tjelešcima (slika 5).



**Slika 5. Izravna imunofluorencija za adenovirus iz nazofaringealnog sekreta**  
Preparat je učinjen u Odjelu za virologiju, HZJZ. Fotografiran je u Zavodu za javno zdravstvo „dr. Andrija Štampar“, Zagreb, ljubaznošću prof. dr. sc. J. Vraneš.



Izravna imunofluorencija za adenovirus: negativan nalaz



Izravna imunofluorencija za adenovirus: pozitivan nalaz

### **3.2.2 Izolacija u staničnoj kulturi**

Izolacija adenovirusa izvodila se u HeLa staničnoj kulturi (linija stanica karcinoma vrata maternice, ATCC CCL-2, Manassas, Virginia, SAD; Lot: 2619582) u inkubatoru na +37°C. Uzgoj i infekcija stanica rađena je u laboratoriju drugog stupnja zaštite (eng. *Biosafety Level 2*) na Odjelu za virologiju HZJZ. HeLa stanice kultivirane su u hranilištu za uzgoj stanica koje sadržava Earlov minimalni osnovni medij (eng. *Minimum Essential Medium*-MEM) s 10% fetalnog telećeg seruma uz dodatak glutamina i natrijhidrogenkarbonata.

Kada su stanice postigle 90-100%-tni rast u sloju (obično 3. dan od nasađivanja) odbacilo se hranilište za uzgoj stanica te se dodalo hranilište za održavanje stanica koje je bilo istog sastava kao i hranilište za uzgoj samo s 2% fetalnog telećeg seruma (1 ml hranilišta za održavanje stanica po epruveti). Sada se u staničnu kulturu inokulirao klinički materijal (NFS), u kojem smo prethodno dokazali prisutnost

adenovirusa DFA metodom. Inokulum je iznosio 0,2 ml obrađenog uzorka za primoinokulaciju, odnosno 0,1 ml za 1. i 2. pasažu (po svakoj epruveti). Svaki je uzorak inokuliran u dvije epruvete. Inokulirana stanična kultura je, u stacionarnoj poziciji ukošenoj za 5°, stavljena u inkubator na +37°C te se inkubirala do najviše 7 dana. Kultura se svakodnevno mikroskopski provjeravala do pojave CPU te se zabilježeno očitavalo kao udio zahvaćenih stanica (1+: do 25% stanica, 2+: 25-50%, 3+: 50-75%, 4+: 75-100%; toksičnost ili raspucali sloj tj. degeneracija stanica ili infekcija). Ako je došlo do zakiseljenja hranilišta (promjene boje hranilišta u žutu boju), da bi se spriječilo propadanje stanica, hranilište za održavanje stanica mijenjalo se svaka 3-4 dana.

Epruvete s 3+ ili 4+, tj. s više od 50% promijenjenih stanica, pohranjene su na minus 70°C. Ostale epruvete su nakon inkubacije od 7 dana također zamrznute na -70°C. Pasaže materijala su rađene tako da je nakon odmrzavanja pomiješan sadržaj dviju epruveta od istog uzorka i iz mješavine je inokulirano 0,1 ml u svježu staničnu kulturu. Svi su uzorci prošli kroz dvije pasaže u staničnoj kulturi kako bi se postigao dovoljno visoki titar virusa za tipizaciju.

### **3.2.3 Tipizacija virusa - neutralizacijski test**

Kad je na temelju karakterističnog CPU potvrđeno da se radi o adenovirusu, pristupilo se određivanju tipa adenovirusa. Princip NT-a se sastoji u tome da se primjenom tipno-specifičnih hiperimunih seruma neutralizira virus te u staničnoj kulturi izostane karakteristični CPU. Hiperimuni serumi pripremljeni su u kunićima i liofilizirani u *Central Public Health Laboratory* u Londonu. Korišteni su hiperimuni serumi za tipove 1-7 te tip 14 adenovirusa. Liofilizirani serumi razrijeđeni su puferiranom fiziološkom otopinom prema titru preporučenom od proizvođača.

Tipizacija je izvedena u HeLa staničnoj kulturi u mikrotitarskoj pločici u CO<sub>2</sub> inkubatoru na +37°C. Mikrotitarska pločica obilježena je prema prethodno nacrtanoj

radnoj listi (tablica 5). Nakon prethodno učinjene titracije virusa pripremljeno je radno razrijeđenje (100 TCID<sub>50</sub>) u pomoćnim epruветama. Zatim je u svaku jažicu dodano po 50 µl svakog seruma (za tipove 1-7 i 14 adenovirusa) po stupcima (1-8). Za svaki virus korištena su po dva reda (redovi A-H; vidi tablicu 5). Potom je dodano po 50 µl hranilišta (MEM+HEPES) u dvije jažice na kraju svakog reda za kontrolu virusa te po 100 µl hranilišta u 4 jažice za kontrolu stanica (tablica 5). U odgovarajuće jažice (1-10) svakog reda dodano je po 50 µl radnog razrijeđenja svakog virusa. Nakon toga se pločica pokrila i inkubirala u CO<sub>2</sub> inkubatoru na +37°C kroz 1 h. Za to su vrijeme stanice tripsinizirane i napravljena je suspenzija gustoće oko 1,5x10<sup>5</sup>/ml. Po završetku inkubacije u svaku jažicu testa i kontrole dodano je po 100 µl suspenzije stanica. Pojava CPU u mikrotitarskim pločicama svakodnevno se provjeravala pod kontrolom invertnog svjetlosnog mikroskopa. Karakteristični CPU obično bi se javio nakon 2-3 dana. Tip virusa odgovarao je onom tipu hiperimunog seruma koji je u mješavini serum-virus neutralizirao pojavu karakterističnog CPU-a te u staničnoj kulturi nije došlo do umnožavanja virusa i pojave CPU-a.

**Tablica 5. Shematski prikaz rezultata neutralizacijskog testa (primjer radne liste)**

Radno razrijeđenje virusa (100 TCID <sub>50</sub> )		Tipno-specifični serum								Kontrola				rezultat
		1	2	3	4	5	6	7	14	KV	KV	KS	KS	
Virus br. 1	A	4+	4+	0	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0	0	adenovirus tip 3
	B	4+	4+	0	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0	0	
Virus br. 2	C	4+	0	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0	0	adenovirus tip 2
	D	4+	0	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0	0	
Virus br. 3	E	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0	4+	4+	4+	0	0	adenovirus tip 7
	F	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0	4+	4+	4+	0	0	
Virus br. 4	G	0	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0	0	adenovirus tip 1
	H	0	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0	0	

(kratice: KV= kontrola virusa; KS= kontrola stanica)

### **3.2.4 Molekularne metode**

Izolacija nukleinske kiseline rađena je u Odjelu za molekularnu dijagnostiku i BSL 3/4, Službe za mikrobiologiju HZJZ-a, metodom *real time*-PCR koristeći komercijalno dostupan *Adenovirus Consensus* kit (Argene, Francuska) prema uputama proizvođača.

Ovom su metodom testirani izolati adenovirusa bolesnika koji su hospitalizirani i koji su imali neodređeni rezultat tipizacije u prethodno učinjenom NT-u. Nukleinska kiselina virusa (DNA) izolirana je iz uzorka izoliranih adenovirusa u staničnoj kulturi koristeći kit za izolaciju *Adenovirus Consensus Extraction Kit* proizvođača Argene iz Francuske. U 200 µl uzorka dodano je 20 µl proteaze i 200 µl pufera (komercijalna otopina u kitu) i inkubirano na 56°C kroz 10 minuta. Zatim je dodano 200 µl etanola te je cijela smjesa prebačena u filter kolonu. Potom je slijedilo ispiranje uzoraka u kolonama u tri koraka dodavanjem odgovarajućeg pufera (po 500 µl) u svakom koraku (komercijalne otopine dostupne u kitu) te centrifugiranjem po svakom koraku na 6000-13000 okretaja/min, kroz 1-3 minute. Nukleinska kiselina se adsorbirala na silika-gel kolone dok se proteini i ostali stanični debris odvojio tijekom višestrukih ispiranja. U zadnjem koraku se ispirala nukleinska kiselina pomoću 80 µl elucijskog pufera (komercijalna otopina u kitu). Izolirana nukleinska kiselina, pročišćena od proteina, nukleaza i drugih onečišćivača, do daljnje obrade čuvala se na -20°C.

Za umnožavanje nukleinske kiseline korišten je *real time*-PCR i *Adenovirus Consensus Amplification Kit* (Argene, Francuska). Protokol za umnožavanje odnosi se isključivo na korišteni kit. Prema uputama proizvođača pripravljena je mješavina za umnožavanje volumena 50 µl i sljedećeg sastava: 5 µl izolirane DNA ili pozitivne kontrole (komercijalno dostupne u kitu) ili sterilne vode kao negativne kontrole i 45 µl reakcijske smjese [40 µl mješavine za umnožavanje ili kontrole inhibicije

(komercijalno dostupne u kitu) te 5  $\mu$ l razrijeđenog *HotStarTaq*, (Qiagen, Francuska)]. Program za umnožavanje naveden je u tablici 6. Umnožavanje i detekcija učinjene su pomoću aparata ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, SAD). Do daljnje analize PCR produkt pohranjen je na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

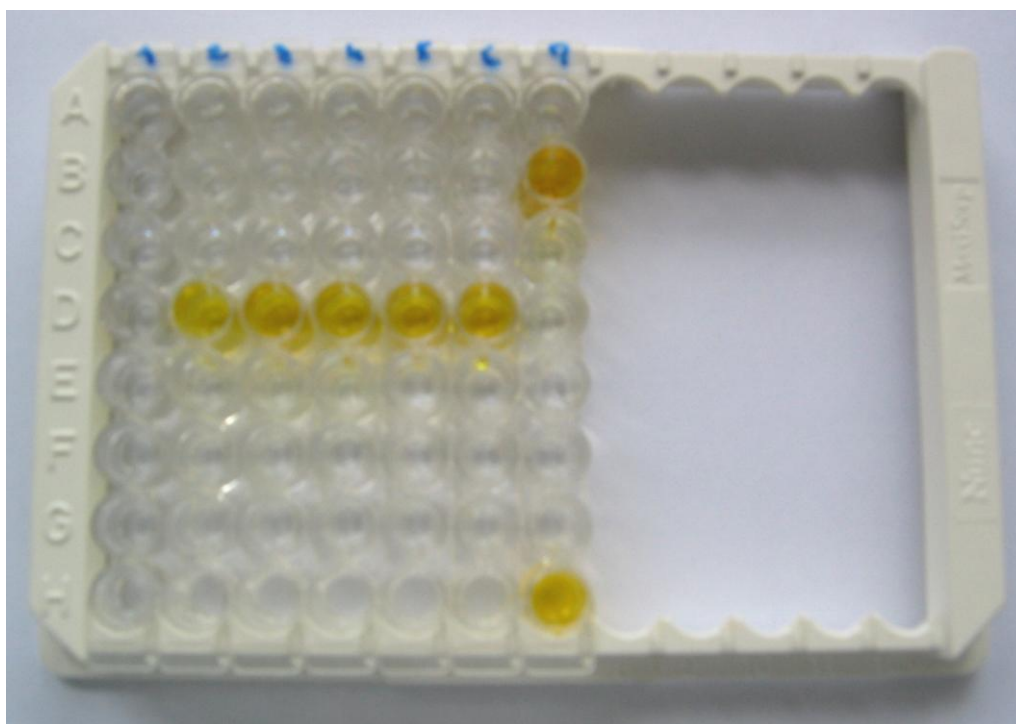
**Tablica 6. Program za umnožavanje (amplifikaciju)**

Broj ciklusa	Temperatura	Trajanje ciklusa
1 ciklus	$95^{\circ}\text{C}$	15 minuta
Kroz 10 ciklusa smanjivanje annealing temperature za po $1^{\circ}\text{C}$ od $65^{\circ}\text{C}$ do $56^{\circ}\text{C}$	$94^{\circ}\text{C}$ $65^{\circ}\text{C}$ $72^{\circ}\text{C}$	10 sekundi 30 sekundi 30 sekundi
30 ciklusa	$94^{\circ}\text{C}$ $65^{\circ}\text{C}$ $72^{\circ}\text{C}$	10 sekundi 30 sekundi 30 sekundi
1 ciklus	$72^{\circ}\text{C}$	2 minute
hlađenje	$4^{\circ}\text{C}$	neodređeno

Detekcija vrste adenovirusa u PCR produktu određena je metodom hibridizacije u mikrotitarskoj pločici. Nakon umnožavanja svaki PCR produkt (5  $\mu$ l) i odgovarajuće pozitivne i negativne kontrole (po 5  $\mu$ l) kemijski su denaturirani dodatkom 2 x 10  $\mu$ l dviju denaturacijskih otopina (komercijalno dostupnih otopina u kitu) te 200  $\mu$ l otopine za oblaganje (eng. *coating solution*, komercijalno dostupna otopina u kitu). Zatim se po 100  $\mu$ l od svake mješavine rasporedilo u jažice u mikrotitarskoj pločici prema pripremljenoj shemi i inkubiralo na  $+37^{\circ}\text{C}$  kroz 1 sat. Potom je učinjena hibridizacija dodatkom odgovarajućih biotinom označenih grupno-specifičnih, odnosno za vrstu specifičnih proba (100  $\mu$ l/jažici) koje odgovaraju vrsti A, B1, B2, C, D, E, odnosno F adenovirusa (komercijalno dostupnih otopina u kitu), uz inkubaciju na  $+37^{\circ}\text{C}$ , kroz 30 minuta. Kod svakog izvođenja testa korištena je negativna

kontrola umnožavanja pripravljena od sterilne vode te negativna detekcijska kontrola (umnoženi produkt humanog porijekla komercijalno dostupan u kitu). Detekcija je izvršena nakon višestrukih posthibridizacijskih ispiranja (otopina za ispiranje komercijalno je dostupna u kitu) dodatkom streptavidin peroksidaza konjugata (100 µl po svakoj jažici) i inkubacijom na sobnoj temperaturi kroz 15 minuta. Zatim je opet proveden prethodno spomenut postupak ispiranja te je dodano po 100 µl u svaku jažicu tetrametilbenzidin supstrata (komercijalno dostupan u kitu) i inkubirano u mraku na sobnoj temperaturi, kroz 30 minuta. Na kraju je u svaku jažicu dodano po 100 µl stop otopine (komercijalno dostupna otopina u kitu) te je izvršeno očitavanje intenziteta reakcije na spektrofotometru 450/650 nm valne dužine (slika 6).

**Slika 6. Prikaz rezultata identifikacije vrste adenovirusa metodom *Adenovirus Consensus* (rađeno u Službi za mikrobiologiju, HZJZ)**



(Redovi A-G: specifične probe za vrste A, B1, B2, C, D, E i F adenovirusa; stupac 1: negativna kontrola, stupci 2-7 uzorci – PCR produkti; red H/stupac 7: pozitivna kontrola)

### **3.3 Kliničko-laboratorijske metode**

Za ispitanike s dokazanom adenovirusnom infekcijom dišnog sustava kojima je određen tip/vrsta adenovirusa i koji su bolnički liječeni prikupljeni su klinički parametri prema anketnom obrascu (tablica 7). Vitalne funkcije (frekvencija disanja i puls) mjereni su u snu djeteta, a ako je dijete dobivalo kisik, vitalne funkcije su mjerene nakon što je 10 minuta bilo bez kisika. Elementi kompletne krvne slike određeni su u automatskom brojaču Sysmex XT-1800 i Sysmex XT-2000. Brzina sedimentacije eritrocita (SE) određena je prema Westergren metodi. CRP je određen imunoprecipitacijski, mjereno turbidimetrijskom metodom ili nefelometrijskom metodom (Olympus i Dade Behring). Saturacija kisika u perifernoj arterijskoj krvi mjerena je perkutanom pulsoksimetrom. Vrijednosti vitalnih funkcija i krvne slike uspoređene su sa standardnim vrijednostima za dob djeteta (105, 106).

Izolacija bakterija iz brisa ždrijela i nazofarinksa učinjena je standardnim mikrobiološkim postupcima na obogaćenim hranjivim podlogama (107, 108). Izolacija *Streptococcus pyogenes* učinjena je na krvnom agaru s dodatkom 5% ovčje krvi, a identifikacija prema testu inhibicije rasta u odnosu na glukozni, odnosno bacitracinski disk i/ili koaglutinacijom. Bakterije iz nazofarinksa izolirane su na krvnom agaru s dodatkom 5% konjske krvi uz dodatak kolistin/vankomicin diska i stafilokokne linije.



**Tablica 7. Anketni upitnik za prikupljanje kliničkih podataka**

<b>A. OPĆI I ANAMNESTIČKI PODACI</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. ime i prezime</li> <li>2. datum rođenja</li> <li>3. spol</li> <li>4. trajanje bolničkog liječenja (u danima)</li> </ol>
<b>B. SIMPTOMI I FIZIKALNI NALAZI</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. najviša tjelesna temperatura u °C</li> <li>2. trajanje febriliteta</li> <li>3. febrilne konvulzije</li> <li>4. kašalj</li> <li>5. iscjedak iz nosa</li> <li>6. nalaz na ždrijelu (b.o., kataralno, crveno)</li> <li>7. nalaz na tonzilama (b.o., kataralne, crvene, eksudat)</li> <li>8. limfni čvorovi vrata (b.o., povećani)</li> <li>9. nalaz na očima (b.o., injicirane konjunktive, sekret)</li> <li>10. nalaz na uhu (b.o., skraćen refleks, crven)</li> <li>11. probavne smetnje (proljevanje, povraćanje)</li> </ol>
<b>C. LABORATORIJSKI NALAZI</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. sedimentacija eritrocita (SE)</li> <li>2. C-reaktivni protein (CRP)</li> <li>3. kompletna krvna slika (KKS)</li> <li>4. najniži % saturacije O<sub>2</sub></li> <li>5. bakteriološki nalaz obrisak ždrijela i/ili nazofarinksa</li> <li>6. rentgenski nalaz pluća (b.o., hiperinflacija, bronhi ispunjeni sekretom, peribronhalni infiltrat, inhomogeni pneumonični infiltrat, intersticijska pneumonija)</li> </ol>
<b>D. LIJEČENJE</b> (samo antipiretik, antibiotik, selektivni agonisti beta-2 receptora, racemični epinefrin, kortikosteroidi, nadoknada kisika, umjetna respiracija)
<b>E. KONAČNA DIJAGNOZA</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. infekcije gornjeg dišnog sustava (IGDS):             <ul style="list-style-type: none"> <li>– respiratorni katar - RK (<i>rinitis, rinofaringitis, faringitis, faringokonjunktivitis, tonzilitis, eksudativni tonzilitis</i>)</li> <li>– upala srednjeg uha (lat. <i>otitis media acuta - OMA</i>)</li> <li>– infekcije oka (<i>konjunktivitis</i>)</li> <li>– krup (<i>laringitis, laringotraheitis</i>)</li> </ul> </li> <li>2. infekcije donjeg dišnog sustava (IDDS):             <ul style="list-style-type: none"> <li>– bronhitis</li> <li>– bronhiolitis</li> <li>– pneumonija</li> </ul> </li> </ol>

### **3.4 Statistička analiza podataka**

Učestalost pojedinog tipa, odnosno vrste adenovirusa određena je kao postotak djece s ARI-jem koja su imala dokazanu infekciju određenim tipom, odnosno vrstom adenovirusa s pripadajućim granicama pouzdanosti prema Waldovoj metodi.

Kontinuirane varijable testirane su analizom varijance (ANOVA), a dihotomizirane varijable logističkom regresijom.

Osnovne kliničke osobitosti ARI uzrokovanih različitim tipovima adenovirusa u djece prikazane su grafički i tablično. Statistička značajnost određena je Kruskal Wallis,  $\chi^2$  testom i testom razlike proporcija na razini značajnosti 95% (109).

Unos i obrada podataka provedeni su pomoću slijedećih programskih paketa: NCSS-a i MedCalc 7.0 for WINDOWS.

## 4. REZULTATI

### 4.1 Ispitanici i tipovi, odnosno vrste adenovirusa

U razdoblju od 1. siječnja 2006. do 30. studenog 2008. godine adenovirusna infekcija dokazana je u 291 kliničkom materijalu metodama DFA i izolacije u staničnoj kulturi. Dva klinička materijala pripadala su istom djetetu i uzeta su u razmaku od jednog dana te je ovaj bolesnik prilikom određivanja učestalosti virusa obrađen kao jedna adenovirusna infekcija. Od ukupno 290 ispitanika u hitnoj ambulanti Klinike za infektivne bolesti obrađeno je 255 (87%) ispitanika, a u hitnoj ambulanti KBC-a „Sestre milosrdnice“ Klinike za dječje bolesti 35 (13%) ispitanika.

U ovom je istraživanju bilo 201/290 (69%) djece muškog spola i 89/290 (31%) djece ženskog spola.

Tip 2 adenovirusa izoliran je u 162/290 (56%; 95% CI: 50,1-61,5) bolesnika, zatim tip 1 u 49/290 (17%; 95% CI: 13,0-21,7) bolesnika, tip 3 u 40/290 (14%; 95% CI: 10,3-13,3) bolesnika, tip 6 u 3/290 (1%; 95% CI: 0,02-3,1) bolesnika te je bio po jedan bolesnik s infekcijom uzrokovanom tipom 5 (0,5%; 95% CI: 0,07-2,1), odnosno tipom 7 (0,5%; 95% CI: 0,07-2,1) adenovirusa. Među izolatima adenovirusa bilo je 34/290 (11%; 95% CI: 8,5-16,0) s neodređenim rezultatom tipizacije u NT-u. Za izolate s neodređenim rezultatom tipizacije u NT-u i dostupnim kliničkim podacima (14/34) određena je vrsta virusa molekularnom metodom *Adenovirus Consensus* i svi su bili vrste C adenovirusa. Od ukupno 270 izolata s određenom vrstom adenovirusa bio je 41 izolat vrste B (15,2%; 95% CI: 11,4-20,0) i 229 vrste C adenovirusa (84,8%; 95% CI: 80,0-88,6). Dakle, za 270 bolesnika bila je određena uzročna vrsta adenovirusa, dok je tip adenovirusa određen u 256 bolesnika. Od ukupno 290 izolata adenovirusa 20 (7%; 95% CI: 4,5-10,5) je bilo neodređenog tipa, odnosno neodređene vrste.

Bolnički je liječeno 135/290 (47%) bolesnika. Od ukupno 135 bolnički liječene djece, u 121 (90%) djeteta bio je određen tip adenovirusa u NT-u. Izolatima virusa hospitalizirane djece kojima NT-om nije bilo moguće odrediti tip adenovirusa određena je vrsta pomoću metode *Adenovirus Consensus*. Ambulantno je obrađeno 155 bolesnika od čega je za 135 (87%) bio određen tip NT-om, odnosno odgovarajuća vrsta adenovirusa. U tablici 8 prikazana je raspodjela tipova i vrsta adenovirusa izoliranih u naših bolesnika.

**Tablica 8. Raspodjela tipova i vrsta adenovirusa u bolesnika s adenovirusnom infekcijom dišnog sustava**

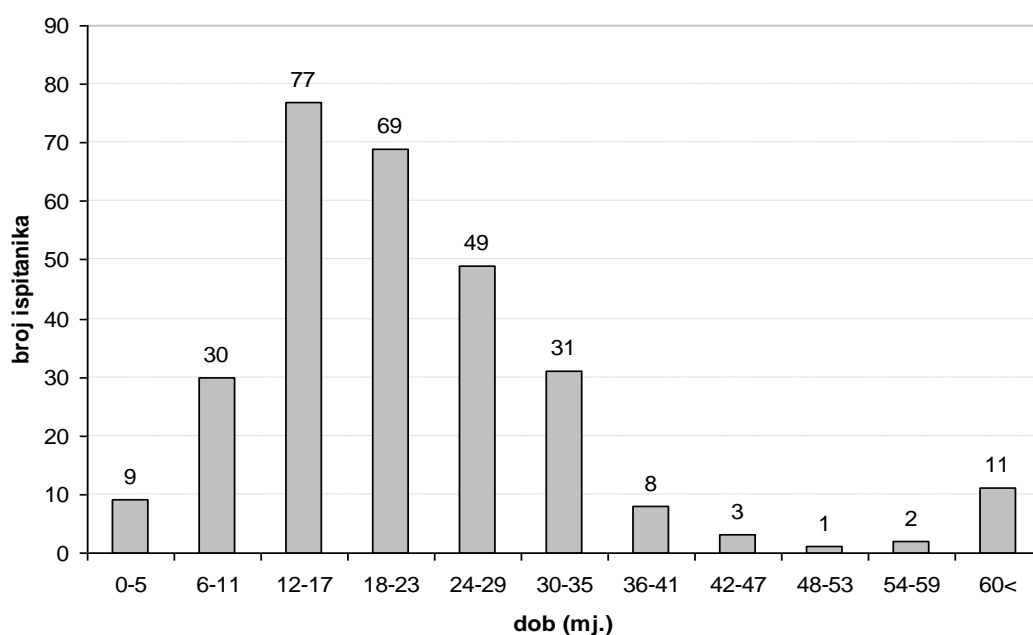
	Tip adenovirusa (n=256)								Vrsta (n=270)	
	1	2	3	4	5	6	7	14	B	C
<b>Ambulantno obrađeni</b>	23	85	25	0	1	1	0	0	25	110
<b>Hospitalizirani</b>	26	77	15	0	0	2	1	0	16	119
<b>Ukupno</b>	49	162	40	0	1	3	1	0	41	229

#### **4.2 Raspodjela prema dobi**

Medijan dobi djece s adenovirusnom infekcijom bio je 20 mjeseci. Srednja dob bila je  $22,4 \pm 16,7$  mjeseci. Najmlađe dijete inficirano adenovirusom bilo je staro mjesec dana, a najstarije 120 mjeseci, raspon dobi svih ispitanika bio je 119 mjeseci. Raspodjela po dobi prikazana je na slici 7.

U dobi do 5 mjeseci bilo je 9/290 (3%) bolesnika, od 6 do 11 mjeseci 30/290 (10%), od 12 do 17 mjeseci 77/290 (27%), od 18 mjeseci do 2 godine 69/290 (24%), od 2 do 3 godine 80/290 (28%) starosti te starijih od 3 godine 25/290 (8%).

**Slika 7. Raspodjela adenopozitivnih bolesnika prema dobi (n=290)**



Broj slučajeva značajno raste u dobi iznad 12 mjeseci te naglo pada nakon navršene 3 godine. Većina djece s adenovirusnom infekcijom dišnog sustava bila je mlađa od 2 godine (185/290, 64%), dok je samo 11/290 (4%) djece bilo starije od 5 godina.

Raspodjela prema dobi i spolu prikazana je u tablici 9 i na slici 8. Osnovna raspodjela prema dobi (<1 god., 1-4 godine i ≥5 godina) učinjena je u skladu s najčešće primjenjivanom raspodjelom u literaturi za infekcije uzrokovane adenovirusima (52). Razlike po dobi i spolu nisu značajne. Većina bolesnika bila je u dobi 12-23 mjeseca s većim udjelom djece muškog spola (m:ž = 2,6:1).

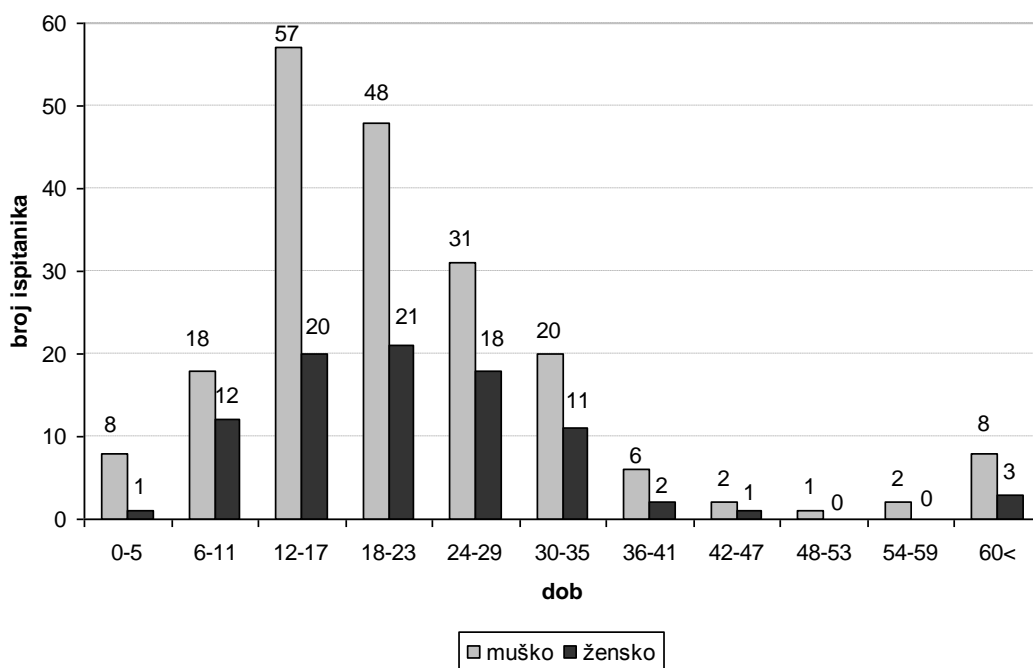
**Tablica 9. Raspodjela adenopozitivnih bolesnika po osnovnim dobnim skupinama i spolu (n=290)**

Dob (godine)	m (%) (95% CI)	ž (%) (95% CI)	Ukupno (%)
<1	26 (8,9) (5,7-12,3)	13 (4,5) (2,1-6,9)	39 (13)
1-4	167 (57,6) (51,9-63,3)	73 (25,2) (20,2-30,2)	240 (83)
≥5	8 (2,8) (0,9-4,7)	3 (1,0) (-0,1-2,1)	11 (4)

$\chi^2=0,197$ ; D.F.=2;  $p=0,9$

(kratice: m=muški spol; ž=ženski spol)

**Slika 8. Raspodjela adenopozitivnih bolesnika prema dobi (mjeseci) i spolu (n=290)**



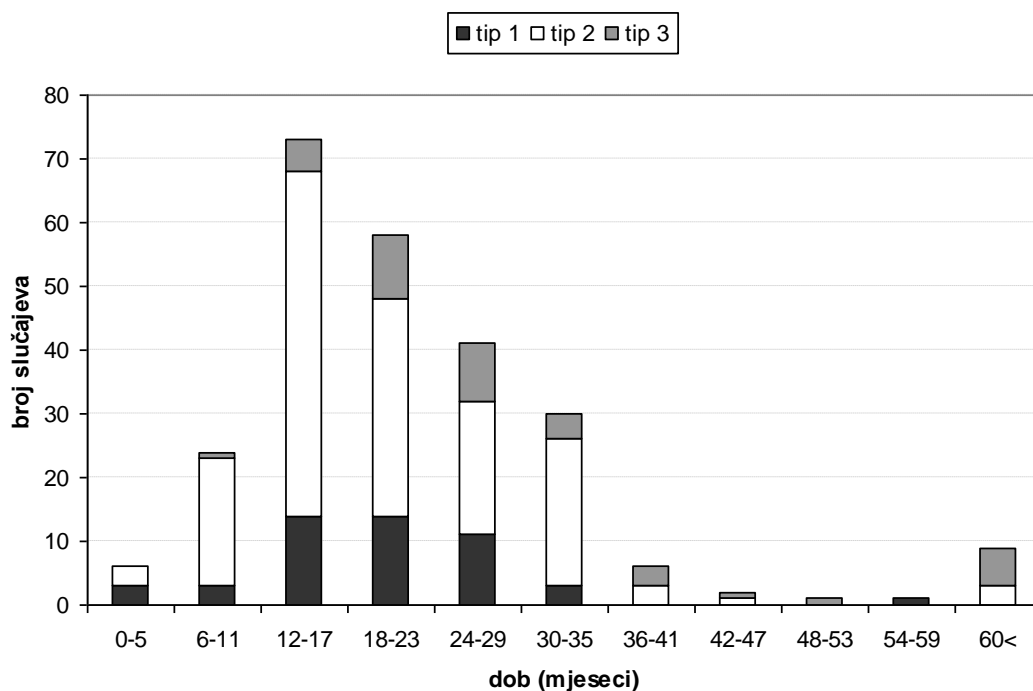
Nađena je statistički značajna razlika u obrascima pojavljivanja određenih tipova (tipovi 1, 2 i 3) adenovirusa u odnosu na dobne skupine ( $p<0,001$ ; tablica 10). Tip 1 adenovirusa izoliran je samo u dojenčadi i djece do 4 godine starosti. Učestalost tipa 1 u dobi 1-4 godine bila je 20% (43/215). Tip 2 adenovirusa bio je općenito najčešće izolirani tip i značajno češće se pojavljivao u dobi 1-4 godine, s učestalošću od čak 63% (136/215). Tip 3 adenovirusa zabilježen u svim dobnim skupinama, a najviše u

djece u dobi 1-4 godine (33/215; 15%). Iako je relativno mali broj bolesnika starijih od 5 godina, uočava se tendencija učestalijeg pojavljivanja tipa 3 u toj dobnoj skupini (6/10; 60%). Učestalost pojedinih tipova adenovirusa po dobi prikazana je na slici 9. Za 34 izolata adenovirusa nije bilo moguće odrediti tip u NT-u.

**Tablica 10. Odnos dobi bolesnika i dokazanog tipa adenovirusa (n=256)**

Dob (godine)	Tip adenovirusa n (%)						Ukupno n (%)
	1	2	3	5	6	7	
<1	6 (19)	23 (74,2)	1 (3,4)	0 (0)	1 (3,4)	0 (0)	31 (12)
1-4	43 (20)	136 (63)	33 (15,5)	1 (0,5)	2 (1)	0 (0)	215 (84)
≥5	0 (0)	3 (30)	6 (60)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	10 (4)
<b>Ukupno</b>	49	162	40	1	3	1	256
$\chi^2=21,412$ ; D.F=4; $p=2,623 \times 10^{-4}$							

**Slika 9. Učestalost tipova 1, 2 i 3 adenovirusa prema dobi bolesnika (n=251)**



Grupe djece s infekcijom uzrokovanom pojedinim tipom (za tipove 1, 2 i 3, Kruskal Wallis test:  $H=9,205$ ;  $p=0,01$ ), odnosno vrstom B i C (Kruskal Wallis test:  $H=10,5899$ ;  $p=0,001$ ) adenovirusa statistički značajno se razlikuju po dobi (tablica 11).

**Tablica 11. Srednje vrijednosti za dob bolesnika prema tipu/vrsti dokazanog adenovirusa**

Dob (mjeseci)	Tip adenovirusa (n=251)			Vrsta (n=270)		Ukupno
	1	2	3	B	C	
raspon	3-54	1-120	8-120	8-120	1-120	1-120
medijan	19,0	18,0	24,0	24,0	18,0	20,0
srednja vrijednost	19,0	20,4	33,9	34,6	20,4	22,4
st. dev.	8,6	14,1	26,7	26,6	13,7	16,7
95% CI	16,5-21,5	18,2-22,6	25,4-42,4	26,2-42,9	18,6-22,2	20,5-24,3
Kruskal Wallis test	$H=9,205$ ; $p=0,01$			$H=10,5899$ ; $p=0,001$		

Od ukupno 290 bolesnika s adenovirusnom infekcijom 34 (12%) je bilo u dojenačkoj dobi (0-11 mjeseci). Među dojenačkom populacijom većinom je izolirana vrsta C (33/34; 97%) adenovirusa. Najmlađe dijete s infekcijom uzrokovanom adenovirusom (tip 2, odnosno vrsta C) bilo je u dobi od mjesec dana. Većina dojenčadi s adenovirusnom infekcijom (27/34; 79%) bila je u dobi 6-11 mjeseci (tablica 12).



**Tablica 12. Učestalost određenog tipa/vrste dokazanog adenovirusa u dojenčadi**

dob (mjeseci)	Tip (n=30)			Vrsta (n=34)	
	1	2	3	B	C
1	0	1	0	0	1
2	0	0	0	0	1
3	1	0	0	0	1
4	0	2	0	0	2
5	2	0	0	0	2
6	1	3	0	0	5
7	1	4	0	0	6
8	0	3	1	1	3
9	1	4	0	0	5
10	0	2	0	0	2
11	0	4	0	0	5
<b>Ukupno</b>	6 (20%)	23 (77%)	1 (3%)	1 (3%)	33 (97%)

Vrsta C adenovirusa najčešće je dokazana vrsta u djece u dobi 1-4 godine (192/225; 84%). Postoji i statistička značajna razlika u pojavnosti vrste B i C adenovirusa u odnosu na dob ( $\chi^2=24,054$ ;  $p<0,001$ ). Odnos dobi bolesnika i dokazane vrste adenovirusa prikazan je u tablici 13.

**Tablica 13. Odnos dobi bolesnika i vrste adenovirusa (n=270)**

Dob (godine)	B (%)	C (%)	Ukupno
<1	1 (3)	33 (97)	34 (13)
1-4	33 (15)	192 (85)	225 (83)
≥5	7 (64)	4 (36)	11 (4)
<b>Ukupno</b>	41	229	270

$\chi^2=24,054$ ; D.F.=2;  $p=5,979 \times 10^{-6}$

S obzirom na potrebu za hospitalizacijom, odnosno ambulantnom obradom, bolesnika s adenovirusnom infekcijom nije uočena razlika u odnosu na dob bolesnika (tablica 14).

**Tablica 14. Raspodjela bolesnika po dobi i načinu obrade**

<b>Dob (godine)</b>	<b>Hospitalizirani (%)</b>	<b>Ambulantno obrađeni (%)</b>	<b>Ukupno (%)</b>
<1	22 (16%)	17 (11%)	39 (13%)
1-4	105 (78%)	135 (87%)	240 (83%)
≥5	8 (6%)	3 (2%)	11 (4%)
<b>Ukupno</b>	<b>135</b>	<b>155</b>	<b>290</b>

$\chi^2=5,31$ ; D.F.=2; p=0,07

### **4.3 Raspodjela prema spolu**

Od ukupno 290 djece 201 (69%) djeteta bilo je muškog spola i 89 (31%) ženskog spola. Odnos muško naprama žensko djeteta bio je 2,25:1. Bila su hospitalizirana 103/135 (76%) djeteta muškog spola i 32/135 (24%) djeteta ženskog spola. Ambulantno je bilo obrađeno 98/155 (63%) muške djece i 57/155 (37%) ženske djece (tablica 15). Odnos muško naprama žensko djeteta u hospitalizirane djece bio je nešto veći nego u ambulantno obrađene djece (3,22:1 naprama 1,72:1).

Među našim bolesnicima djeca muškog spola u odnosu na djecu ženskog spola značajno češće su hospitalizirana (p=0,0226; tablica 15).

**Tablica 15. Raspodjela bolesnika po spolu i načinu obrade (n=290)**

	<b>muško</b>	<b>žensko</b>	<b>ukupno</b>
hospitalizirani	103 (76%)	32 (24%)	135
ambulantno obrađeni	98 (63%)	57 (37%)	155

$\chi^2=5,197$ ; D.F.=1; p=0,0226

Od ukupno 256 izolata adenovirus tip 1 bio je zabilježen u 33/175 (18,5%) muška djeteta, tip 2 u 105/175 (60%) te tip 3 u 33/175 (18,5%).

Infekcija uzrokovana vrstom B adenovirusa dokazana je u 33/185 djeteta muškog spola (18%), a vrstom C adenovirusa u 152/185 (82%) djeteta muškog spola.

Raspodjela tipova, odnosno vrsta dokazanog adenovirusa po spolu prikazana je u tablici 16.

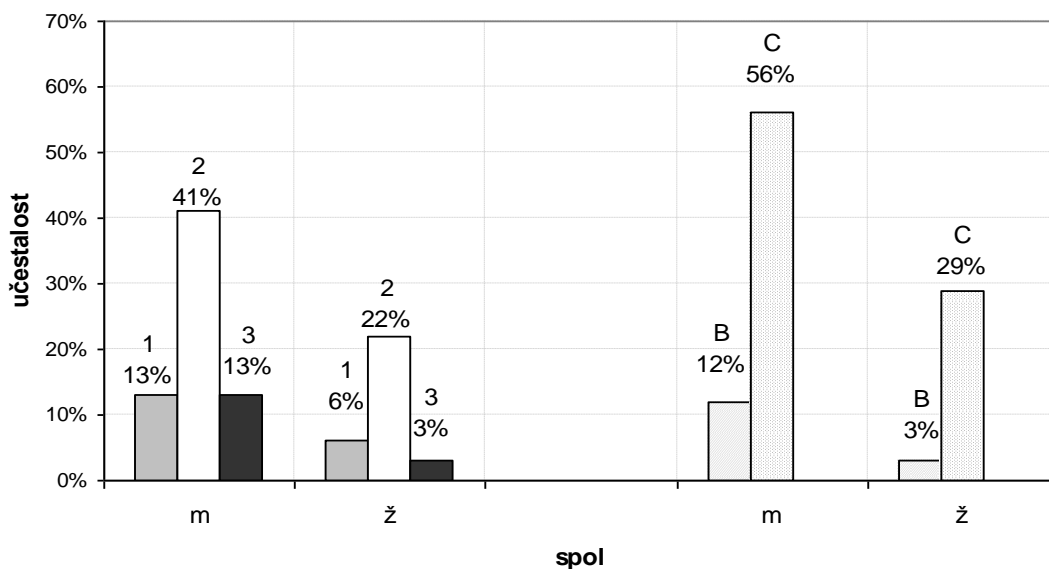
**Tablica 16. Raspodjela tipova, odnosno vrsta adenovirusa prema spolu bolesnika**

Spol	Tip (n=256) n (%)						Vrsta (n=270) n (%)	
	1	2	3	5	6	7	B	C
m	33 (18,5)	105 (60)	33 (18,5)	0 (0)	3 (2)	1 (1)	33 (18)	152 (82)
ž	16 (20)	57 (70)	7 (9)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	8 (9)	77 (91)
<b>Ukupno</b>	49	162	40	1	3	1	41	229

(kratice: m=muški spol; ž=ženski spol)

U istraživanom razdoblju, ARI uzrokovane adenovirusima, neovisno o tipu (1, 2 ili 3) ili vrsti (B ili C) adenovirusa, uvijek su se češće javljale u muške djece (slika 10).

**Slika 10. Učestalost tipova 1, 2 i 3 (n=251) te vrste B i C (n=270) adenovirusa prema spolu bolesnika (kratice: m=muški spol; ž=ženski spol)**



Raspodjela kliničkih dijagnoza u hospitalizirane djece prikazana je u tablici 17. Iako je značajno više djece muškog spola hospitalizirano, nije bilo razlike između spolova u vrsti kliničke prezentacije adenovirusnih ARI u naših bolesnika.

**Tablica 17. Raspodjela kliničkih dijagnoza prema spolu bolesnika (n=133)**

Dijagnoza	m (n=102)	(%)	ž (n=31)	(%)	Ukupno
<b>IGDS</b>					
tonzilitis	63	(61)	16	(51)	79
ET	28	(27)	5	(16)	33
OMA	27	(26)	10	(32)	37
konjunktivitis	10	(9)	1	(3)	11
krup	1	(1)	1	(3)	2
<b>IDDS</b>					
bronhitis i pneumonija	11	(11)	1	(3)	12
<b>GEC</b> (sekundarna dijagnoza)	26	(25)	7	(22)	33

(kratice: m=muški spol; ž=ženski spol; IGDS=infekcije gornjeg dijela dišnog sustava; IDDS=infekcije donjeg dijela dišnog sustava; ET=eksudativni tonzilitis; OMA=*otitis media acuta*; GEC= gastroenterokolitis)

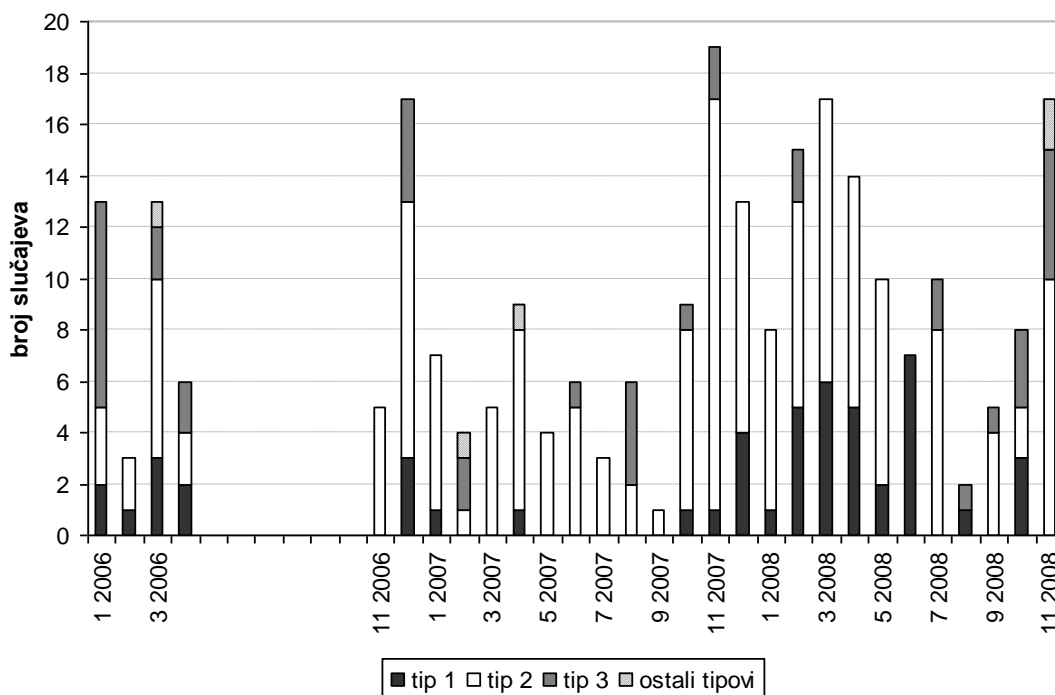
#### 4.4 Sezonske varijacije

Pojavljivanje adenovirusa po mjesecima prikazano je za razdoblje od 1. siječnja do 30. travnja 2006. godine te zatim od 1. studenog. 2006. do 30. studenog 2008. godine. Zbog tehničkih poteškoća nije bilo moguće potvrditi prisutnost adenovirusa metodom izolacije u staničnoj kulturi niti odrediti tip virusa za kliničke materijale prikupljene u periodu od 1. svibnja do 31. listopada 2006. godine u kojima je adenovirus bio dokazan DFA metodom.

Pojavljivanje dokazanih tipova adenovirusa [tip 1, 2 i 3 te ostali tipovi (5, 6 i 7)] po kalendarskim mjesecima u Gradu Zagrebu i okolici prikazana je na slici 11. Adenovirusi su se u istraživanom razdoblju javljali tijekom cijele godine, s nešto manjom učestalošću u ljetnim mjesecima.

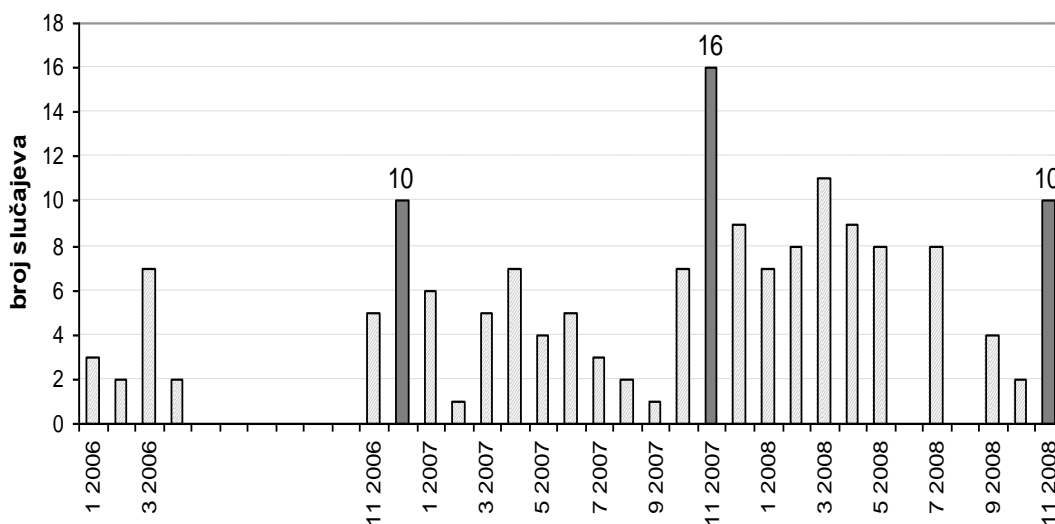
Apsolutna incidencija u padajućem redosljedu bila je: tip 2, zatim tip 1 te tip 3 adenovirusa i pojedinačni slučajevi tipova 5, 6 i 7 adenovirusa.

**Slika 11. Raspodjela dokazanih tipova adenovirusa po kalendarskim mjesecima (n=256)**



Tip 2 adenovirusa bio je najčešće izolirani tip i javljao se gotovo svakog mjeseca tijekom istraživanog razdoblja (slika 12). Nešto veća učestalost uočena je od studenog 2007. do svibnja 2008. godine, odnosno nešto manja učestalost tijekom ljetnih mjeseci (od lipnja do rujna) 2007. i 2008. godine. Vrhovi učestalosti po godinama bili su u prosincu 2006. (10/64; 15,6%), studenom 2007 (16/94; 17%) te studenom 2008. (10/132; 7,6%) godine. U lipnju i kolovozu 2008. godine nije zabilježen niti jedan slučaj infekcije uzrokovan tipom 2 adenovirusa.

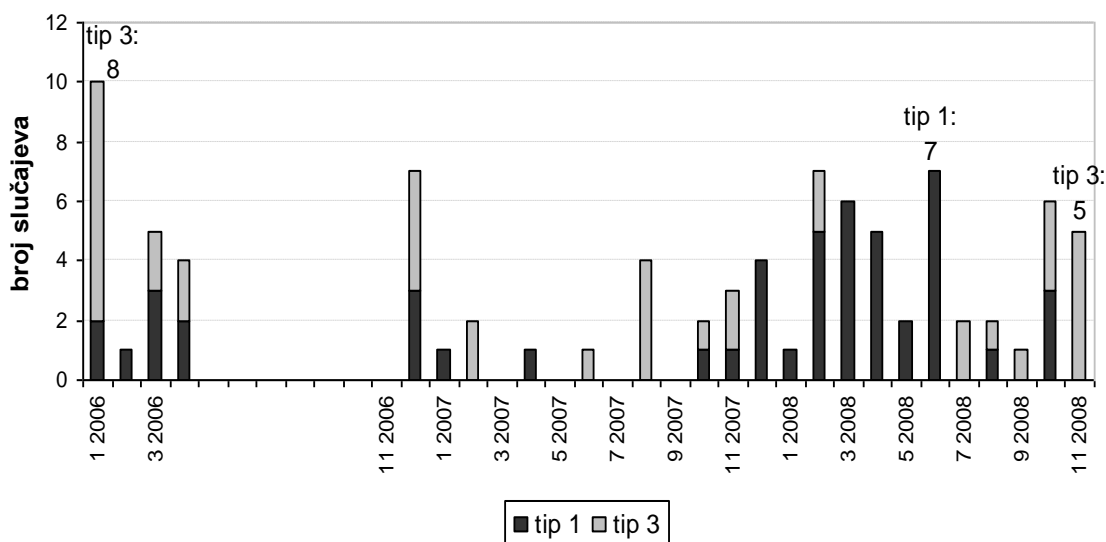
**Slika 12. Raspodjela tipa 2 adenovirusa po kalendarskim mjesecima (n=162)**



Međutim, postoji značajna razlika u pojavljivanju srodnih tipova 1 i 2 koji pripadaju vrsti C adenovirusa. Učestalost tipa 1 bila je nešto veća u prvih šest mjeseci 2008. godine, uz tendenciju grupiranja, dok se u preostalom periodu sporadično pojavljivao (slika 13). Vrh učestalosti tipa 1 adenovirusa bila je u lipnju 2008. godine (7/132; 5,3%), a tada nije bio zabilježen niti jedan slučaj tipa 2 adenovirusa (slike 12 i 13).

I tip 3 adenovirusa (vrsta B) pokazivao je tendenciju grupiranja (slika 13). Najviše slučajeva tipa 3 adenovirusa bilo je u siječnju 2006. godine (8/64; 12,5%). Tijekom 2007. godine tip 3 se sporadično javljao, uz jedno manje grupiranje u kolovozu 2007. (4/94; 4%). Zatim tijekom proljeća 2008. godine nije bio izoliran da bi se u drugoj polovini 2008. godine ponovno počeo pojavljivati sve učestalije, s vrhom u studenom 2008. (5/132; 3,8%) godine.

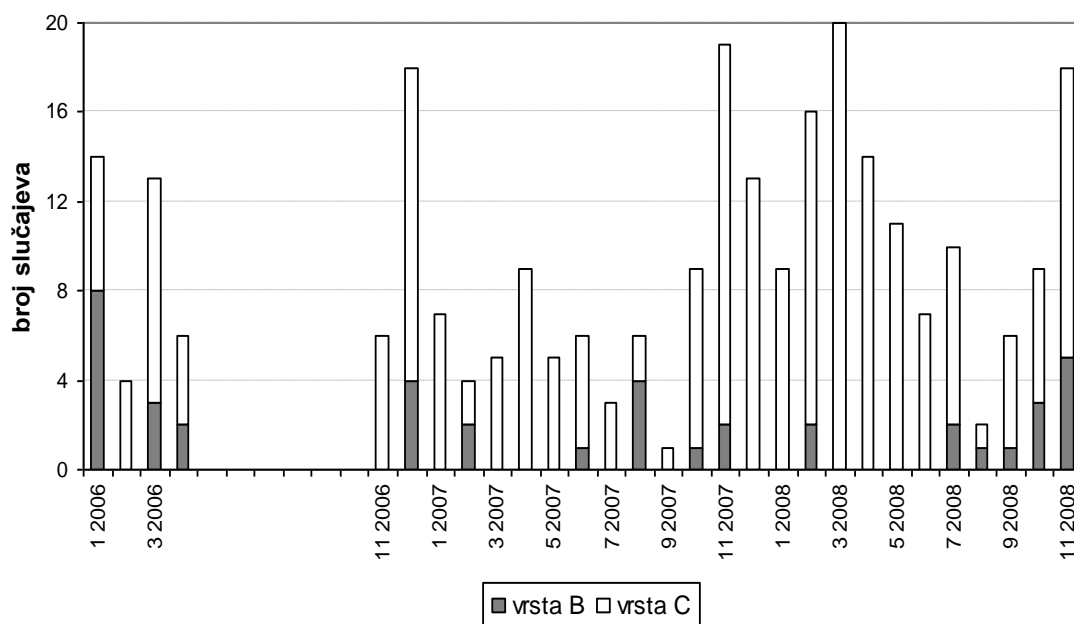
**Slika 13. Raspodjela tipa 1 (n=49) i tipa 3 (n=40) adenovirusa po kalendarskim mjesecima**



Za tipove 5, 6 i 7 adenovirusa nije bilo moguće odrediti sezonsku raspodjelu jer je bio samo po jedan slučaj tipova 5 i 7 adenovirusa te 3 slučaja tipa 6 adenovirusa.

Pojavljivanje vrste B i C adenovirusa po mjesecima prikazano je na slici 14. Vrsta C (tipovi 1, 2, 5 i 6) adenovirusa bila izolirana je svakog mjeseca tijekom istraživanog razdoblja, uz nešto manju učestalost tijekom ljetnih mjeseci. Vrsta B (tipovi 3 i 7) adenovirusa pojavljivala se s manjom i nepravilnijom učestalošću, uz tendenciju grupiranja, posebno u zimskim mjesecima 2006. i 2008. godine.

**Slika 14. Raspodjela vrste B (n=41) i vrste C (n=229) adenovirusa po kalendarskim mjesecima**



#### 4.5 Kliničke osobitosti

Klinički parametri prikupljeni su za 135 bolesnika koji su bili hospitalizirani. Kliničke osobitosti adenovirusnih infekcija dišnog sustava prikazane su za 133 bolesnika inficiranih samo adenovirusom. Dvoje bolesnika bilo je istovremeno inficirano adenovirusom i RSV-om te su opisani posebno. Jedan slučaj adenovirusne infekcije dišnog sustava pojavio se kao intrahospitalna infekcija 7. dan boravka djeteta koje je zaprimljeno u bolnicu zbog infekcije uzrokovane RSV-om.

U ovom su istraživanju adenovirusi najčešće uzrokovali IGDS-a i to u 121/133 (91%) slučajeva. Među IGDS-om tonzilitis je bio zabilježen u 79/121 (65%) slučajeva (tablica 9). Od ukupno 79 tonzilitisa u 33 (42%) slučaja je nađen ET. U bolesnika s upalom srednjeg uha (lat. *otitis media acuta*; OMA) koja je zabilježena u 37/133 (28%) slučajeva, uvijek je bio prisutan i neki oblik respiratornog katara (RK-a). U dvoje bolesnika (1,5%) bio je zabilježen krup. Konjunktivitis je bio prisutan u 11/133 (8%) bolesnika.



Tonzilitis je zabilježen s jednakom učestalošću u bolesnika s infekcijom uzrokovanom vrstom B te vrstom C adenovirusa (60%).

Učestalost OMA-e kod vrste C bila je nešto veća nego kod vrste B (30% naprama 13%;  $p=0,246$ ) adenovirusa. OMA je bila češće prisutna u bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 2 adenovirusa, nego s tipom 1 ili 3 (36% naprama 16%, odnosno 13%;  $p=0,062$ ).

Kliničke slike u bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 6 adenovirusa (vrsta C) prezentirale su se kao IGDS s ili bez pratećeg konjunktivitisa.

Učestalost konjunktivitisa bila je nešto veća u bolesnika s infekcijom uzrokovanom vrstom B u odnosu na vrstu C (13% naprama 8%,  $p=0,864$ ) adenovirusa.

IDDS je bio zabilježen u 12/133 (9%) bolesnika, s jednakom učestalošću bronhitisa i pneumonije (po 4,5%). IDDS je značajno češće bio uzrokovan vrstom B (tip 3) u odnosu na vrstu C (31% naprama 6%,  $p=0,004$ ) adenovirusa.

Probavne smetnje (lat. *gastroenterocolitis* - GEC), kao sekundarne dijagnoze, bile su prisutne u 33/133 (25%) djeteta s adenovirusnom infekcijom dišnog sustava. Tako je u bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 7 (vrsta B) uz IDDS bio je prisutan i GEC kao sekundarna dijagnoza. Nešto veća učestalost GEC-a (povraćanje i/ili proljev) nađena je kod infekcija uzrokovanih vrstom B u odnosu na vrstu C (44% naprama 22%,  $p=0,118$ ) adenovirusa.

Pregled kliničkih dijagnoza kod adenovirusnih infekcija ovisno o tipu, odnosno vrsti adenovirusa u naših bolesnika prikazan je u tablici 18.

**Tablica 18. Kliničke dijagnoze s obzirom na vrstu i tip dokazanih adenovirusa**

Dijagnoza	Tip (n=116) n (%)			Vrsta (n=133) n (%)		Ukupno (tip/vrsta)
	1 (n=24)	2 (n=77)	3 (n=15)	B (n=16)	C (n=117)	
<b>IGDS</b>						
tonzilitis	15 (63)	46 (60)	13 (87)	9 (60)	70 (60)	74/79
ET	7 (29)	18 (23)	4 (26)	4 (25)	29 (25)	29/33
OMA	4 (16)	28 (36)	2 (13)	2 (12)	35 (30)	36/37
konjunktivitis	3 (12)	4 (5)	2 (13)	2 (12)	9 (8)	10/11
krup	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)	1/2
<b>IDDS</b>						
bronhitis	0 (0)	2 (3)	2 (13)	3 (19)	3 (3)	4/6
pneumonija	1 (4)	3 (4)	2 (13)	2 (12)	4 (4)	6/6
<b>GEC</b> (sekundarna dijagnoza)	3 (3)	22 (20)	6 (5)	7 (44)	26 (22)	31/33

(kratice: IGDS= infekcije gornjeg dijela dišnog sustava; IDDS=infekcije donjeg dijela dišnog sustava; ET=eksudativni tonzilitis; OMA= *otitis media acuta*; GEC= gastroenterokolitis)

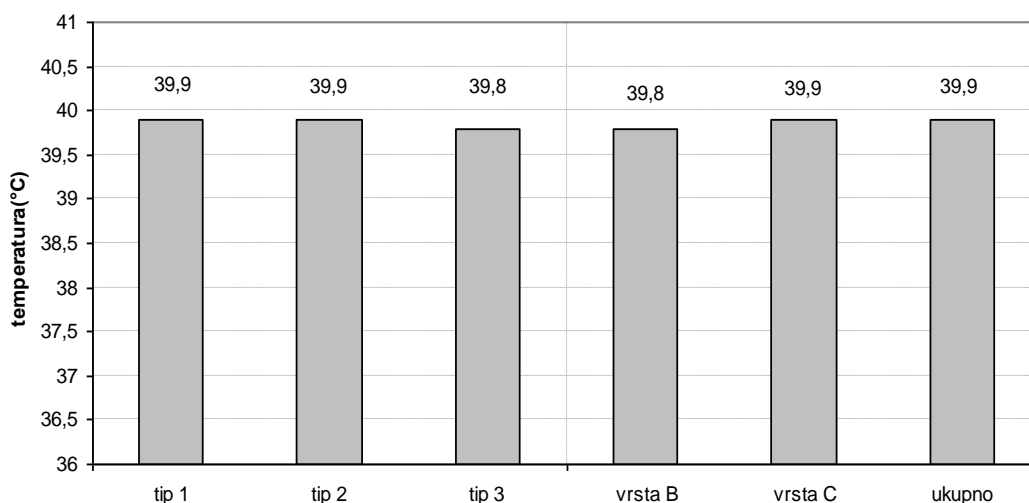
#### **4.5.1 Tjelesna temperatura**

Od ukupno 133 bolesnika za koje su prikupljeni i analizirani klinički podaci, tjelesnu temperaturu iznad 38,0°C imao je 131 (98%) bolesnik. Medijan najviše izmjerene tjelesne temperature (TT) bio je 39,9°C, raspon od 37,2°C do 41,5°C i srednje vrijednosti 39,8°C ± 0,7°C. Visoku TT-u (>39,0°C) imala je većina bolesnika (114/133; 86%), a izrazito visoku TT-u (>40,0°C) 26% (34/133) bolesnika.

Medijani najviših izmjerenih TT prema uzročnom tipu, odnosno vrsti adenovirusa prikazane su na slici 15. U tablici 19a prikazane su srednje vrijednosti najviših izmjerenih TT-a, a u tablici 19b trajanje febriliteta u hospitalizirane djece.

U oba bolesnika s TT-om u granicama normale klinički je nađen krup. Infekcija *B. pertusis* nije dokazana. U jednog od tih bolesnika još su bili prisutni sekrecija iz nosa i konjunktivitis.

**Slika 15. Medijani najviših izmjerenih tjelesnih temperatura u adenopozitivnih bolesnika prema uzročnom tipu/vrsti adenovirusa**



Medijan trajanja povišene TT u febrilnih bolesnika bio je 5 dana, u rasponu od 2 do 13 dana, prosječno trajanje TT-a bilo je  $5,3 \pm 1,9$  dana. Od ukupno 131 febrilnog bolesnika, u 90 (69%) bolesnika trajanje povišene TT nije bilo duže od 5 dana.

U bolesnika s infekcijom tipom 1 adenovirusa medijan trajanja febriliteta bio je 5 dana, raspon od 2 do 9 dana, prosječno trajanje febriliteta bilo je  $4,6 \pm 1,8$  dana. U bolesnika s infekcijom tipom 2 adenovirusa medijan trajanja febriliteta bio je 5 dana, raspon od 2 do 13 dana i prosječno trajanje febriliteta  $5,2 \pm 2,1$  dana. U bolesnika s infekcijom tipom 3 adenovirusa medijan je bio 5 dana, raspon od 3 do 9 dana te prosječno trajanje febriliteta  $5,8 \pm 1,8$  dana.

Raspon trajanja febriliteta u bolesnika s infekcijom uzrokovanom vrstom B adenovirusa bilo je od 3 do 9 dana, medijan 5 dana te prosječno trajanje febriliteta bilo je  $5,7 \pm 1,8$  dana. A u febrilnih bolesnika s infekcijom uzrokovanom vrstom C adenovirusa prosječno trajanje povišene TT-e bilo je  $5,0 \pm 2,1$  dana i raspon od 2 do

13 dana. U većine febrilnih bolesnika (95/133; 72%) trajanje povišene TT-e bilo je duže od 3 dana.

**Tablica 19a. Srednje vrijednosti najviših izmjerenih TT-a prema uzročnom tipu/vrsti adenovirusa**

Tjelesna temperatura (°C)	Tip			Vrsta		Ukupno
	1	2	3	B	C	
<b>Srednja vrijednost ± SD</b>	39,7±0,8	39,8±0,6	39,7±0,7	39,7±0,7	39,8±0,7	39,8±0,7
<b>95% CI</b>	39,4-40,0	39,7-39,9	39,3-40,1	39,3-40,1	39,6-39,9	39,6-39,9
<b>Raspon</b>	37,2–41	38-41,5	38,3-40,9	38,3-40,9	37,2-41,5	37,2-41,5
<b>Medijan</b>	39,9	39,9	39,8	39,8	39,9	39,9

(kratice: SD= standardna devijacija; CI = interval pouzdanosti)

**Tablica 19b. Srednje vrijednosti ukupnog trajanja febriliteta prema uzročnom tipu/vrsti adenovirusa**

Trajanje febriliteta (dani)	Tip			Vrsta		Ukupno
	1	2	3	B	C	
<b>Prosječno trajanje ± SD</b>	4,6±1,8	5,2±2,1	5,8±1,8	5,7±1,8	5,0±2,1	5,1±2,1
<b>95% CI</b>	3,8-5,4	4,7-5,7	4,8-6,8	4,7-6,6	4,6-5,4	4,7-5,5

(kratice: SD= standardna devijacija; CI = interval pouzdanosti)

Febrilne konvulzije su se javile u 10/131 (8%) febrilnog bolesnika. Medijan TT-e bio je 40,0°C, raspon od 38,0°C do 40,6°C te srednja vrijednost TT-e 39,9°C ± 0,7°C (95% CI: 39,4-40,4°C). Medijan dobi, u djece s febrilnim konvulzijama, bio je 23 mjeseca, raspon od 13 do 78 mjeseci te srednja vrijednost 32,4 ± 23,1 mjeseca.

#### **4.5.2 Kašalj**

Kašalj je bio prisutan u 95/133 (71%) bolesnika s adenovirusnom infekcijom dišnog sustava. Od toga je u 2 bolesnika zabilježen laringalni kašalj (kašalj poput laveža psa), bez dokaza infekcije s *B. pertusis*. U jednog bolesnika s dominantnim simptomom laringalnog kašlja izoliran je tip 1 (vrsta C) adenovirusa, a u drugog bolesnika uz izraženu sekreciju iz nosa i konjunktivitis tip 6 (vrsta C) adenovirusa.

Kašalj je bio prisutan u 16/24 (67%) bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 1 adenovirusa, u 60/77 (78%) s tipom 2 i u 13/15 (87%) s tipom 3.

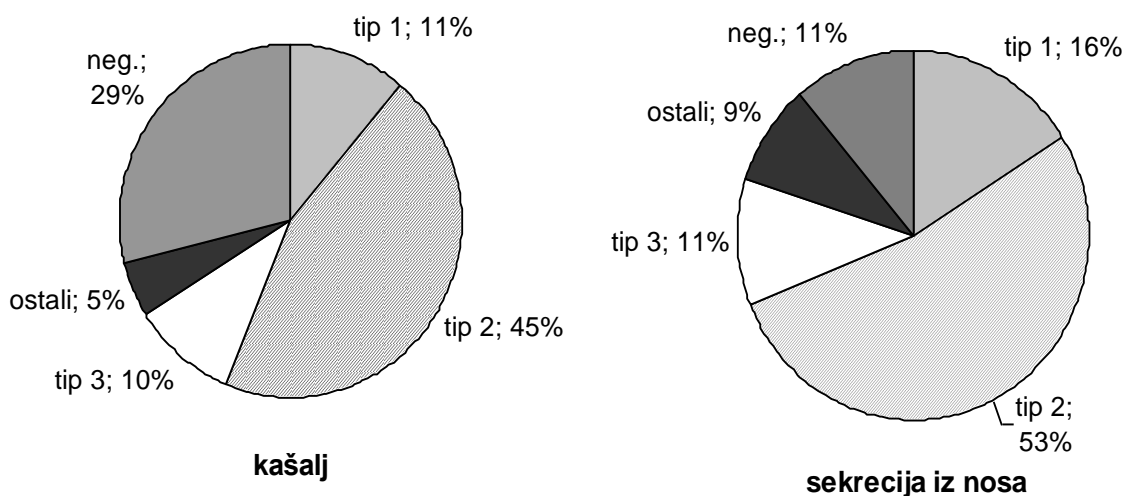
Ovisno o vrsti adenovirusa kašalj je bio prisutan 13/16 (81%) bolesnika s infekcijom uzrokovanom vrstom B te u 82/117 (70%) bolesnika s vrstom C.

Iako je kašalj bio nešto češće izražen u bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 3 (vrstom B) adenovirusa nije nađena statistički značajna razlika u odnosu na tip, odnosno vrstu adenovirusa. Učestalost kašlja i sekrecije iz nosa prema tipu adenovirusa prikazane su na slici 16.

#### **4.5.3 Sekrecija iz nosa**

Najizraženiji simptom u ovih bolesnika bila je sekrecija iz nosa koja je bila prisutna u većine bolesnika (118/133; 89%). Sekrecija iz nosa bila je prisutna u 21/23 (91%) bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 1 adenovirusa, u 70/77 (91%) s tipom 2 te u 15/15 (100%) s tipom 3 adenovirusa (slika 16). Odnosno, sekreciju iz nosa imali su svi bolesnici s infekcijom uzrokovanom vrstom B (16/16) te 103/117 (88%) bolesnika s infekcijom uzrokovanom vrstom C adenovirusa.

**Slika 16. Učestalost kašlja i sekrecije iz nosa ovisno o uzročnom tipu adenovirusa (n=133)**  
(kratica: neg.=negativno)



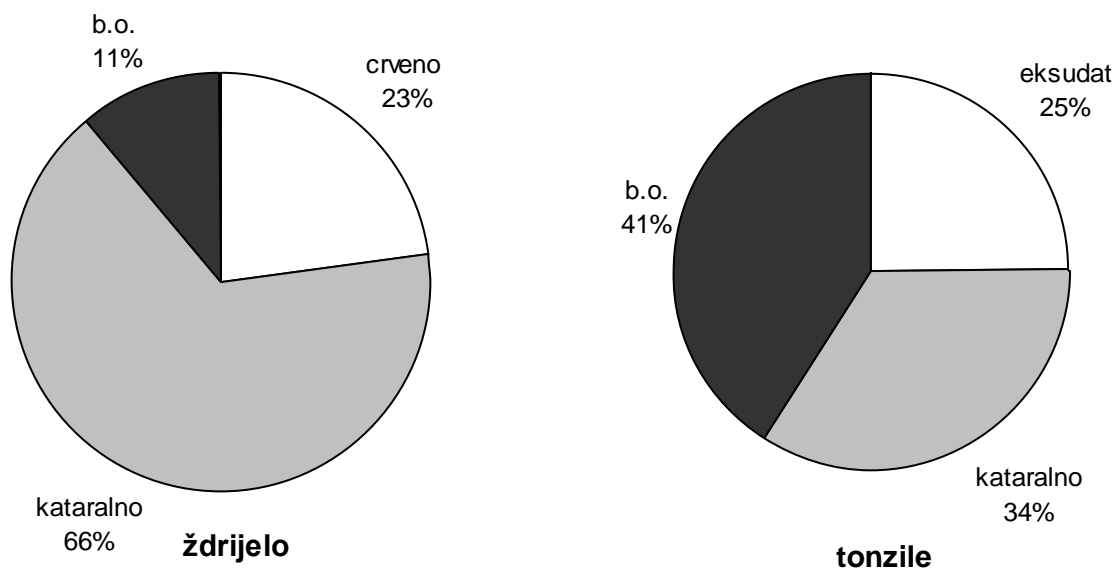
#### 4.5.4 Ždrijelo i tonzile

U većine bolesnika ždrijelo je bilo kataralno promijenjeno (87/133; 66%). Promijenjen nalaz na tonzilama bio je zabilježen u 79/133 (59%) bolesnika, od kojih je 41% (33/79) bolesnika imalo ET (slika 17). U samo dva djeteta s tonzilitisom u brisu ždrijela bio je izoliran *S. pyogenes*, dok je u preostale djece bila izolirana normalna bakterijska flora. U 36/79 (46%) bolesnika s tonzilitisom bili su nađeni povećani limfni čvorovi vrata, odnosno u 21/33 (64%) s ET-om.

Učestalost tonzilitisa po tipovima 1, 2 odnosno 3 adenovirusa uvijek je bila oko 60% (15/24; 63%, 46/77; 60% odnosno 9/15; 60%). Eksudativni tip tonzilitisa bio je nađen u 7/24 (29%) bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 1 adenovirusa, u 18/77 (23%) s tipom 2 i u 4/15 (27%) s tipom 3.

Gledano prema vrstama, po 25% bolesnika s infekcijom uzrokovanom vrstom B, odnosno vrstom C imalo je ET (4/16, odnosno 29/117).

**Slika 17. Nalaz ždrijela i tonzila u adenopozitivnih bolesnika (n=133)**  
(kratica: b.o.=bez osobitosti)



#### 4.5.5 Nalaz na bubnjiću

Patološki nalaz na bubnjiću (crvenilo i/ili skraćen refleks) u smislu OMA-e imalo je 37/133 (28%) bolesnika, a uredan nalaz 96/133 (72%) bolesnika.

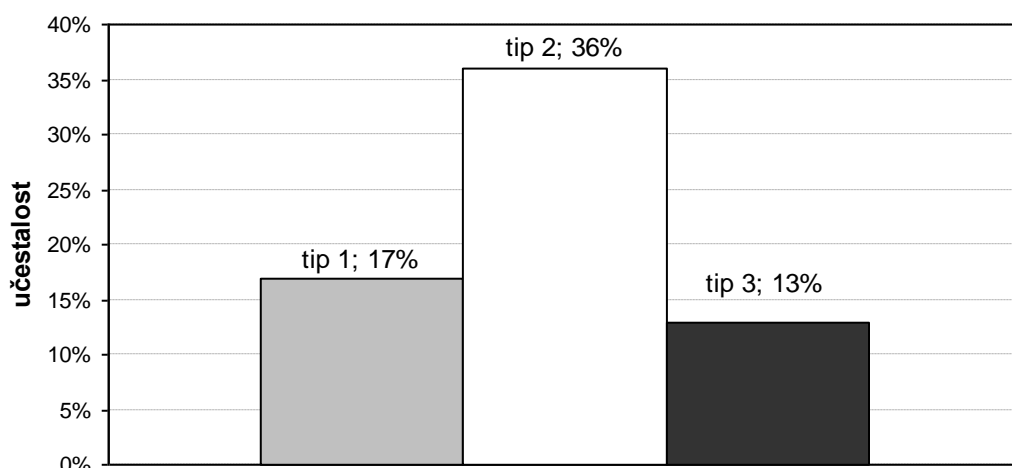
Učestalost OMA-e među bolesnicima s infekcijom uzrokovanom tipom 2 adenovirusa bila je nešto veća u odnosu na tip 1, odnosno tip 3 adenovirusa (36% naprama 17%, odnosno 13%;  $p=0,0624$ ).

Isto tako je i učestalost OMA-e kod infekcija uzrokovanih vrstom C bila nešto veća u odnosu na vrstu B (2/16; 30% naprama 35/117; 13%;  $p=0,2458$ ).

U osmero djece s OMA-om, u brisu nazofarinksa izolirana je *Moraxella catarrhalis*, u četvero *Haemophilus influenzae* i u dvoje *Streptococcus pneumoniae*. U ostale djece s OMA-om izolirana je normalna bakterijska flora (20/37), a u 3/37 djeteta nije bio učinjen bris nazofarinksa za bakteriološku dijagnostiku.

Učestalost OMA-e ovisno o tipu adenovirusa prikazana je na slici 18.

**Slika 18. Učestalost OMA-e ovisno o tipu adenovirusa (n=116)**



#### **4.5.6 Konjunktivitis**

U 11/133 (8%) bolesnika bio je nađen konjunktivitis. Učestalost konjunktivitisa u bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 1 adenovirusa bila je nešto veća nego s tipom 2, odnosno s tipom 3 (3/24; 20% naprama 4/77; 5%, odnosno 2/15; 13%;  $p=0,3478$ ,  $\chi^2=2,112$ ) adenovirusa. U 10/11 (91%) bolesnika s konjunktivitisom nađen je i faringitis, a u 1/11 (9%) bolesnika rinitis i laringalni kašalj (tip 6 adenovirusa).

#### **4.5.7 Infekcije donjeg dijela dišnog sustava**

IDDS (bronhitis i/ili pneumonija) imalo je 12/133 (9%) bolesnika, uz jednaku raspodjelu bronhitisa (6/12; 4,5%) i pneumonije (6/12; 4,5%).

Učestalost IDDS-a u bolesnika s infekcijom uzrokovanom vrstom B adenovirusa bila je značajno veća, nego s vrstom C (5/16; 31% naprama 7/117; 6%;  $p=0,004$ ,  $\chi^2=8,085$ ) adenovirusa.

U brisu nazofarinksa dvoje djece s IDDS-om izoliran je *H. influenzae*, u dvoje *M. catarrhalis* i u jednog djeteta *S. pneumoniae*. U ovih bolesnika uzete su bile i



hemokulture koje su ostale sterilne. Uzročnik bakterijskog porijekla u bolesnika s IDDS-a nije bio dokazan.

Rendgenogram je učinjen u sve djece s IDDS-om. Patološke promjene u rendgenogramu bile su nađene u 10/12 (80%) bolesnika u smislu nalaza inhomogenog pneumoničnog infiltrata, odnosno pojačanog hilopulmonarnog crteža ili izljeva, dok je dvoje bolesnika imalo nalaz bez osobitosti.

#### **4.5.8 Kožne promjene**

Makulopapulozni osip bio je izražen u 15/133 (11%) bolesnika s adenovirusnom infekcijom dišnog sustava u kojih je drugi uzrok pojave osipa bio isključen. Ove kožne promjene su se s gotovo jednakom učestalošću javljale u bolesnika s infekcijom uzrokovanom vrstom B, odnosno vrstom C (13/117; 12% odnosno 2/16; 13%) adenovirusa.

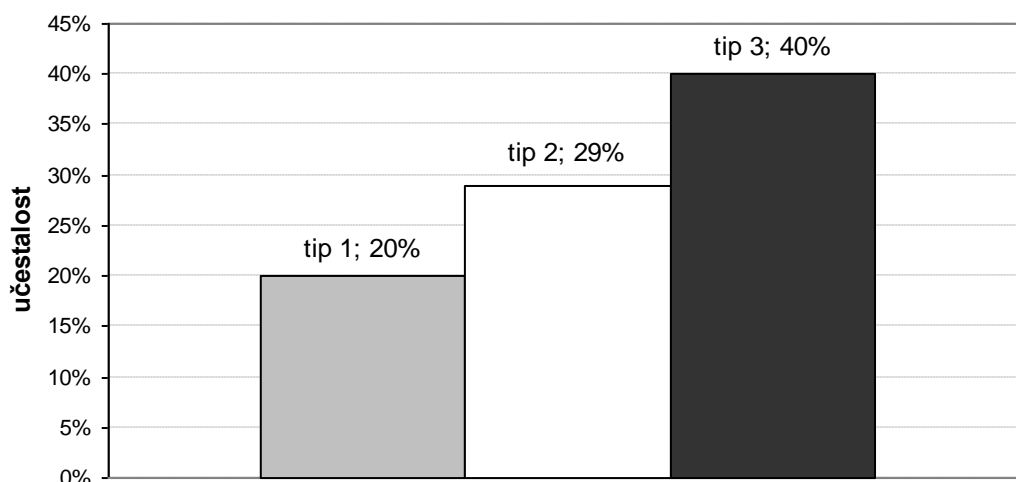
#### **4.5.9 Probavne smetnje**

Iako su izolirani tipovi adenovirusa primarno uzrokovali infekcije dišnog sustava, 33/133 (25%) bolesnika imalo je i GEC (uključujući povraćanje i/ili proljev) kao sekundarnu dijagnozu, a da drugi uzročnik GEC-a nije dokazan (bakterijski niti virusni). Učestalost GEC-a u bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 3 adenovirusa (6/15; 40%) bila je nešto veća nego s tipom 1 (3/24; 20%), odnosno s tipom 2 (22/77; 29%), ali ne i statistički značajna ( $p=0,1378$ ).

Učestalost GEC-a u bolesnika s infekcijom uzrokovanom vrstom B bila je nešto veća nego s vrstom C (7/16; 44% naprama 26/117; 22%,  $p=0,118$ ) adenovirusa.

Slika 19 prikazuje učestalost pojave GEC-a u bolesnika s infekcijama uzrokovanim tipom 1, 2, odnosno 3 adenovirusa.

**Slika 19. Učestalost probavnih smetnji ovisno o tipu adenovirusa (n=116)**



## **4.6 Laboratorijski nalazi**

### **4.6.1 C-reaktivni protein**

Većina bolesnika s adenovirusnom infekcijom (114/133; 86%; 95% CI: 78,7-90,7) imala je povišene koncentracije CRP-a. Raspon koncentracija CRP-a bio je 0,5-227,1 mg/l, a medijan 53 mg/l (slika 20).

U bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 1 adenovirusa medijan je bio 37,3 mg/l i raspon 0,5-190 mg/l. U bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 2 adenovirusa medijan je bio 50,2 mg/l, a raspon 1,5-227,1 mg/l. U bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 3 medijan je bio 36,3 mg/l, a raspon 2-189 mg/l. Statistička značajnost razlika između tipova (1, 2 i 3), odnosno vrsta (B i C) adenovirusa nije nađena (Kruskal Wallis test,  $p=0,457$ , odnosno  $p=0,623$ ).

U dva bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 6 zabilježene su različite koncentracije CRP-a (4 mg/l, odnosno 71 mg/l). U bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 7 CRP je bio 160 mg/l.

Samo je 16/133 (12%) bolesnika imalo normalne vrijednosti CRP-a (<10,0 mg/l). Više od polovine bolesnika (74/133; 56%) imalo je visoke koncentracije CRP-a ( $\geq 40,0$  mg/l), a koncentracije  $\geq 50,0$  mg/l CRP-a 52% (69/133;) bolesnika. Izrazito visoke koncentracije CRP-a iznad 100,0 mg/l imalo je 27/133 bolesnika (20%).

U slučajevima infekcije uzrokovane vrstom B raspon CRP-a bio je 2-189 mg/l i medijan 44,7 mg/l, a s vrstom C adenovirusa raspon je bio 0,5-227,1 mg/l te medijan 54,6 mg/l.

Srednje vrijednosti koncentracija CRP-a u naših bolesnika prema tipu (1, 2 i 3), odnosno vrsti (B i C) adenovirusa prikazane su u tablici 20.

#### **4.6.2 Sedimentacija eritrocita**

Većina bolesnika s adenovirusnom infekcijom (108/127; 85%; 96% CI: 77,7-90,3) imala je ubrzanu SE (slika 20). U većine naših hospitaliziranih bolesnika (91/127; 71%; 95% CI: 63,2-78,8) brzina SE bila je  $\geq 30$  mm/h.

Raspon vrijednosti SE bio je 5-110 mm/h, medijan 40 mm/h i srednja vrijednost  $45,3 \pm 24,7$  mm/h. U bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 1 adenovirusa raspon brzine SE bio je 5-100 mm/h i medijan 35 mm/h, s tipom 2 raspon je bio 5-105 mm/h i medijan 43,5 mm/h, te s tipom 3 raspon je bio 12-66 mm/h i medijan 25 mm/h.

Srednje vrijednosti SE prema tipu (1, 2 i 3), odnosno vrsti (B i C) adenovirusa prikazane su u tablici 20.

U bolesnika s infekcijom uzrokovanom vrstom B raspon brzine SE bio je 12-66 mm/h i medijan 25 mm/h te s vrstom C adenovirusa raspon je bio 5-110 mm/h i medijan 42 mm/h. Statistički značajne razlike u brzini SE postoje između tipova (1, 2 i 3), odnosno vrsti (B i C) adenovirusa (Kruskal Wallis test:  $p=0,0082$ , odnosno  $p=0,0033$ ; tablica 20).

Međutim, relativno mala učestalost tipova 1 i 3 adenovirusa, odnosno vrste B adenovirusa, utječe na snagu statističkog testa te to svakako treba uzeti u obzir pri interpretaciji. Stoga, možemo reći da se vidi jasna tendencija razlike između tipova (1 i 3 te tipa 2), odnosno vrsta (B i C) adenovirusa u odnosu na vrijednosti SE. Naime, brzine SE u bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 3, odnosno vrstom B adenovirusa su manje od onih s tipom 1 i 2, odnosno vrstom C adenovirusa.

**Tablica 20. Srednje vrijednosti koncentracije CRP-a i brzine SE prema tipu i vrsti adenovirusa**

Tip	CRP (mg/l) (n=116)			SE (mm/h) (n=112)		
	medijan	srednja vrijednost	95% CI	medijan	srednja vrijednost	95% CI
<b>1</b>	37,3	56,1 ± 52,9	33,8-78,4	35,0	42,8 ± 26,1	31,8-53,8
<b>2</b>	50,2	59,8 ± 43,8	49,9-69,8	43,5	48,2 ± 23,7	42,6-53,8
<b>3</b>	36,3	53,8 ± 53,3	24,3-83,4	25,0	29,3 ± 15,1	20,9-37,7
Kruskal Wallis test	p=0,457			p=0,0082		
Vrsta	CRP (mg/l) (n=133)			SE (mm/h) (n=127)		
	medijan	srednja vrijednost	95% CI	medijan	srednja vrijednost	95% CI
<b>B</b>	44,7	60,5 ± 57,9	29,6-91,3	25,0	29,6 ± 14,7	27,1-37,4
<b>C</b>	54,6	59,7 ± 44,0	51,6-67,8	42,0	47,6 ± 25,1	42,9-52,3
Kruskal Wallis test	p=0,623			p=0,0033		
<b>Ukupno</b>	53,0	59,8 ± 45,6	51,9-67,6	40,0	45,3 ± 24,7	41,0-49,6

### 4.6.3 Leukociti

Većina bolesnika s adenovirusnom infekcijom (126/133; 95%; 95% CI: 89,3-97,6) imala je broj leukocita iznad granica normalnih vrijednosti za dob (slika 20). Raspon broja leukocita u ovih bolesnika bio je  $4,9-53,8 \times 10^9/l$ , medijan  $20 \times 10^9/l$  i srednja vrijednost  $20,4 \pm 7,2 \times 10^9/l$ .

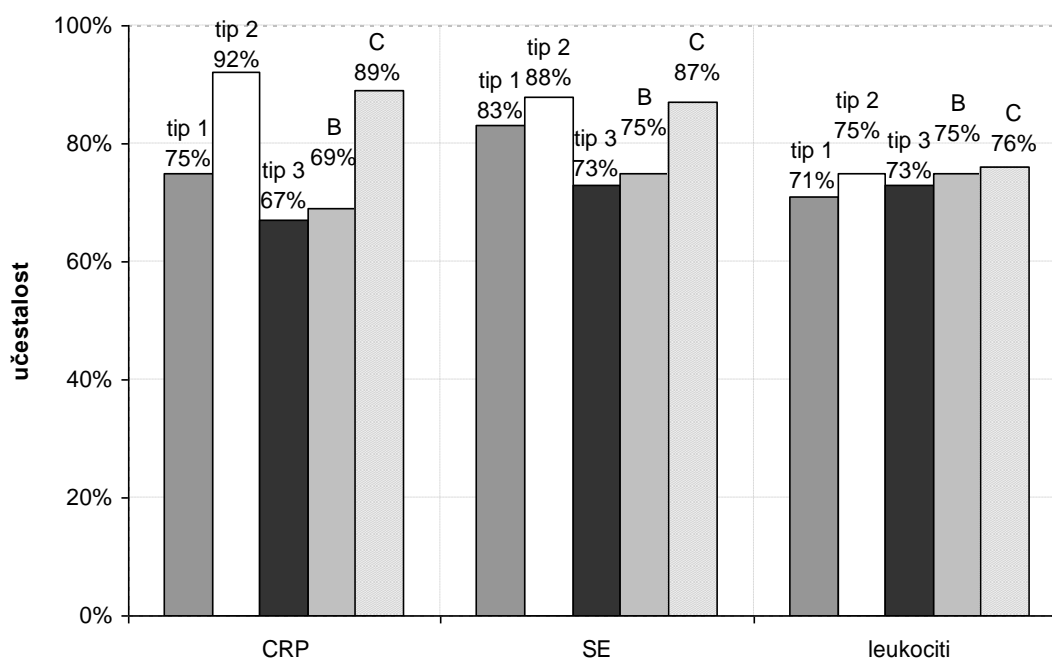
U bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 1 adenovirusa raspon broja leukocita bio je  $4,9-36,8 \times 10^9/l$  i medijan  $19,9 \times 10^9/l$ , s tipom 2 raspon je bio  $4,9-53,8 \times 10^9/l$  i medijan  $20,8 \times 10^9/l$  te s tipom 3 raspon je bio  $7,1-30,9 \times 10^9/l$  i medijan  $19,6 \times 10^9/l$  (tablica 21).

U većine bolesnika (103/133; 77%) broj leukocita bio je  $\geq 15 \times 10^9/l$ . U 67/133 (50%) bolesnika broj leukocita bio je  $\geq 20 \times 10^9/l$ .

**Tablica 21. Srednje vrijednosti broja leukocita prema tipu i vrsti adenovirusa**

	Tip (n=116)			Vrsta (n=133)	
	1	2	3	B	C
	(x $10^9/l$ )			(x $10^9/l$ )	
<b>medijan</b>	19,9	20,8	19,6	20,1	20
<b>sred. vrijednost</b>	19,5	20,9	18,8	19,2	20,6
<b>st. dev.</b>	6,6	7,6	7,9	7,7	7,2
<b>95% CI</b>	16,7-22,3	19,2-22,6	14,5-23,2	15,1-23,3	19,3-21,9
<b>raspon</b>	4,9-36,8	4,9-53,8	7,1-30,9	7,1-30,9	4,9-53,8
Kruskal Wallis test	p=0,617			p=0,638	

**Slika 20. Učestalost povišenih koncentracija CRP-a, ubrzane SE i povećanog broja leukocita u adenopozitivnih bolesnika prema tipu (1, 2 i 3) i vrsti (B i C) adenovirusa**



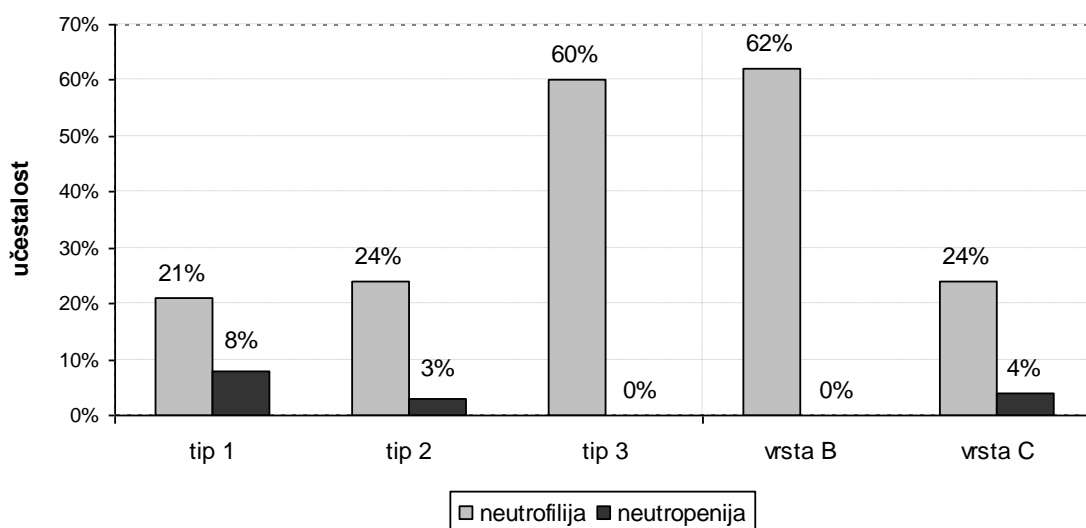
Analiza diferencijalne krvne slike (DKS) pokazala je da su vrijednosti udijela neutrofila i limfocita većinom bile u granicama normalnih vrijednosti za dob (85/126; 67%, odnosno 91/126; 72%). Nalazi udijela neutrofila i limfocita u granicama normalnih vrijednosti bili su nešto češći u bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 1 i 2 adenovirusa u odnosu na tip 3 adenovirusa (17/24; 71% i 52/71; 73% naprama 6/15; 40%). Učestalost odstupanja od normalnih vrijednosti za udijele neutrofila i limfocita prikazane su na slikama 21 a i 21 b.

Srednja vrijednost udijela neutrofila bila je  $59,9 \pm 17,2\%$ , medijan 62% i raspon 6-95%. U bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 3 adenovirusa srednja vrijednost udijela neutrofila bila je značajno veća nego kod tipa 1, odnosno tipa 2 ( $70,8 \pm 15,7\%$  naprama  $56,4 \pm 17,2\%$ , odnosno  $58,9 \pm 14,7\%$ ;  $p=0,013$ ) adenovirusa.

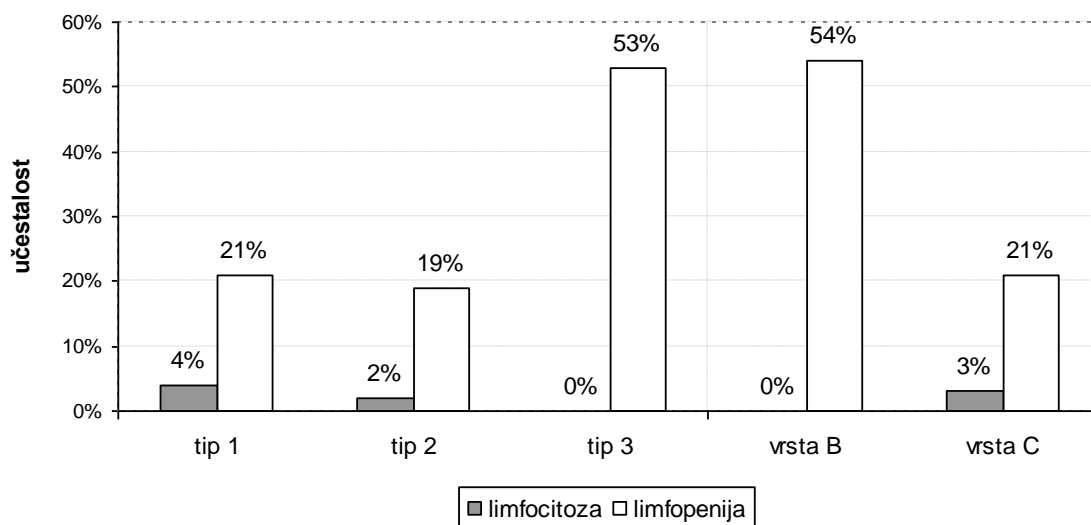
Srednja vrijednost udijela limfocita bila je  $27,4 \pm 5,1\%$ , medijan  $25,0\%$  i raspon 3-84%. U bolesnika s infekcijom uzrokovanom s tipom 3 adenovirusa srednja vrijednost udijela limfocita bila je značajno manja nego kod tipa 1, odnosno tipa 2 ( $18,8 \pm 11,1\%$  naprama  $30,3 \pm 16,7\%$ , odnosno  $27,9 \pm 13,2\%$ ;  $p=0,012$ ) adenovirusa.

U hospitaliziranih bolesnika s adenovirusnom infekcijom češće je zabilježena neutrofilija, nego neutropenija (36/126; 29% naprama 5/126; 4%), odnosno limfopenija nego limfocitoza (32/126; 25% naprama 3/125; 3%). Neutrofilija je češće zabilježena u bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 3 (vrsta B) adenovirusa nego s tipom 1 i tipom 2 (vrsta C) adenovirusa (60% naprama 21% i 24%). Limfopenija je isto češće zabilježena u bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 3 (vrsta B) adenovirusa nego s tipom 1 i tipom 2 (vrsta C) adenovirusa (53% naprama 21% i 19%).

**Slika 21 a. Učestalost neutrofilije i neutropenije prema dokazanom tipu (n=116), odnosno vrsti (n=133) adenovirusa**



**Slika 21 b. Učestalost limfocitoze i limfopenije prema dokazanom tipu (n=116), odnosno vrsti (n=133) adenovirusa**



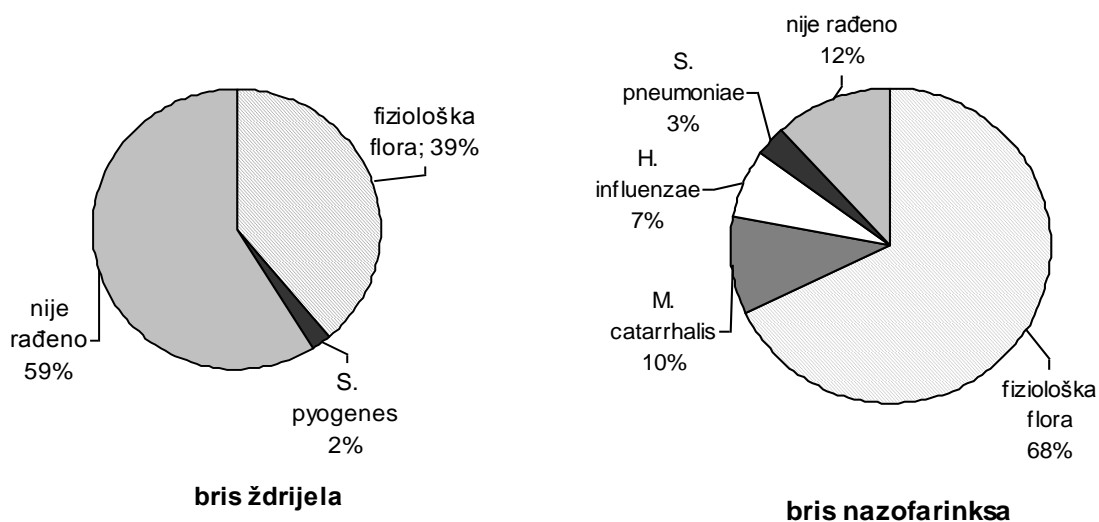
#### **4.6.4 Bakteriološki nalazi brisa ždrijela i nazofarinksa**

Bris ždrijela bio je učinjen u 54/133 (41%) bolesnika. U 3/54 bolesnika izoliran je *S. pyogenes*, od čega je za 2 bolesnika zaključeno da se radi o kliconoštvu. Bris nazofarinksa učinjen je u 117/133 (88%) bolesnika. U većine bolesnika (91%) izolirana je normalna bakterijska (fiziološka) flora. U 13/117 (11%) bolesnika izolirana je *M. catarrhalis*, u 10/117 (9%) *H. influenzae* i u 5/117 (4%) *S. pneumoniae*.

Bakteriološki nalazi brisa ždrijela i nazofarinksa prikazani su na slici 22.



## Slika 22. Bakteriološki nalazi brisa ždrijela i nazofarinksa



### 4.6.5 Liječenje bolesnika s infekcijom uzrokovanom adenovirusom

Od ukupno 135 hospitaliziranih bolesnika 31 (23%) bio je liječen simptomatski (antipiretici i nadoknada tekućine). Antimikrobno (antibiotsko) liječenje bilo je provedeno u 102 (76%) bolesnika. U dvoje (1%) bolesnika bilo je započeto liječenje antibiotikom koje je bilo prekinuto (do 3. dana od početka liječenja) nakon dokaza adenovirusa u NFS-u. Udio bolesnika liječenih antibiotikom nije se razlikovao između pojedinih tipova, odnosno vrsta adenovirusa (tablica 22).

**Tablica 22. Način liječenja ovisno o dokazanom tipu, odnosno vrsti adenovirusa**

Tip liječenja	Tip n (%)			Vrsta n (%)		Ukupno n (%) (n=135)
	1 (n=25)	2 (n=74)	3 (n=15)	B (n=16)	C (n=117)	
<b>simptomatsko</b>	6 (24%)	19 (26%)	4 (27%)	4 (25%)	27 (23%)	31 (23%)
<b>antimikrobno</b>	19 (76%)	57 (74%)	11 (73%)	12 (75%)	90 (77%)	102 (76%)

Liječenje antibiotikom nešto češće je bilo provedeno u bolesnika s ET-om, odnosno OMA-om (93%, odnosno 86%), nego u bolesnika samo s dijagnozom RK (45%). Tip liječenja ovisno o vodećoj kliničkoj dijagnozi prikazan je u tablici 23.

**Tablica 23. Tip liječenja prema kliničkim dijagnozama**

Dijagnoza	Tip liječenja		Ukupno
	simptomatsko	antimikrobno	
<b>RK</b>	23 (55%)	19 (45%)	42
<b>ET</b>	2 (7%)	31 (93%)	33
<b>OMA</b>	5 (14%)	32 (86%)	37
<b>IDDS</b>	2 (17%)	10 (83%)	12

(kratice: RK= respiratorni katar; ET=eksudativni tonzilitis; OMA=*otitis media acuta*; IDDS=infekcija donjeg dijela dišnog sustava)

#### **4.6.6 Bolesnici s infekcijom uzrokovanom adenovirusom i nekim drugim respiratornim virusom**

Od ukupno 290 bolesnika, koinfekciju s nekim drugim respiratornim virusom (RSV-om) imalo je 8 (3%) bolesnika. Od tih osmero bolesnika, 7 (88%) je bilo muškog spola i jedno dijete (12%) bilo je ženskog spola. Raspon dobi bio je 5-28 mjeseci, a medijan 18,5 mjeseci.

Od ukupno 8 bolesnika s koinfekcijom dvoje je bilo bolnički liječeno. U oba hospitalizirana bolesnika, u istom kliničkom materijalu (NFS-u) adenovirus i RSV bili su istovremeno dokazani DFA metodom. Oba bolesnika imala su infekciju uzrokovanu tipom 1 adenovirusa. Koinfekcije su se klinički prezentirale kao IGDS-a, a u jednog bolesnika bili su još prisutni kožni osip i GEC. Oba bolesnika su se brzo i u potpunosti oporavila.

Demografske i kliničke osobitosti adenopozitivnih bolesnika s koinfekcijom s RSV-om prikazane su u tablicama 24 i 25.

**Tablica 24. Demografske karakteristike bolesnika s infekcijom uzrokovanom adenovirusom i RSV-om**

<b>Bolesnik</b>	<b>Tip/ vrsta adenovirusa</b>	<b>Spol</b>	<b>Dob (mj.)</b>
1	1/C	m	16
2	1/C	m	5
3	1/C	ž	27
4	1/C	m	26
5	2/C	m	28
6	2/C	m	17
7	2/C	m	20
8	neodređenog tipa	m	5

(kratice: m=muški spol; ž=ženski spol)

**Tablica 25. Kliničke osobitosti hospitaliziranih bolesnika s infekcijom uzrokovanom adenovirusom i RSV-om**

Bolesnik	Spol	Dob (mj.)	Tip/vrsta adenovirusa	TT	Kliničke osobitosti	CRP (mg/l)/SE (mm/h)/leukociti	Liječenje
1	m	16	1/C	39,6°C, trajanje febriliteta: 2 dana	tonzilofaringitis, sekrecija iz nosa, kašalj, OMA, kožni osip, GEC	16,6/15/23,4x10 <sup>9</sup> /l	antibiotik i antipiretik
2	ž	27	1/C	38,8°C, trajanje febriliteta: 4 dana	rinofaringitis, kašalj, febrilne konvulzije	9/25/18,5x10 <sup>9</sup> /l	simptomatski (antipiretik)

(kratice: TT=tjelesna temperatura; CRP=C-reaktivni protein; SE=sedimentacija eritrocita; OMA=*otitis media acuta*; GEC=probavne smetnje)

## **4.7 Testiranje hipoteza**

### **Hipoteza 1**

Za testiranje hipoteze analizirano je razdoblje u kontinuitetu od 1. prosinca 2006. do 30. studenog 2008. godine. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je najčešće izoliran tip 2 adenovirusa (66,2%), nešto rjeđe tip 1 (18,9%) i tip 3 (12,9%). Odnosno najčešće su kod ARI uzrokovanih adenovirusom izolirani pripadnici vrste C (87,1%) adenovirusa, a pripadnici vrste B (12,9%) značajno rjeđe. Tipovi 5, 6 i 7 (u ožujku 2006. godine) adenovirusa izolirani su sporadično tijekom istraživanog razdoblja (tablica 26). Rezultati su pokazali da se izolirani cirkulirajući tipovi, odnosno vrste adenovirusa koji uzrokuju ARI u djece do 10 godina u Gradu Zagrebu i okolici podudaraju s tipovima/vrstama o kojima se izvještavali i drugi autori u svojim istraživanjima (tablica 27). Tijekom istraživanog razdoblja u naših bolesnika tip 2 adenovirusa javljao se češće (66,2%) u odnosu na rezultate drugih istraživanja (16-34,5%) [11, 44, 45, 53-56]. Udio tipa 1 (18,9%), odnosno tipa 3 (12,9%) adenovirusa bio je sličan rezultatima drugih istraživanja (12,1-26,3%, odnosno 12-14,9%) [11, 44, 45, 53-56]. Unatoč tomu što se tip 2 adenovirusa u nas učestalije javljao nego kod drugih istraživača, ipak su trendovi pojavljivanja pojedinih tipova i vrsta slični onima u drugim istraživača. Stoga smatramo da se hipoteza kako se udio pojedinih tipova, odnosno vrsta adenovirusa među adenovirusnim infekcijama dišnog sustava u djece u Gradu Zagrebu i okolici (Zagrebačka županija) ne razlikuje u odnosu na njihovu raspodjelu u drugim područjima svijeta s umjerenom klimom može prihvatiti.

**Tablica 26. Učestalost dokazanih tipova adenovirusa na godišnjoj razini kontinuirano od prosinca 2006. do studenog 2008. godine**

Godine	Tip adenovirusa n (%) [95% CI]						Ukupno n (%)
	1	2	3	5	6	4 i 7	
<b>2006/07</b>	7 (7,9) [3,6; 15,6]	67 (75,3) [65,3; 83,1]	14 (15,7) [9,5;24,8]	0 (0)	1 (1,1) [0,01;6,7]	0 (0)	89 (100)
<b>2007/08</b>	34 (26,8) [19,8; 35,1]	76 (59,8) [51,1; 67,9]	14 (11,0) [6,6; 17,8]	1 (0,8) [0,01; 4,8]	2 (1,6) [0,08; 5,9]	0 (0)	127 (100)
<b>Ukupno za razdoblje n (%)</b>	41 (18,9)	143 (66,2)	28 (12,9)	1 (0,5)	3 (1,5)	0 (0)	216 (100)

**Tablica 27. Udio pojedinih tipova adenovirusa koji uzrokuju infekcije dišnog sustava u svijetu**

Autori	Tip adenovirusa (%)							Područje	Razdoblje
	1	2	3	4	5	6	7		
<b>Brandt i sur. (53)</b>	26,3	34,5	10,0	0,2	10,6	1,1	3,3	Columbia, SAD	1957-1967
<b>Schmitz i sur. (45)</b>	20,4	25,4	13,0	2,4	11,0	2,4	19,3	SZO podaci za cijeli svijet	1967-1976
<b>Kružić i sur. (56)</b>	17,5	18,5	12,0	1,0	10,0	0	43,0	Grad Zagreb, RH	1979
<b>Kulundžić i sur. (55)</b>	16	16	12	0	10	4	42	Grad Zagreb, RH	1981
<b>Cooper i sur. (44)</b>	12,1	18,6	14,9	7,3	6,5	1,8	7,8	Manchester, UK	1982-1996
<b>Sakamoto i sur. (113)</b>	17,2	18,3	55,0	0,4	6,7	2,4	0	Yamagata, Japan	1986-1991
<b>Lin i sur. (112)</b>	N/D <sup>1</sup>	6-28	2-68	0-52	N/D <sup>1</sup>	N/D <sup>1</sup>	0-45	Tajvan	1981-2001
<b>Yeung i sur. (54)</b>	18	26	46	1	1	1	0	Toronto, Kanada	2007/2008
<b>Moro i sur. (11)</b>	34,6	32,0	15,4	3,8	3,8	0	1,3	Syracusa, SAD	1998-2007
<b>Naši rezultati</b>	18,9	66,2	12,9	0	0,5	1,5	0 <sup>2</sup>	Grad Zagreb, RH	2006-2008

Kratice: N/D=nije dostupno; SZO= Svjetska zdravstvena organizacija

<sup>1</sup> Lin i sur. (112) su učestalost tipova 1, 5 i 6 prikazali skupno (6-19%)

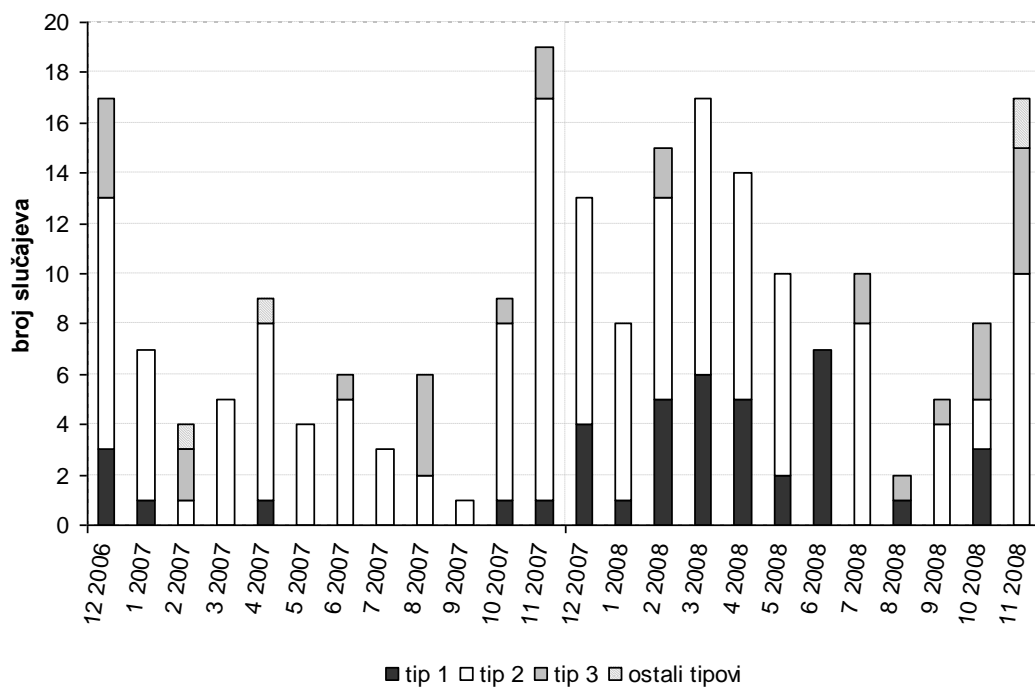
<sup>2</sup> bio je jedan izolat tipa 7 adenovirusa u ožujku 2006. godine

## **Hipoteza 2**

Kontinuirano pojavljivanje tip 2 (vrsta C) adenovirusa jasno je uočeno tijekom cijelog istraživnog razdoblja uz nešto manju učestalost tijekom ljetnih mjeseci (slika 22). S druge strane srodni tip 1 (vrsta C) adenovirusa nije kontinuirano izoliran tijekom istraživnog razdoblja (slika 23). Zapravo se kod tipa 1 primjećuje tendencija fluktuacije na godišnjoj razini. Naime, tip 1 adenovirusa javljao se s nešto većom učestalošću tijekom 2008. godine (26,8%), dok je u 2007. godini zabilježen (7,9%) više sporadično (tablica 26). Tip 3 (vrsta B) adenovirusa nije pokazivao značajne razlike na godišnjoj razini (15,7% i 11,0%; vidi tablicu 26), dok se na sezonskoj razini primjećuje tendencija učestalijeg pojavljivanja od kolovoza do studenog (kasno ljeto i jesen; vidi sliku 23 i tablicu 28). Hipotezu da postoje fluktuacije određenih tipova, odnosno vrsta adenovirusa moguće je djelomično prihvatiti kao uočenu tendenciju fluktuacije, zbog malog broja izolata tipa 1 i tipa 3 adenovirusa tijekom istraživnog razdoblja. Za tip 1 adenovirusa uočena je tendencija fluktuacije na godišnjoj razini, a za tip 3 na sezonskoj razini.



**Slika 23. Raspodjela dokazanih tipova adenovirusa po kalendarskim mjesecima kontinuirano od prosinca 2006. do studenog 2008. godine (n=216)**



**Tablica 28. Učestalost izoliranih tipova adenovirusa po kalendarskim mjesecima kroz cijelo razdoblje (n=216)**

Mjeseci	Tip adenovirus n (%) [95% CI]				Ukupno
	1	2	3	ostali tipovi	
<b>siječanj</b>	2 (13,3) [3,7; 37,9]	13 (86,7) [62,1; 96,3]	0 (0)	0 (0)	15
<b>veljača</b>	5 (26,3) [11,8; 48,8]	9 (47,4) [27,3; 68,3]	4 (21,1) [8,5; 43,3]	1 (5,2) [0,9; 24,6]	19
<b>ožujak</b>	6 (27,3) [13,2; 48,2]	16 (72,7) [51,9; 86,9]	0 (0)	0 (0)	22
<b>travanj</b>	6 (26,1) [12,6; 46,5]	16 (69,6) [49,1; 84,4]	0 (0)	1 (4,3) [0,3; 21,0]	23
<b>svibanj</b>	2 (14,3) [4,0; 39,9]	12 (85,7) [60,1; 96,0]	0 (0)	0 (0)	14
<b>lipanj</b>	7 (53,8) [29,1; 76,8]	5 (38,5) [17,7; 64,5]	1 (7,7) [1,4; 33,3]	0 (0)	13
<b>srpanj</b>	0 (0)	11 (84,6) [56,5; 96,9]	2 (15,4) [3,1; 43,5]	0 (0)	13
<b>kolovoz</b>	1 (12,5) [0,1; 49,2]	2 (25) [6,3; 59,9]	5 (62,5) [30,4; 86,5]	0 (0)	8
<b>rujan</b>	0 (0)	5 (83,3) [41,8; 98,9]	1 (16,7) [1,1; 58,2]	0 (0)	6
<b>listopad</b>	4 (23,5) [9,1; 47,8]	9 (53,0) [30,9; 73,8]	4 (23,5) [9,1; 47,8]	0 (0)	17
<b>studeni</b>	1 (2,8) [<0,01; 15,4]	26 (72,2) [55,9; 84,3]	7 (19,4) [9,5; 35,3]	2 (5,6) [0,6; 19,1]	36
<b>prosinac</b>	7 (23,3) [11,5; 41,2]	19 (63,4) [45,4; 78,2]	4 (13,3) [4,7; 30,3]	0 (0)	30

(kratica: CI=interval pouzdanosti)

## 5. RASPRAVA

Ovim istraživanjem obuhvaćeno je 290 bolesnika kojima je u NFS-u izoliran adenovirus (2006-2008. godine). Stoga je ono jedno od obuhvatnijih i novijih istraživanja adenovirusnih infekcija u djece u Hrvatskoj. Prethodno provedenim studijama na ovom području obuhvaćen je manji broj bolesnika s dokazanom adenovirusnom infekcijom dišnog sustava. U istraživanje, provedeno 1979. godine, uključeno je 101 dijete s ARI-jem uzrokovanim adenovirusom (56), a 1981. godine 50-ero djece, kojima je u brisu ždrijela izoliran adenovirus (55). Budući da se sustavno ne prati pojavljivanje tipova, odnosno vrsta, adenovirusa, ovo su prvi podaci o kliničkim osobitostima infekcija prema uzročnom tipu, odnosno vrsti adenovirusa na ovom području.

Tijekom istraživanog perioda najčešće je bio izoliran tip 2 adenovirusa (63,3%), zatim tip 1 (19,1%) te tip 3 (15,6%). Ostali izolirani tipovi (5, 6 i 7) javljali su se sporadično. Tipovi 4 i 14 adenovirusa nisu izolirani. Ovi rezultati se značajno razlikuju od rezultata prethodnih istraživanja provedenih prije 30-ak godina na istom području (55, 56). U istraživanju provedenom na ovom području 1981. godine od ukupno 50 izolata adenovirusa najčešće je bio izoliran tip 7 (42%), zatim tip 1 (16%), tip 2 (16%), tip 3 (12%), tip 5 (10%) te tip 6 (4%) adenovirusa (55). Do sličnih se rezultata došlo i u prethodnom domaćem istraživanju, iz 1979. godine, u kojem je od ukupno 102 izolirana soja virusa kod akutnih IGDS-a, 70 pripadalo rodu adenovirusa. U bolesnika s akutnim IGDS-om također je najčešće bio izoliran tip 7 (46%) adenovirusa, a zatim su slijedili tip 2 (19%), tip 1 (14%), tip 3 (11%) i tip 5 (10%). S druge strane, od ukupno 57 izolata virusa u bolesnika s akutnim IDDS-om bio je 31 izolat adenovirusa i isto je najčešće bio izoliran tip 7 (35%) adenovirusa, a zatim tip 1 (23%), tip 2 (16%), tip 3 (13%), tip 5 (10%) i tip 4 (3%) (56). Epidemije

uzrokovane tipom 7 adenovirusa karakterizira nepravilno periodično kretanje kroz nekoliko godina (45). Moguće je da su ova dva prethodna domaća istraživanja (1979. i 1981. godine) provedena u vrijeme trajanja epidemija ovim tipom, dok je ovo naše istraživanje bilo u vrijeme kad nije bilo epidemije uzrokovane tipom 7 adenovirusa. Wadell i sur. (110) analizirali su epidemije uzrokovane tipom 7 adenovirusa u Švedskoj (1958-1977) te u Engleskoj i Walesu (1971-1977) i utvrdili da su epidemije uzrokovane tipom 7 u Švedskoj bile 1959. i 1964. godine, dok je u preostalom istraživanom razdoblju bio mali broj izolata ovog tipa adenovirusa. U Engleskoj i Walesu epidemije uzrokovane tipom 7 adenovirusa zabilježene su tijekom 1973. i 1974. godine, a isti tip je, također izvan epidemijskih godina, rijetko izoliran (110). Rezultati našeg istraživanja u skladu su s rezultatima velike studije Brandta i sur. (53) koji su tijekom 10 godina, u kliničkim materijalima (bris ždrijela i/ili anusa) 1769 dojenčadi i djece u SAD-u izolirali ukupno 1792 soja adenovirusa. Najzastupljeniji je bio tip 2 (35%), zatim je slijedio tip 1 (26%), pa tip 5 (11%) te tip 3 (10%) adenovirusa. Tipove 4 i 7 koji obično uzrokuju ARI u vojnih ročnika izolirali su u manje od 4% slučajeva. Tipove 8, 14, 17 i 19 nisu izolirali (53). Do sličnih rezultata su nešto kasnije došli i Cooper i sur. (44). U Velikoj Britaniji u periodu 1982-1996. godine između 3098 izolata adenovirusa bilo je: 24% tipa 2, 14,9% tipa 3 te 12,1% tipa 1 adenovirusa (44). Moro i sur. (11) su u 78 bolesnika s adenovirusnom infekcijom dišnog sustava najčešće izolirali adenoviruse vrste C, prvenstveno tip 1 (27/78; 34%) i tip 2 (25/78; 32%), dok su infekcije uzrokovane vrstom B, prvenstveno tipom 3 (12/78; 15%) adenovirusa, rjeđe zabilježene. Tipovi 4, 5 i 7 bili su sporadično izolirani (11). Za razliku od naših rezultata, Yeung i sur. (54) su na području Toronta, u Kanadi (od rujna 2007 do lipnja 2008. godine), najčešće izolirali tip 3 (44/96; 46%) adenovirusa, zatim tip 2 (25/96; 26%), tip 1 (17/96; 18%) te tip 5 (5/96; 5%) adenovirusa. Tip 14 nisu izolirali (54). Većinu ARI uzrokovali su adenovirusi vrste B i C (93/96; 97%) što odgovara i našim rezultatima, odnosno rezultatima ranije provedenih istraživanja (45, 54, 111). Lin i sur. (112) su u Tajvanu

(1981-2001. godine) izolirali pripadnike vrste B (45%) adenovirusa, zatim vrste E (28%) te vrste C (25%). Najzastupljeniji je bio tip 3 adenovirusa koji se, uz značajne oscilacije u učestalosti (2-68%), javljao tijekom cijelog istraživanog razdoblja. U istom su razdoblju zabilježene i epidemije uzrokovane tipom 4 (2000. i 2001. god.) te tipom 7 (1999. i 2000. god.) adenovirusa (112). U velikom longitudinalnom istraživanju u Yamagati, u Japanu (1986-1991. god.), adenovirus je izoliran u 989 (3,7%) djece s ARI-jem. Svim izolatima adenovirusa su određeni tipovi, a nađeni su samo tipovi 1-6 adenovirusa (113). U velikom istraživanju Schmitza i sur. (45) tip 2 adenovirusa je izoliran u 25% slučajeva, zatim je slijedio tip 1 (20%), potom u visokom udjelu tip 7 (19,7%), te tip 3 (13%) i tip 5 (11%) adenovirusa. Ostali tipovi su se javljali s puno manjom učestalošću (45). Pripadnici vrste C, prema izvješćima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), čine 59% svih tipiziranih adenovirusa. Prema tim izvješćima, relativna učestalost pojavljivanja tipa 2 bila je 25%, tipa 1 20,4%, tipa 5 11% i tipa 6 adenovirusa 2,4% (111). I kod nas su prevladavali pripadnici vrste C (posebno tip 2) adenovirusa.

U ovom istraživanju većina djece s adenovirusnom infekcijom dišnog sustava bila je u dobi 1-4 godina (240/290; 83%), zatim je bilo 13% (39/290) dojenčadi (0-11 mjeseci), a najmanje u dobi iznad 4 godine (11/290; 4%). U dojenačkoj dobi većina je bila starija od 5 mjeseci (30/39; 77%). To bi moglo upućivati na to da majčina protutijela pružaju učinkovitu zaštitu u ranoj dojenačkoj dobi. Srednja dob adenovirusom zaražene djece u ovom istraživanju bila je 22,4 mjeseca, a medijan 20 mjeseci. Dominguez i sur. (60) izvijestili su o srednjoj dobi od 37 mjeseci te medijanu od 28 mjeseci, a 87% ispitamika bilo je mlađe od 5 godina. U istraživanju Rocholl i sur. (114) srednja dob bila je 23 mjeseca i 90% djece bilo je mlađe od 5 godina.

Uočili smo statistički značajnu razliku u pojavljivanju pojedinih tipova u odnosu na dobnu skupinu. Tip 1 adenovirusa izoliran je samo u dojenčadi i djece do 4 godina

starosti. Tip 2 adenovirusa se značajno češće pojavljivao u onih u dobi 1-4 godine (136/256; 53%). Tip 3 adenovirusa pojavljivao se u svim dobnim skupinama. Međutim, rijetko je zabilježen u dojenčadi, a bio je najzastupljeniji tip u djece starije od 4 godina (6/9; 67%). Ovi rezultati su u skladu s literaturnim podacima koji su pokazali da se određeni tipovi adenovirusa češće javljaju u određenoj dobi (45, 52). U istraživanju Kulundžić i sur. (55) među 50-oro djece s adenovirusnom infekcijom dišnog sustava većina je bila u dobi 7-24 mjeseca (raspon dobi 1-72 mjeseca). U dobi do 6 mjeseci podjednako su bili zastupljeni tipovi 1, 2 i 5 adenovirusa. Tipovi 1 i 7 prevladavali su u dobi 6-12 mjeseci. U djece 13-24 mjeseca starosti uglavnom su izolirani tipovi 2 i 7, a u djece starije od 2 godine tip 7 adenovirusa (55). Rubin (52) je pokazao da su pripadnici vrste C (tipovi 1, 2, 5 i 6) adenovirusa većinom izolirani u dojenčadi i djece do 4 godine, tip 3 u dobi 5-14 godina te tip 7 adenovirusa u školskoj dobi (5-14 godina) i u odraslih (stariji od 15 godina). Cooper i sur. (44) su tipove 2, 5 i 6 adenovirusa također češće našli u dojenčadi i male djece, a srodni tip 1 je prevladavao u dojenčadi. Tip 3 adenovirusa se s većom učestalošću pojavljivao u male djece (1-4 godine) i u starijih od 15 godina (44). I Schmitz i sur. (45) su pripadnike vrste C najčešće izolirali u djece do 4 godine starosti, a vrlo rijetko u odraslih. Za razliku od naših rezultata, u istraživanju Mora i sur. (11) većina ispitanika s adenovirusnom infekcijom (raspon dobi: 1 mjesec do 14 godina) bila je mlađa od godine dana (51%). U dojenčadi su dominirali tipovi 1 i 2, dok se tip 3 adenovirusa češće pojavljivao u starijih od godine dana (11), kao i u našem istraživanju. U istraživanju provedenom u Kanadi većina adenovirusa (73%) izolirana je iz kliničkih materijala djece mlađe od 5 godina (54). U studiji provedenoj među djecom s adenovirusnom infekcijom u Japanu (113) bilo je 9% dojenčadi. Također je uočen različiti obrazac pojavljivanja određenih tipova ovisno o dobi. Kao i kod nas, većina djece s infekcijom uzrokovanom vrstom C adenovirusa bila je mlađa od 2 godine. Međutim, vrh učestalosti infekcija uzrokovanih vrstom B (tipom 3) bila je u dobi 3-5 godina (113). U istraživanju provedenom u Tajvanu nađeno je da je

79% djece s adenovirusnom infekcijom bilo mlađe od 7 godina, a mlađe od 5 godina 62%. Prevladavale su infekcije uzrokovane tipovima 3 i 7 adenovirusa (67%), i to, posebno, u djece starije od 3 godine (112).

Među djecom s dokazanom adenovirusnom infekcijom našli smo veću zastupljenost djece muškog spola (201/290; 69%). Odnos muško naprama žensko dijete bio je 2,25:1. Isto tako je, i u hospitalizirane djece, bio veći udio muške djece (103/135; 76%). U ambulantno obrađenih bolesnika odnos muško naprama žensko dijete bio manji nego u bolnički liječenih (1,72:1 naprama 3,22:1). Prema dostupnoj literaturi, zastupljenost muške djece s adenovirusnom infekcijom dišnog sustava je oko 60%, a odnos muško naprama žensko dijete je oko 1,5:1 (60, 114, 115). S obzirom na tipove adenovirusa, Cooper i sur (44) su uočili da su muška djeca sklonija infekciji respiratornim tipovima adenovirusa (pripadnika vrste C i E) od ženske djece. Kod infekcija uzrokovanih tipovima 4, 6 i 7 adenovirusa nisu primijetili razlike između spolova (44). Za najčešće izolirane tipove 1, 2 i 3 adenovirusa, i drugi su autori uočili da dječaci češće oboljevaju (2:1), kao i da značajno češće budu hospitalizirani (11, 112). Schmitz i sur. (45) su našli da su muška djeca bila češće zaražena većinom tipova adenovirusa od ženske djece, uz iznimku tipova 8 i 13 te ostalih tipova koji pripadaju vrsti A i D adenovirusa. Cheng i sur. (116) nisu našli značajnu razliku u pojavljivanju infekcija uzrokovanih tipom 3 adenovirusa, odnosno ne-3 tipovima (tipovi 1, 2, 4-7), između spolova (59,5%, odnosno 63,5% muške djece). Do sličnih je rezultata (55,8% muške djece; odnos muško naprama žensko dijete=1,2:1) došla i druga skupina autora, u istraživanju provedenom u sjevernom Tajvanu tijekom epidemije uzrokovane tipom 3 adenovirusa (117).

Kod nas je prevladavao tip 2 adenovirusa koji se javljao kontinuirano kroz cijelo istraživano razdoblje uz nešto manju učestalost tijekom ljetnih mjeseci. S druge strane srodni tip 1 (vrsta C) nije izoliran kontinuirano već je uočena tendencija

fluktuacije na godišnjoj razini. Tip 1 bio je nešto učestalije izoliran tijekom 2006. godine, zatim iznimno rijetko tijekom 2007. godine, i onda ponovno učestalije tijekom 2008. godine, posebno, u prvih šest mjeseci. Tip 3 (vrsta B) adenovirusa bio je izoliran u manjem broju i s nepravilnom učestalošću svake godine. Nije bila primijećena fluktuacija na godišnjoj razini. Međutim, na sezonskoj razini bila je primijećena tendencija učestalijeg pojavljivanja u periodu od kolovoza do studenog (kasno ljeto i jesen). Nedostaci ovog istraživanja su relativno mala učestalost pojedinih tipova, kao što su tip 1 (n=49) i tip 3 (n=40) adenovirusa te nemogućnost određivanja tipa dijelu izolata adenovirusa (n=34).

Prema literaturnim podacima tipovi 3 i 7 (vrsta B) adenovirusa pokazuju epidemijsko pojavljivanje. Izvješća SZO pokazuju da su se epidemije uzrokovane tipom 3 javljale u razdobljima 4-5 godina, dok za tip 7 nije bio uočen jasan obrazac pojavljivanja (111). Tijekom ovog istraživanja bio je relativno mali broj izolata tipa 3 adenovirusa, ali je krajem istraživanog perioda bila uočena tendencija grupiranja koja bi mogla ukazivati na početak epidemije. Pripadnici vrste C, prema izvješćima SZO, čine 59% izolata svih adenovirusa i smatra se da imaju endemijski karakter pojavljivanja (111). Slično podacima SZO, i kod nas je tip 2 bio najčešće te kontinuirano izoliran. Ostali pripadnici vrste C adenovirusa pojavljivali su se rijeđe i nepravilno (tip 1), odnosno sporadično (tipovi 5 i 6). Gledajući godišnju raspodjelu pojavljivanja adenovirusnih infekcija tijekom 10-godišnjeg praćenja, Schmitz i sur. (45) nisu našli značajnu razliku između tzv. endemskih (pripadnika vrste C: tipovi 1, 2, 5 i 6), odnosno epidemijskih tipova (tipovi 3, 7, 4 i 8) adenovirusa. Iako je uočena povećana učestalost ARI-ja uzrokovanih pripadnicima vrste C adenovirusa tijekom zime i proljeća, a tipovima 3 i 7 u kasno ljeto (kolovoz, rujna). Tipovi 7 i 8 adenovirusa imali su značajno veće incidencije u određenim godinama (45). Cooper i sur. (44) našli su značajnu razliku, u pojavljivanju po mjesecima, između srodnih tipova 3 i 7 adenovirusa. Za tip 7 našli su povećanu incidenciju u proljeće i ljeto, dok za tip 3 nisu nađene sezonske varijacije, nego oscilacije po godinama. Tip 1 nije



pokazivao sezonske varijacije. Tip 2 se učestalije javljao od siječnja do travnja (44). Kod nas je vrh incidencije tipa 2 bio tijekom studenog i prosinca. Cooper i sur. su tip 6 adenovirusa uglavnom sporadično zabilježili (0-4,1%), dok su nešto učestalije izolirani tipovi 4 (213/2904; 7%) i 5 (188/2904; 6%) adenovirusa (44). Brandt i sur. (118) su tijekom 10-godišnjeg perioda, u dojenčadi i djece s adenovirusnom infekcijom dišnog sustava, svake godine, uz manje oscilacije u učestalosti, najčešće izolirali tip 2 adenovirusa, a zatim su slijedili tip 1, tip 3 te tip 5 adenovirusa. U tom periodu zabilježena je epidemija uzrokovana tipom 2 (1962. godine). Potom je 1965. godine uočena nešto veća učestalost infekcija uzrokovanih tipom 3 adenovirusa. Adenovirusne infekcije javljale su se tijekom toplijih i hladnijih perioda. Visoke incidencije adenovirusnih ARI-ja zabilježene su tijekom zime i proljeća, a značajno manje u jesen. Najizraženije varijacije u učestalosti po mjesecima uočene su za tipove 1 i 2 adenovirusa, uz najmanju učestalost u listopadu (118). Tijekom 6-godišnjeg istraživanja u Japanu, Sakamoto i sur. (113) su tipove 1 i 2 (vrsta C) adenovirusa izolirali svaki mjesec tijekom cijelog razdoblja istraživanja, učestalije od travnja do srpnja, odnosno rjeđe u kolovozu i rujnu. I srodni tipovi 5 i 6 (vrsta C) iako su izolirani u manjem broju, pokazivali su sličnu sezonsku raspodjelu. Za razliku od pripadnika vrste C, tip 3 (vrsta B) adenovirusa uzrokovao je tri epidemije koje su se uvijek javljale tijekom jeseni ili zime. No i izvan epidemijskog razdoblja tip 3 je kontinuirano izoliran svakog mjeseca. Broj izolata tipa 3 tijekom ljetnih mjeseci bio je značajnije manji u odnosu na tipove 1 i 2 (113). Lin i sur. (112) su, među djecom u južnom Tajvanu (1981-2001. god.), izolirali 524 adenovirusa te našli najmanje 7 različitih tipova adenovirusa (tip 1, 5, 6, 2, 3, 4, 7 i 14). Tijekom tog razdoblja učestalost tipa 3 značajno je varirala. U razdoblju 1981-1989. izoliran je u 68% slučajeva, zatim 1990-1998. godine u 44%, 1999. i 2000. godine u 36%, a 2001. samo u 2% (112). Ove epidemije su se obično javljale od studenog do ožujka. U periodu 1981-1998. godine bilo je 3% izolata tipa 7 adenovirusa, zatim tijekom 1999. godine 45%, 2000. godine 21%, te pad učestalosti na 1% u 2001. godini

(112). Epidemije uzorkovane tipovima 4 i 7 adenovirusa zabilježene su i u Velikoj Britaniji (44), Japanu (119) i Koreji (120). U našem istraživanju tip 4 nije bio izoliran, a bio je samo 1 izolat tipa 7 adenovirusa. U djece do 15 godina starosti, u Madridu (2000-2003. godine), vrh učestalosti adenovirusnih infekcija bio je u proljeće, a najveći broj bio je zabilježen u travnju (60). No isto tako, visoka incidencija adenovirusnih infekcija bila je tijekom zime te se nastavila i tijekom ljetnih mjeseci. Značajnije smanjenje učestalosti uočili su tek u jesen, od rujna do studenog (60). I kod nas su se adenovirusne infekcije javljale tijekom cijele godine, uz nešto manju učestalost tijekom ljetnih mjeseci.

U ovom je istraživanju bolnički liječeno 135 (46%) bolesnika. Dvoje hospitaliziranih bolesnika imalo je koinfekciju s RSV-om te su stoga isključeni iz analize kliničkih osobitosti.

Što se tiče kliničkih simptoma i znakova infekcije uzrokovane adenovirusom, kašalj je bio izražen u 71% bolesnika. Odnosno, ovisno o uzročnom tipu, kašalj je bio prisutan u 67% bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 1 adenovirusa, u 78% s tipom 2 te u 87% s tipom 3. Dok je prema uzročnoj vrsti, kašalj zabilježen u 81% bolesnika s infekcijom uzrokovanom vrstom B te u 70% s vrstom C adenovirusa.

Najizraženiji simptom u naših bolesnika bila je sekrecija iz nosa koja je bila prisutna u 89% bolesnika, bez razlike između tipova, odnosno vrsta, adenovirusa. Prethodna istraživanja, drugih istraživača, također su izvijestila o visokoj učestalosti kašlja u rasponu od 71,4% do 74,8%, odnosno sekrecije iz nosa od 67,1 do 83,7% (58, 116). No, u literaturi se nalaze i značajnije manje učestalosti kašlja i/ili sekrecije iz nosa u bolesnika s adenovirusnim infekcijama, od samo 22% (60).

Infekcije dišnog sustava uzrokovane adenovirusom očituju se u različitim kliničkim oblicima uključujući: faringitis, ET, faringokonjunktivalna groznica i pneumonija (38). Kod većine ovih kliničkih oblika povišena tjelesna temperatura je bez sumnje vodeći

klinički simptom. Visoka tjelesna temperatura u male djece uvijek budi sumnju na mogućnost postojanja bakterijske infekcije (60).

Tako je u većine bolesnika izmjerena povišena tjelesna temperatura. Tjelesnu temperaturu iznad 38,0°C imalo je 98% bolesnika, s medijanom 39,9°C, rasponom 38,0°C - 41,5°C i srednjom vrijednosti od 39,8°C. Dvoje bolesnika nije imalo povišenu tjelesnu temperaturu. Visoku tjelesnu temperaturu (>39,0°C) imalo je 86% bolesnika, a izrazito visoku tjelesnu temperaturu (>40,0°C) 26% bolesnika. Povišena tjelesna temperatura kod adenovirusne infekcije odražava pirogeno svojstvo adenovirusa, odnosno odgovarajućeg imunog odgovora te stvaranja kompleksa adenovirusa i specifičnih protutijela (121). Srednja vrijednost najviše izmjerene tjelesne temperature u naših bolesnika bila je malo veća nego u nekim drugim istraživanjima, u kojima je ona bila, uglavnom, u rasponu 39,0 - 39,6°C (59, 60, 112, 114, 116).

Medijan trajanja povišene tjelesne temperature u febrilnih bolesnika bio je 5 dana, raspon 2-13 dana te prosječno trajanje febriliteta 5,3 dana. U 72% febrilnih bolesnika povišena tjelesna temperatura trajala je duže od 3 dana. Nije uočena razlika u visini izmjerene tjelesne temperature ili u njezinom trajanju između izoliranih tipova, odnosno vrsta adenovirusa. Prethodna istraživanja, drugih istraživača, također su izvijestila da je u većine bolesnika (71-98%) najviša izmjerena tjelesna temperatura bila iznad 39,0°C (11, 59, 60, 112, 114) i da je trajanje povišene tjelesne temperature bilo duže od 3 dana (11, 59, 60, 112, 114, 116).

U ovom istraživanju, od 133 hospitalizirana bolesnika s adenovirusnom infekcijom, 41 (30%) je imao blagi oblik kataralnog IGDS-a (rinitis, rinofaringitis i tonzilitis), a 33 (25%) bolesnika ET. OMA je bila zabilježena u 37 (28%) bolesnika. Dvoje bolesnika (1,5%) imalo je krup. Konjunktivitis je bio zabilježen u 11 (8%) bolesnika. Bilo je 12

(9%) bolesnika s IDDS-om, s jednakom učestalošću bronhitisa (6/133; 4,5%) i pneumonije (6/133; 4,5%). GEC je, kao sekundarnu dijagnozu, imalo 33 (25%) bolesnika. Infekcija adenovirusom, neovisno o tipu (tipovi 1, 2 i 3) ili vrsti (B ili C), uglavnom se očitovala nekim oblikom IGDS-a.

U 66% bolesnika ždrijelo je bilo kataralno promijenjeno. Tonzilitis je zabilježen u 59% bolesnika, od čega je 41% (33/79) imalo ET. U 64% (21/33) bolesnika s ET-om nađeni su i povećani limfni čvorovi vrata. Budući da je u samo dva djeteta s tonzilitisom, u brisu ždrijela izoliran je *S. pyogenes*, a u preostale djece izolirana normalna bakterijska flora, možemo reći da je u ovih bolesnika uzročnik ET-a bio adenovirus. Nije primijećena razlika u učestalosti pojavljivanja tonzilitisa, odnosno ET-a između dokazanih tipova, odnosno vrsta adenovirusa. I u prethodno objavljenim studijama drugih istraživača nađena je značajna učestalost ET-a u djece s adenovirusnom infekcijom, u rasponu 24,2-50,8% (60; 117, 116).

OMA-u smo zabilježili u 28% (37/133) bolesnika. Učestalost OMA-e među bolesnicima s infekcijom uzrokovanom tipom 2 adenovirusa bila je nešto veća u odnosu na tip 1, odnosno tip 3 adenovirusa (36% naprama 17%, odnosno 13%;  $p=0,062$ ). Od ukupno 37 bolesnika s OMA-om u osmero je u brisu nazofarinksa izolirana je *M. catarrhalis*, u četvero *H. influenzae* i u dvoje *S pneumoniae*, a u ostalih normalna bakterijska flora. U bolesnika s OMA-om nije prikupljena tekućina iz srednjeg uha timpanocintezom te nismo bili u mogućnosti utvrditi postojanje nekog bakterijskog ili virusnog uzročnika infekcije. Međutim, budući da je u većine bolesnika u brisu nazofarinksa ipak izolirana normalna bakterijska flora možemo zaključiti da ovi nalazi govore u prilog pretpostavci da adenovirus može uzrokovati OMA-u. O povezanosti nove epizode OMA-e i ARI-ja uzrokovanih respiratornim virusima izvijestili su Alper i sur. (122). Oni su u NFS-u djece određivali prisutnost respiratornih virusa (rinovirus, adenovirus, RSV, koronavirus, virus influence tip A i

tip B te virus parainfluence). Udio OMA-e u bolesnika s infekcijom uzrokovanom rinovirusom bila je 44%, RSV-om 56%, adenovirusom 50%, koronavirusom 39%, virusom parainfluence 36%, 73% tipom A, odnosno 20% tipom B virusa influence (122). Rocholl i sur. (114) su svom u istraživanju zabilježili 6% slučajeva OMA-e među bolesnicima s adenovirusnom infekcijom (114).

Konjunktivitis smo našli u 8% (11/133) bolesnika. Učestalost konjunktivitisa u bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 1 adenovirusa bila je nešto veća nego s tipom 2, odnosno tipom 3 (20% naprama 5%, odnosno 13%,  $p=0,3478$ ). Faringitis udružen s konjunktivitisom zabilježen je u 10/133 (7,5%) bolesnika. Za razliku od nas, Dominguez i sur. (60) su našli nešto veću učestalost konjunktivitisa (17%) među bolesnicima s IGDS-om uzrokovanom adenovirusom (60). S druge strane, u velikom istraživanju Schmitz i sur. (45) su našli samo 1% konjunktivitisa. Najčešće su bili izolirani tipovi 8 i 19, poznati kao uzročnici epidemijskog keratokonjunktivitisa, dok su tipovi 1, 2 i 3 adenovirusa, poznati kao uzročnici faringokonjunktivalne groznice, tek sporadično izolirani (45).

IDDS (bronhitis i/ili pneumonija) imalo je 12 (9%) bolesnika, s jednakom raspodjelom bronhitisa i pneumonije. Učestalost IDDS-a u bolesnika s infekcijom uzrokovanom vrstom B adenovirusa bila je značajno veća nego s vrstom C (31% naprama 6%;  $p=0,004$ ). U brisu nazofarinksa dvoje djece s IDDS-om izolirana je *H. Influenzae*, u još dvoje *M. Catarrhalis* i u jednog djeteta *S. pneumoniae*. U ovih bolesnika bile su uzete i hemokulture koje su ostale sterilne. Uzročnik bakterijskog porijekla u bolesnika s IDDS-om nije bio dokazan. Rendgenogram je učinjen u sve djece s IDDS-om. Patološke promjene u rendgenogramu pluća imalo je 80% bolesnika. Prethodno provedena istraživanja drugih istraživača izvijestila su o sličnoj učestalosti IDDS-a (10-19%), uključujući bronhitis i pneumoniju (11, 117). Najčešće su, kao i kod nas, kod IDDS-a bili izolirani tipovi 1, 2 i 3 adenovirusa. Međutim, u

drugim istraživanjima nađene su i znatno veće učestalosti IDDS-a, u rasponu od 24% do 59% (45, 58, 59, 114, 116). Najčešće izolirani uzročnici IDDS-a bili su: tip 2, tip 1 pa tip 7 adenovirusa (45, 58, 59, 114), dok je u jednom istraživanju prevladavao tip 3 adenovirusa (116).

Iako su izolirani tipovi adenovirusa u našem istraživanju primarno uzročnici infekcija dišnog sustava, u 25% bolesnika zabilježili smo i prateće probavne smetnje (povraćanje i/ili proljev). Učestalost pratećih probavnih smetnji u bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 3 adenovirusa bila je nešto veća nego s tipom 1 odnosno s tipom 2 (40% naprama 20%, odnosno 29%;  $p=0,1378$ ). Ovaj trend je vidljiv i u bolesnika s infekcijom uzrokovanom vrstom B u odnosu na vrstu C (44% naprama 22%;  $p=0,118$ ) adenovirusa. Slično našima rezultatima, prateće probavne smetnje zabilježene su u 16-33% bolesnika s adenovirusnom infekcijama dišnog sustava uzrokovanim pripadnicima vrste C i B adenovirusa (45, 53, 112). Međutim, u nekim prethodnim istraživanjima autori su prateće probavne smetnje opisali u 2-5% bolesnika (11, 114). Odnosno, u dostupnoj literaturi ima izvještaja i o značajno većoj učestalosti pratećih probavnih smetnji u bolesnika s adenovirusnom infekcijom dišnog sustava, u rasponu od 52,9% do 57,3% (116, 117). Kao i kod nas, nešto veća učestalost probavnih smetnji zabilježena u bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 3 adenovirusa (116, 117).

Kožne promjene bile su izražene u 11% bolesnika s adenovirusnom infekcijom dišnog sustava u kojih je drugi uzrok pojave osipa bio isključen. Osip se javljao s gotovo jednakom učestalošću u bolesnika s infekcijom uzrokovanom vrstom B, odnosno vrstom C (12% odnosno 13%) adenovirusa. U prethodno objavljenim istraživanjima nađene su manje učestalosti osipa (5,1-7,1%) u bolesnika s adenovirusnom infekcijom dišnog sustava (112, 116)

Povećane koncentracije CRP-a izmjerene su u 86% bolesnika (114/133). Raspon CRP-a bio je 0,5-227,1 mg/l, medijan 53 mg/l te srednja vrijednost 59,8 mg/l. Iako su u bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 3 adenovirusa (vrsta B) srednje vrijednosti CRP-a bile nešto manje u odnosu na one s tipovima 1 i 2 (vrsta C), razlike nisu bile statistički značajne. U više od polovine naših bolesnika vrijednosti CRP-a bile su >40 mg/l (74/133; 56%), odnosno čak i >50 mg/l (69/133; 52%). Tako visokim vrijednostima CRP-a ove infekcije oponašaju bakterijsku infekciju. U 20% bolesnika (27/133) CRP je bio >100 mg/l. S druge strane, 12% (16/133) bolesnika imalo je normalne vrijednosti CRP-a ( $\leq 10$  mg/l). Koncentracije CRP-a  $\geq 40$  mg/l nađene se u 79% bolesnika s bakterijskom infekcijom u dječjoj dobi, dok se za koncentracije CRP-a u rasponu 20-40 mg/l smatralo da nije moguće odrediti porijeklo (virusno ili bakterijsko) infekcije (123). U hospitalizirane djece s infekcijom uzrokovanom adenovirusom, virusom influence, virusom parainfluence, odnosno RSV-om određen je CRP (124). Koncentracije CRP-a iznad 40 mg/l bile izmjerene u 38% bolesnika s infekcijom uzrokovanom adenovirusom, u 20% s virusom influence, 0% s virusom parainfluence, odnosno u 13% s RSV-om (124). I rezultati još nekih istraživanja su pokazali da su u bolesnika s infekcijama dišnog sustava uzrokovanih adenovirusima izmjerene visoke koncentracije CRP-a (58, 59, 124, 125). Tako su Appenzeller i sur. (59) izvijestili da su koncentracije CRP-a izmjerene u bolesnika s adenovirusnom infekcijom (49 mg/l) bile značajno veće od onih s infekcijom uzrokovanom virusom influence (9 mg/l). Ruuskanen i sur. (124) su, također, našli značajno veće koncentracije CRP-a u bolesnika s adenovirusnom infekcijom (49 mg/l) u odnosu na one u bolesnika s infekcijom uzrokovanom drugim respiratornim virusima (17,9 mg/l s RSV-om; 10 mg/l s virusom parainfluence; 23 mg/l s virusom influence). U istraživanju Kawasakija i sur. (58) u bolesnika s adenovirusnom infekcijom srednja vrijednost CRP-a je bila 32 mg/l, dok je u bolesnika s influencom bila 7,1 mg/l, odnosno s RSV infekcijom 9,7 mg/l (58). Srednje vrijednosti CRP-a, u studiji Putta i sur. (125), u bolesnika s adenovirusnom infekcijom, bile su slične

onima s infekcijom uzrokovanom BHS-A (64 mg/l, odnosno 65 mg/l) te značajno veće nego u bolesnika s Epstein-Barr infekcijom (36 mg/l). U našem istraživanju koncentracije CRP-a >70 mg/l izmjerene su u 39,9% bolesnika. Prema Pulliamu i sur. koncentracije CRP-a >70 mg/l su imale veću osjetljivost i specifičnost u postavljanju dijagnoze klinički nepotvrđenih bakterijskih infekcija u febrilne djece, no one nisu nužno bile i klinički korisnije (126). Značajno povećane koncentracije CRP-a (82 mg/l) našli su Lin i sur. (112) tijekom epidemije uzrokovane tipom 3 adenovirusa, u Tajvanu. Tijekom te epidemije u 53,6% bolesnika koncentracije CRP-a bile su >70 mg/l, odnosno >40 mg/l u 80,4% bolesnika (112). U istraživanju Domingueza i sur. (60) bilo je samo 22,5% bolesnika s koncentracijama CRP-a >70 mg/l (60). Cheng i sur. (116) su u bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 3 adenovirusa našli značajno veću srednju vrijednosti CRP-a (50,4 mg/l) u odnosu na 26,6 mg/l kod ostalih dokazanih tipova (tipovi 2, 1, 5, 7, 4 i 6) adenovirusa (116). Ovako visoke koncentracije CRP-a mogu biti posljedica visokih koncentracija IL-6 koje su izmjerene u bolesnika s adenovirusnom infekcijom dišnog sustava (58). Naime, za razliku od drugih respiratornih virusa, adenovirusi uzrokuju značajan upalni odgovor u određenih pojedinaca (59). Mistchenko i sur. (127) su određivali koncentracije citokina u serumu bolesnika s adenovirusnom IDDS. Zaključili su da su IL-6 i TNF- $\alpha$ , značajni stimulatori sinteze CRP-a u jetri. Koncentracije IL-6 i TNF- $\alpha$  bile su značajno povišene u bolesnika s teškim oblikom IDDS-a, ali ne i u onih s blažim oblikom bolesti (127). Koncentracije IL-6 u serumu značajno su veće u bolesnika s infekcijom uzrokovanom adenovirusima nego virusom influence (128). Rezultati Kawasakija i sur. (58) su pokazali snažnu povezanost između koncentracija IL-6 i CRP-a. Koncentracije IL-6 u serumu bolesnika s adenovirusnom infekcijom dišnog sustava bile su značajno veće od onih s infekcijom uzrokovanom virusom influence ili RSV-om (131 pg/ml u odnosu na 26,7 pg/ml, odnosno 15,0 pg/ml) [58].



Ubrzana SE nađena je u 85% (108/127) bolesnika s adenovirusnom infekcijom. Raspon brzine SE bio je 5-110 mm/h, medijan 40 mm/h te srednja vrijednost 45,3 mm/h. Srednje vrijednosti brzine SE za tip 1, tip 2, odnosno tip 3 adenovirusa bile su 42,8 mm/h, 48,2 mm/h, odnosno 29,3 mm/h te za vrstu B, odnosno vrstu C 29,6 mm/h, odnosno 47,6 mm/h. Uočeno je da je brzina SE u bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 3 (vrsta B) adenovirusa značajno manja nego s tipom 1, odnosno tipom 2 (vrsta C) adenovirusa ( $p=0,008$  za tipove, odnosno  $p=0,003$  za vrstu). To treba uzeti s oprezom jer, unatoč zadovoljavajućem uzorku ( $n=112$ , odnosno  $n=116$ ), ukupan broj bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 1, odnosno tipom 3 (vrsta B) adenovirusa, u istraživanom razdoblju u hospitalizirane djece bio je relativno mali ( $n=24$ , odnosno  $n=15$ ), a to utječe na snagu statističkog testa. Putto i sur. (123) su u 89% bolesnika s virusnom ili mogućom virusnom infekcijom našli vrijednosti SE  $<30$  mm/h, dok je SE  $\geq 30$  mm/h nađena u 91% bolesnika s bakterijskom infekcijom. U našem istraživanju u 68% bolesnika brzina SE bila je  $\geq 30$  mm/h. Tako ubrzana SE bi također je išla u prilog tvrdnji da i prema ovom parametru adenovirusi oponašaju bakterijsku infekciju. Kawasaki i sur (58) su izvijestili da je srednja vrijednost SE u bolesnika s adenovirusnom infekcijom (36,4 mm/h) bila značajno veća od one u bolesnika s RSV infekcijom (17,2 mm/h), odnosno s influencom (10,7 mm/h).

Broj leukocita bio je iznad granica normalnih vrijednosti za dob u 95% (126/133) bolesnika s adenovirusnom infekcijom. Raspon broja leukocita bio je 4,9-53,8  $\times 10^9/l$ , medijan 20  $\times 10^9/l$  i srednja vrijednost 20,4  $\times 10^9/l$ . Nisu uočene značajne razlike u broju leukocita između izoliranih tipova, odnosno vrsta adenovirusa. Putto i sur. (123) su u 67% bolesnika s bakterijskom infekcijom našli da je broj leukocita bio  $\geq 15 \times 10^9/l$ , dok je u 87% bolesnika s virusnom ili mogućom virusnom infekcijom broj leukocita bio  $< 15 \times 10^9/l$ . Kod nas je u 77% (103/133)

bolesnika broj leukocita bio je  $\geq 15 \times 10^9/l$ , a u 50% (67/133) bolesnika broj leukocita bio je  $\geq 20 \times 10^9/l$ . Tako visoke vrijednosti broja leukocita rijetko se nalaze kod drugih virusnih infekcija i smatraju se karakterističnim za adenovirusne infekcije. U većine djece s infekcijom uzrokovanom RSV-om, virusom parainfluence i virusom influence broj leukocita je obično  $< 15 \times 10^9/l$ , dok je u 25-50% djece s adenovirusnom infekcijom broj leukocita  $\geq 15 \times 10^9/l$  (129). U nekim prethodno provedenim istraživanjima nađene su manje srednje vrijednosti broja leukocita ( $10,9-13,0 \times 10^9/l$ ) u bolesnika s adenovirusnom infekcijom (112, 116). Međutim, također je u značajnom udijelu bolesnika (33,6%) broj leukocita bio  $\geq 15 \times 10^9/l$  (112). Razlika u broju leukocita između izoliranih tipova nije nađena (112, 116). U istraživanju Mora i sur. (11) srednja vrijednost broja leukocita u bolesnika s adenovirusnim IGDS-om bila je  $14,9 \times 10^9/l$ . U 48% bolesnika broj leukocita bio je  $\geq 15 \times 10^9/l$ , a u 25% bolesnika broj leukocita bio je  $\geq 20 \times 10^9/l$  (11). To su manji udijeli nego u našoj studiji (77%, odnosno 50%). Appenzeller i sur. (59) su u bolesnika s adenovirusnom infekcijom našli značajno veći broj leukocita u odnosu na bolesnike s infekcijom uzrokovanom virusom influence ( $16,0 \times 10^9/l$  naprama  $8,8 \times 10^9/l$ ). O značajno većem broju leukocita u bolesnika s adenovirusnom infekcijom ( $12,3 \times 10^9/l$ ) u odnosu na one nađene u bolesnika s RSV infekcijom ( $8,5 \times 10^9/l$ ), odnosno s influencom ( $7,6 \times 10^9/l$ ) izvijestili su i Kawasaki i sur., u svojoj studiji (58).

Nedostatak ovog istraživanja je da su kliničke osobitosti, koncentracije CRP-a, brzina SE te broj leukocita bili dostupni samo za hospitaliziranu djecu. Možemo samo pretpostaviti da je većina druge djece imala blaži oblik infekcije koji nije zahtijevao hospitalizaciju. Kawasaki i sur. (58) su u ambulantno obrađene djece s adenovirusnom infekcijom dišnog sustava našli značajno manje koncentracije CRP-a u odnosu na one izmjerene u hospitalizirane djece. Međutim, nisu našli značajne

razlike u brzini SE i broju leukocita kao ni u kliničkim osobitostima adenovirusnih infekcija između ambulantno obrađene i hospitalizirane djece (58).

Vrijednosti udijela neutrofila i limfocita prema DKS-u većinom su bile u granicama normalnih vrijednosti za dob (85/126; 67%, odnosno 91/126; 72%). U bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 1 i 2 adenovirusa vrijednosti udijela neutrofila i limfocita bile su češće u granicama normalnih vrijednosti u odnosu na tip 3 adenovirusa (71% i 73% naprama 40%). Češće je zabilježena neutrofilija, nego neutropenija (29% naprama 4%), odnosno limfopenija nego limfocitoza (25% naprama 3%). Neutrofilija i limfopenija su češće zabilježene u bolesnika s infekcijom uzrokovanom tipom 3 (vrsta B) adenovirusa nego u bolesnika s infekcijom tipom 1, odnosno tipom 2 (vrsta C) adenovirusa. Srednja vrijednost udijela neutrofila u DKS-u bila je 59,9%, a limfocita 27,4%. Slične vrijednosti našli su i Moro i sur. (11) u bolesnika s adenovirusnom infekcijom, uz udio neutrofila od 57%, a limfocita 29%.

Antibioticima (uključujući penicilin, aminoglikozidi, kinoloni ili makrolidi) je liječeno 76% bolesnika, a samo simptomatski (antipiretici i nadoknada tekućine) 23% bolesnika. U dvoje (1%) bolesnika započeto liječenje antibiotikom bilo je prekinuto nakon dokaza adenovirusa u NFS-u (najkasnije 3. dana od početka liječenja). Niti jedan bolesnik nije primao antivirusni lijek ili imunoglobulin. Iako se uvijek naglašava racionalna primjena antibiotika u liječenju virusnih infekcija, slični rezultati se nalaze i u literaturi. U istraživanjima drugih autora udio bolesnika s adenovirusnom infekcijom liječenih antibiotikom varirao je od 37 do 64,5% (59, 114, 116).

Na kraju ove rasprave htjeli bi naglasiti da iako je većina adenovirusnih infekcija samo-ograničavajuća, moguće su i teške infekcije u prethodno zdrave i imunokompetentne djece koje često zahtijevaju hospitalizaciju (44). Kliničke i laboratorijske osobitosti adenovirusne infekcije oponašaju one koje uzrokuju

bakterije (11, 59, 60, 112, 114) te ne čudi da i do 2/3 bolesnika bude liječeno antibiotikom (59, 114, 116). Smanjiti nepotrebnu primjenu antibiotika moguće je brzim i adekvatnim dokazom adenovirusa u ranoj fazi bolesti. Tome bi pomogla i prijava te praćenje prisutnosti adenovirusa u populaciji preko nadležnih epidemioloških službi. Brzi i precizni dijagnostički alati mogu pomoći kliničaru u odluci o eventualnom početku liječenja antibiotikom.

## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata provedenog istraživanja možemo zaključiti sljedeće:

1. Tijekom perioda 2006-2008. godine u djece u Zagrebu i okolici najčešće je bio izoliran tip 2 (vrsta C) adenovirusa (63% dokazanih tipova), a potom srodni tip 1 (vrsta C) u (19%), tj. najčešće je kod adenovirusnih infekcija dišnog sustava dokazana vrsta C adenovirusa (85%). Tip 3 (vrsta B) adenovirusa izoliran je u 15% slučajeva. Tipovi 5, 6 i 7 adenovirusa izolirani su sporadično.
2. Endemski karakter pojavljivanja tipa 2 (vrsta C) adenovirusa jasno je zabilježen u istraživanom razdoblju, uz manju učestalost tijekom ljetnih mjeseci. Srodni tip 1 (vrsta C) pokazao je tendenciju fluktuacije na godišnjoj razini. Za tip 3 (vrsta B) adenovirusa uočena je tendencija fluktuacije na sezonskoj razini, s učestalijim pojavljivanjem od kolovoza do studenog (kasno ljeto i jesen).
3. Vrhovi učestalosti za tip 2 bili su po godinama: prosinac 2006. godine, studeni 2007. i studeni 2008. godine. Vrh učestalosti za tip 1 bio je u lipnju 2008. godine, a za tip 3 siječanj 2006. i studeni 2008. godine.
4. Najveći broj djece s adenovirusnom infekcijom bio je u dobi 1-4 godine. Broj slučajeva je značajno rastao u dobi iznad 12 mjeseci, a zatim se značajno smanjio nakon navršene 3 godine. Adenovirusne infekcije dišnog sustava su se rijetko javljale u dojenčadi u dobi 0-5 mjeseci.
5. Adenovirus tip 1 isključivo se javljao u dojenčadi i male djece (1-4 godine). Tip 2 adenovirusa najčešće je izolirani tip u dojenčadi i male djece u dobi 1-4 godine. Tip 3 adenovirusa izoliran je u svim dobnim skupinama, no vrlo rijetko u dojenačko doba.

6. Neovisno o uzročnom tipu ili vrsti adenovirusa dječaci su češće obolijevali od djevojčica (2,25:1), a posebno u dobi 12-24 mjeseca. Dječaci su i češće hospitalizirani od djevojčica.
7. U hospitalizirane djece, u dobi do 10 godina, adenovirusi su, neovisno o tipu ili vrsti, najčešće su uzrokovali neki oblik IGDS-a (91%). Eksudativni oblik tonzilitisa imalo je 25% bolesnika s adenovirusnom infekcijom, 28% OMA-u, 8% konjunktivitis i 1,5% krup. Bronhitis i pneumonija (IDDS) zabilježeni su u 9% bolesnika. Prateće probavne smetnje imalo je 25% bolesnika.
8. Većina bolesnika imala je povišenu TT (>38,0°C). TT iznad 39,0°C izmjerena je u 86% bolesnika.
9. Većina bolesnika imala je povećane koncentracije CRP-a, ubrzanu SE i povećan broj leukocita koje su karakteristične za bakterijsku infekciju. Koncentracije CRP-a bile su  $\geq 40$  mg/l u 56% bolesnika, 68% bolesnika imalo je ubrzanu SE ( $\geq 30$  mm/h) te je u 77% bolesnika broj leukocita bio  $\geq 15 \times 10^9/l$ .

## 7. KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU

Adenovirusi su česti uzročnici infekcija posvuda u svijetu. Adenovirusne infekcije dišnog sustava u djece najčešće uzrokuju tipovi 1, 2, 3 i 5 adenovirusa. Ciljevi istraživanja bili su: odrediti tipove, odnosno vrste adenovirusa koji uzrokuju akutne infekcije dišnog sustava u djece do 10 godina starosti, njihovu učestalost, raspodjelu po dobi i spolu djece, pojavnost tijekom godine, odnosno njihove sezonske varijacije, opisati kliničke osobitosti i vrijednosti sedimentacije eritrocita (SE), C-reaktivnog proteina (CRP-a) i leukocita ovisno o tipu, odnosno vrsti adenovirusa. U ovu retrospektivnu studiju (1. 1. 2006 - 30. 11. 2008.) uključeno je ukupno 290 djece s adenovirusnom infekcijom. Od svakog djeteta uzet je nazofaringealni sekret u kojem je adenovirus dokazan izravnom imunofluorescencijom i potvrđen izolacijom u staničnoj kulturi. Za hospitalizirane ispitanike analizirani su demografski, klinički i laboratorijski podaci, a za ambulantno obrađene samo demografski podaci. U istraživanju su korištene metode izravne virološke dijagnostike za dokaz antigena, izolacija virusa u staničnoj kulturi i određivanje tipa, odnosno vrste virusa.

Od ukupno 290 bolesnika bilo je 201 (69%) djeteta muškog spola i 89 (31%) ženskog spola. Odnos muško naprama žensko djeteta bio je 2,25:1. Medijan dobi bio je 20 mjeseci, a raspon 1-120 mjeseci. Većina djece s adenovirusnom infekcijom dišnog sustava bila je mlađa od 2 godine (185/290, 64%). Tip adenovirusa određen u 256 bolesnika. Bilo je 34/290 (11%) izolata s neodređenim rezultatom tipizacije u neutralizacijskom testu. Tip 2 adenovirusa izoliran je u 162 (63%) bolesnika, zatim tip 1 u 49 (19%), tip 3 u 40 (16%), tip 6 u 3 (1%) bolesnika te po jedan bolesnika s tipom 5 (0,5%), odnosno tipom 7 (0,5%) adenovirusa. Najčešće je dokazana vrsta C (229/270; 84,8%), a zatim vrsta B (41/270; 15,2%) adenovirusa. Adenovirusi su se u istraživanom razdoblju javljali tijekom cijele godine, s nešto manjom učestalošću u ljetnim mjesecima. Endemski karakter pojavljivanja tipa 2 adenovirusa jasno je

zabilježen u istraživanom razdoblju, uz nešto manju učestalosti tijekom ljetnih mjeseci, dok je srodni tip 1 pokazivao tendenciju fluktuacije na godišnjoj razini. Za tip 3 adenovirusa uočena je tendencija fluktuacije na sezonskoj razini s učestalijim pojavljivanjem od kolovoza do studenog.

Najčešći simptomi bili su povišena tjelesna temperatura (98%), sekrecija iz nosa (89%) i kašalj (71%). Najčešća dijagnoza bila je neki oblik infekcije gornjeg dišnog sustava (91%). Eksudativni tonzilitis imalo je 25% adenopozitivnih bolesnika, a 28% akutnu upalu srednjeg uha. Infekcije donjeg dišnog sustava zabilježene su u 9% bolesnika. U 56% bolesnika koncentracije CRP-a bile su  $\geq 40$  mg/l, ubranu SE ( $\geq 30$  mm/h) imalo je 68% bolesnika te u 77% bolesnika broj leukocita bio je  $\geq 15 \times 10^9/l$ .

U zaključku, adenovirusne infekcije javljaju se tijekom cijele godine, a tijekom istraživanog razdoblja prevladavao je tip 2 adenovirusa. Adenovirusne infekcije dišnog sustava bile su povezane s vrućicom ( $>39,0^\circ\text{C}$ ), leukocitozom i značajno povišenim koncentracijama CRP-a, oponašajući time bakterijsku infekciju.



## **8. KRATKI SADRŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU**

### **Virological, clinical and epidemiological features of adenovirus respiratory infections in children in Zagreb region**

**Irena Tabain, 2011**

Adenoviruses are common pathogens all over the world. Adenovirus respiratory infections in children caused by types 1, 2, 3 and 5 are the most common. The aims of this study were: identification of adenovirus types and/or species which cause acute respiratory infections in children less than 10 years of age, their frequency and distribution according to gender and age, their incidence through the year, seasonal variations, clinical characteristics and values of erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CRP) and white blood cell count (WBC) according to the adenovirus types and species, respectively. This retrospective study (January, 1<sup>st</sup> 2006 - November, 30<sup>th</sup> 2008) included a total of 290 children with adenovirus infection. In taken nasopharyngeal aspirates adenovirus was detected by direct immunofluorescence and confirmed by viral culture. Demographics, clinical presentations and laboratory findings of the inpatients and demographics for outpatients were evaluated. Methods used to detect adenovirus were antigen detection, isolation and adenovirus typing.

Out of 290 children there were 201 (69%) boys and 89 (31%) girls. Male to female ratio was 2.25:1. The median age was 20 months (range, 1-120 months). Most cases were younger than 2 years of age (185/290, 64%). Adenovirus type was determined in 256 patients. There were 34/290 (11%) cases with inconclusive typing result in neutralization test. We found 162 cases of adenovirus type 2 (63%), followed by 49 cases of type 1 (15%), 40 cases of type 3 (16%), 3 cases of type 6 (1.2%), one case of type 5 (0.5%) and one case of type 7 (0.5%). The major species found was species C (229/270; 84.8%) followed by species B (41/270; 15.2%).

During study period cases occur year-around with slightly lower incidence during the summer. In this study period adenovirus type 2 appeared endemic and less frequently during summer season. There was tendency of yearly occurrence of adenovirus type 1 and seasonal occurrence of type 3.

The most common features presented were fever (98%), cough (89%) and rhinorrhea (71%). The most common diagnosis was infection of upper respiratory tract (91%). Exudative tonsillitis was found in 25% of adenopositive patients and otitis media acuta in 28%. Lower respiratory tract infection was found in 9% of patients. CRP was  $\geq 40$  mg/L for 56% of patients, 68% had SE was  $\geq 30$  mm/L and 77% of patients had WBC count  $\geq 15,000$ /L.

In conclusion, cases occur year-around and predominant type in the study period was adenovirus type 2. Respiratory adenovirus infections in children were associated with high fever, leukocytosis and substantially elevated CRP levels, mimicking bacterial infections.

## 9. POPIS LITERATURE

1. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953;84:570-3.
2. Hilleman MR, Werner JH. Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1954;85:183-8.
3. Robinson C, Echavarría M. Adenoviruses. In *Manual of Clinical Microbiology*, 7th edn. Eds. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Washington, DC: ASM Press, 2007: pp. 1586-99.
4. Enders JF, Bell JA, Dingle JH, Francis T Jr, Hilleman MR, Huebner RJ, Payne AM. Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science* 1956 20;124:119-20.
5. Russell WC.; Benkő M. Animal adenoviruses. In *Encyclopedia of Virology*, Eds. A. Granoff A. Webster RG. New York: Academic Press, 1999; pp. 14-21.
6. Trentin JJ, Yabe Y., Taylor G. The quest for human cancer viruses. *Science* 1962;137:835-48.
7. Mackey JK, Rigden PM, Green M. Do highly oncogenic group A human adenoviruses cause human cancer? Analysis of human tumors for adenovirus 12 transforming DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:4657-61.
8. Benkő M, Harrach B. A proposal for a new (third) genus within the family Adenoviridae. *Arch Virol* 1998;143:829-37.
9. Davison AJ, Benko M, Harrach B. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* 2003;84:2895-908.
10. Benkő M. Family Adenoviridae. In *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International committee on Taxonomy of Viruses*. Eds. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005: pp. 213-228.
11. Moro MR, Bonville CA, Suryadevara M, Cummings E, Faddoul D, Kobayaa H, Branigan PJ, Domachowske JB. Clinical features, adenovirus types, and local production of inflammatory mediators in adenovirus infections. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28(5):376-80.
12. Wadell G, Hammarskjöld ML, Winberg G, Varsanyi TM, Sundell G. Genetic variability of adenoviruses. *Ann N Y Acad Sci* 1980;354:16-42.
13. Hierholzer JC, Stone YO, Broderson JR. Antigenic relationships among the 47 human adenoviruses determined in reference horse antisera. *Arch Virol* 1991;121:179-97.
14. Rux JJ, Burnett RM. Adenovirus structure. *Hum Gene Ther* 2004;15:1167-76.
15. Rosen L. Hemagglutination by adenoviruses. *Virology* 1958;5:574-7.

16. Hierholzer, J.C., Further subgrouping of the human adenoviruses by differential hemagglutination. *J Infect Dis* 1973; 128:541-50.
17. Ginsberg HS, Pereira HG, Valentine RC, Wilcox WC. A proposed terminology for the adenovirus antigens and virion morphological subunits. *Virology* 1966;28:782-3.
18. Howitt JC, Anderson W, Freimuth P. Adenovirus interaction with its cellular receptor CAR. *Curr Top Microbiol Immunol* 2003;272:331-64.
19. Saban SD., Silvestry M, Nemerow GR, Stewart PL. Visualization of alpha-Helices in a 6-Angstrom Resolution Cryoelectron Microscopy Structure of Adenovirus Allows Refinement of Capsid Protein Assignments. *J Virol* 2006;80:12049-59.
20. Russell WC. Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol* 2009;90:1-20.
21. Shenk, T. Adenoviridae: the viruses and their replication. *In Virology*, Fourth edn. Eds. Knipe DM, Howley PM. New York: Lippincott-Raven. 2001; pp. 2265-2300.
22. Pettersson U, Roberts RJ. Adenovirus gene expression and replication: a historical review. *Cancer Cell* 1986;4:37-57.
23. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997;275:1320-3.
24. Roelvink PW, Lizonova A, Lee JGM, Li Y, Bergelson JM, Finberg RW, Brough DE, Kovesdi I, Wickham TJ. The Coxsackievirus-Adenovirus Receptor Protein Can Function as a Cellular Attachment Protein for Adenovirus Serotypes from Subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol* 1998;72:7909-15.
25. Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med* 2003;9:1408-12.
26. Arnberg N, Pring-Akerblom P, Wadell G. Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor on Chang C cells. *J Virol* 2002;76:8834-41.
27. Nemerow GR. Cell Receptors Involved in Adenovirus Entry. *Virology* 2000;274:1-4.
28. Kelkar SA, Pfister KK, Crystal RG, Leopold PL. Cytoplasmic Dynein Mediates Adenovirus Binding to Microtubules. *J. Virol* 2004;78:10122-32.
29. Berk AJ, Lee F, Harrison T, Williams J, Sharp PA. Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs. *Cell* 1979;17:935-44.
30. Hakkarainen T, Hemminki A. Enhancement of cancer gene therapy with modified viral vectors and fusion genes. *Gene Ther Mol Biol* 2005;9:153-168.
31. Endter C, Dobner T. Cell transformation by human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004;273:163-214.

32. McBride WD, Wiener A. *In Vitro* Transformation of Hamster Kidney Cells by Human Adenovirus Type 12. *Proc Soc Exp Biol Med* 1964;115:870-4.
33. Nevins JR. Cell transformation by viruses. In *Fields Virology*, 4<sup>th</sup> ed. (Eds. Knipe DM, Howley PM). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001:245-84.
34. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 1999;400:464-8.
35. Chauvin C, Suh M, Remy C, Benabid AL. Failure to detect viral genomic sequences of three viruses (herpes simplex, simian virus 40 and adenovirus) in human and rat brain tumors. *Ital J Neurol Sci* 1990;11:347-57.
36. Hartman ZC, Black EP, Amalfitano A. Adenoviral infection induces a multifaceted innate cellular immune response that is mediated by the toll-like receptor pathway in A549 cells. *Virology* 2007;358:357-72.
37. Sumida SM, Truitt DM, Kishko MG, Arthur JC, Jackson SS, Gorgone DA, Lifton MA, Koudstaal W, Pau MG, Kostense S, Havenga MJ, Goudsmit J, Letvin NL, Barouch DH. Neutralizing antibodies and CD8+ T lymphocytes both contribute to immunity to adenovirus serotype 5 vaccine vectors. *J Virol* 2004;78:2666-73.
38. Wold WSM, Horwitz MS. Adenoviruses. In *Fields Virology*, 5<sup>th</sup> ed. Eds. Knipe DM, Howley PM. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 2395-436.
39. Liu Q, Muruve DA. Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. *Gene Ther* 2003;10:935-40.
40. Mistchenko AS, Diez RA, Mariani AL, Robaldo J, Maffey AF, Bayley-Bustamante G, Grinstein S. Cytokines in adenoviral disease in children: association of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor alpha levels with clinical outcome. *J Pediatr* 1994;124:714-20.
41. Crawford-Miksza LK, Schnurr DP. Adenovirus serotype evolution is driven by illegitimate recombination in the hypervariable regions of the hexon protein. *Virology* 1996;224:357-67.
42. Olive M, Eisenlohr L, Flomenberg N, Hsu S, Flomenberg P. The adenovirus capsid protein hexon contains a highly conserved human CD4+ T-cell epitope. *Hum Gene Ther* 2002;13:1167-78.
43. Smith CA, Woodruff LS, Rooney C, Kitchingman GR. Extensive cross-reactivity of adenovirus-specific cytotoxic T cells. *Hum Gene Ther* 1998;9:1419-27.
44. Cooper RJ, Hallett R, Tullo AB, Klapper PE. The epidemiology of adenovirus infections in Greater Manchester, UK 1982-96. *Epidemiol Infect* 2000;125:333-45.
45. Schmitz H, Wigand R, Heinrich W. Worldwide epidemiology of human adenovirus infections. *Am J Epidemiol* 1983;117:455-66.
46. Fox JP, Brandt CD, Wassermann FE, Hall CE, Spigland I, Kogon A, Elveback LR. The virus watch program: a continuing surveillance of viral infections in metropolitan New York families. VI. Observations of adenovirus infections: virus

- excretion patterns, antibody response, efficiency of surveillance, patterns of infections, and relation to illness. *Am J Epidemiol* 1969;89(1):25-50.
47. Leowski J. Mortality from acute respiratory infections in children under 5 years of age: global estimates. *World Health Stat Q* 1986;39(2):138-44.
  48. Mlinarić-Galinović G, Ugrčić I, Detić D, Božikov J. Epidemiological picture of respiratory viral infections in Croatia. *Acta Med Jugosl* 1991;45(3):203-11.
  49. Hierholzer JC. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin Microbiol Rev* 1992;5(3):262-74.
  50. Weinberg A, Fink MC, Takimoto S, Ishida MA, Souza MC. Enzyme linked immunosorbent assay: determination of anti-adenovirus antibodies in an infant population. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1989;31(5):336-40.
  51. Abzug MJ, Levin MJ. Neonatal adenovirus infection: Four patients and review of the literature. *Pediatrics* 1991;87:890-6.
  52. Rubin BA. Clinical picture and epidemiology of adenovirus infections (a review). *Acta Microbiol Hung* 1993;40(4):303-23.
  53. Brandt CD, Kim HW, Vargosko AJ, Jeffries BC, Arrobio JO, Rindge B, Parrott RH, Chanock RM. Infections in 18,000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease. I. Adenovirus pathogenicity in relation to serologic type and illness syndrome. *Am J Epidemiol* 1969;90(6):484-500.
  54. Yeung R, Eshaghi A, Lombos E, Blair J, Mazzulli T, Burton L, Drews SJ. Characterization of culture-positive adenovirus serotypes from respiratory specimens in Toronto, Ontario, Canada: September 2007-June 2008. *Virol J*. 2009;26;6:11.
  55. Kulundžić M. Procjena vrijednosti testa neutralizacije i reakcije vezanja komplementa u dijagnostici adenovirusnih infekcija respiratornog trakta dojenčadi i djece. Magistarski rad, Zagreb, 1981.
  56. Kružić V. Nalaz nekih virusa u ždrijelu djece s akutnim respiratornim oboljenjem, gdje nisu dokazani respiratorni sincicijski i parainfluenca virus. Magistarski rad, Zagreb, 1979.
  57. Mitchell LS, Taylor B, Reimels W, Barrett FF, Devincenzo JP. Adenovirus 7a: a community-acquired outbreak in a children's hospital. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:996-1000.
  58. Kawasaki Y, Hosoya M, Katayose M, Suzuki H. Correlation between serum interleukin 6 and C-reactive protein concentrations in patients with adenoviral respiratory infection. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21(5):370-4.
  59. Appenzeller C, Ammann RA, Duppenhaler A, Gorgievski-Hrisoho M, Aebi C. Serum C-reactive protein in children with adenovirus infection. *Swiss Med Wkly* 2002;132:345-50.
  60. Dominguez O, Rojo P, de Las Heras S, Folgueira D, Contreras JR. Clinical presentation and characteristics of pharyngeal adenovirus infections. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24(8):733-4.

61. Hemming VG. Viral respiratory diseases in children: classification, etiology, epidemiology, and risk factors. *J Pediatr* 1994;124:S13-6.
62. Mlinarić-Galinović G, Turković B, Baće A, Loffler-Badžek D, Lokar-Kolbas R, Božikov J, Hodalin A: Etiology of atypical pneumonia in children and adults. *Pediatr Croat* 1995;39:247-251.
63. Carballal G, Videla C, Misirlan A, Requeijo PV, Aguilar M. Adenovirus type 7 associated with severe and fatal acute lower respiratory infections in Argentine children. *BMC Pediatr* 2002;2:6.
64. Erdman DD, Xu W, Gerber SI, Gray GC, Schnurr D, Kajon AE, Anderson LJ. Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in the United States, 1966–2000. *Emerg Infect Dis* 2002;8:269–277.
65. Kolavic-Gray SA, Binn LN, Sanchez JL, Cersovsky SB, Polyak CS, Mitchell-Raymundo F, Asher LV, Vaughn DW, Feighner BH, Innis BL. Large epidemic of adenovirus type 4 infection among military trainees: Epidemiological, clinical, and laboratory studies. *Clin Infect Dis* 2002;35:808–18.
66. Bell JA. Epidemiology of pharyngoconjunctival fever. *Am J Ophthalmol* 195;43:36-40.
67. Dawson CR, O'Day D, Vastine D. Letter: Adenovirus 19, a cause of epidemic keratoconjunctivitis, not acute hemorrhagic conjunctivitis. *N Engl J Med* 1975;293(1):45-6.
68. Dawson CR, Hanna L, Wood TR, Despain R. Adenovirus type 8 keratoconjunctivitis in the United States. 3. Epidemiologic, clinical, and microbiologic features. *Am J Ophthalmol* 1970;69:473-80.
69. Kemp MC, Hierholzer JC, Cabradilla CP, Obijeski JF. The changing etiology of epidemic keratoconjunctivitis: antigenic and restriction enzyme analyses of adenovirus types 19 and 37 isolated over a 10-year period. *J Infect Dis* 1983;148:24-33.
70. Chakrabarti S, Mautner V, Osman H, Collingham KE, Fegan CD, Klapper PE, Moss PA, Milligan DW. Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery. *Blood* 2002;100:1619-27.
71. Echavarria MS, Ray SC, Ambinder R, Dumler JS, Charache P. PCR detection of adenovirus in a bone marrow transplant recipient: hemorrhagic cystitis as a presenting manifestation of disseminated disease. *J Clin Microbiol* 1999;37:686-9.
72. Echavarria M, Forman M, Ticehurst J, Dumler JS, Charache P. PCR method for detection of adenovirus in urine of healthy and human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Clin Microbiol* 1998;36:3323-6.
73. Landry ML, Ferguson D. SimulFluor respiratory screen for rapid detection of multiple respiratory viruses in clinical specimens by immunofluorescence staining. *J Clin Microbiol* 2000;38:708-11.

74. Lehtomäki K, Julkunen I, Sandelin K, Salonen J, Virtanen M, Ranki M, Hovi T. Rapid diagnosis of respiratory adenovirus infections in young adult men. *J Clin Microbiol* 1986;24(1):108-11.
75. Takimoto S, Grandien M, Ishida MA, Pereira MS, Paiva TM, Ishimaru T, Makita EM, Martinez CH. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, indirect immunofluorescence assay, and virus isolation for detection of respiratory viruses in nasopharyngeal secretions. *J Clin Microbiol* 1991;29(3):470-4.
76. Ruuskanen O, Meurmann O, Akusjarvi. Adenoviruses. In: Richman DG, Whitley RJ, Hayden FG, eds. *Clinical Virology*. 1st ed. <new York: Churchill Livingstone; 1997: p:525-47.
77. Reina J, Ros MJ, Del Valle JM, Blanco I, Munar M. Evaluation of direct immunofluorescence, dot-blot enzyme immunoassay, and shell-vial culture for detection of respiratory syncytial virus in patients with bronchiolitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:1018–1020.
78. Fan J, Henrickson KJ. Rapid diagnosis of human parainfluenza virus type 1 infection by quantitative reverse transcription-PCR-enzyme hybridization assay. *J. Clin. Microbiol* 1996;34:1914–7.
79. Herrmann JE, Perron-Henry DM, Blacklow NR. Antigen detection with monoclonal antibodies for the diagnosis of adenovirus gastroenteritis. *J Infect Dis* 1987;155(6):1167-71.
80. Fujimoto T, Okafuji T, Okafuji T, Ito M, Nukuzuma S, Chikahira M, Nishio O. Evaluation of a bedside immunochromatographic test for detection of adenovirus in respiratory samples, by comparison to virus isolation, PCR, and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42(12):5489-92.
81. Grandien M, Pettersson CA, Svensson L, Uhnoo I. Latex agglutination test for adenovirus diagnosis in diarrheal disease. *J Med Virol* 1987;23(4):311-6.
82. Landecker H. "Immortality, *In Vitro*: A History of the HeLa Cell Line". In Brodwin P, ed. *Biotechnology and culture: bodies, anxieties, ethics*. Bloomington: Indiana University Press: 2000; pp. 53–74.
83. Engler HD, Preuss J. Laboratory diagnosis of respiratory virus infections in 24 hours by utilizing shell vial cultures. *J Clin Microbiol* 1997;35(8):2165-7.
84. Rabalais GP, Stout GG, Ladd KL, Cost KM. Rapid diagnosis of respiratory viral infections by using a shell vial assay and monoclonal antibody pool. *J Clin Microbiol* 1992;30(6):1505-8.
85. Hierholzer JC, Adenoviruses. In: Lennette AD, Lennette TE, editors. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 7<sup>th</sup> ed. Washington, DC. American Public Health Association Inc. 1995; p 169-88.
86. Hierholzer JC, Halonen PE, Dahlen PO, Bingham PG, McDonough MM. Detection of adenovirus in clinical specimens by polymerase chain reaction and liquid-phase hybridization quantitated by time-resolved fluorometry. *J Clin Microbiol* 1993;31(7):1886-91.
87. Allard A, Girones R, Juto P, Wadell G. Polymerase chain reaction for detection of adenoviruses in stool samples. *J Clin Microbiol* 1990;28(12):2659-67.



88. Rätty R, Kleemola M, Melén K, Stenvik M, Julkunen I. Efficacy of PCR and other diagnostic methods for the detection of respiratory adenoviral infections. *J Med Virol* 1999;59(1):66-72.
89. Heim A, Ebnet C, Harste G, Pring-Akerblom P. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. *J Med Virol* 2003;70(2):228-39.
90. Xu W, McDonough MC, Erdman DD. Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000;38(11):4114-20.
91. Pehler-Harrington K, Khanna M, Waters CR, Henrickson KJ. Rapid detection and identification of human adenovirus species by adenoplex, a multiplex PCR-enzyme hybridization assay. *J Clin Microbiol* 2004;42(9):4072-6.
92. Akalu A, Seidel W, Liebermann H, Bauer U, Döhner L. Rapid identification of subgenera of human adenovirus by serological and PCR assays. *J Virol Methods* 1998;71(2):187-96.
93. Vabret A, Gouarin S, Joannes M, Barranger C, Petitjean J, Corbet S, Brouard J, Lafay F, Duhamel JF, Guillois B, Freymuth F. Development of a PCR-and hybridization-based assay (PCR Adenovirus Consensus) for the detection and the species identification of adenoviruses in respiratory specimens. *J Clin Virol* 2004;31(2):116-22.
94. Osiowy C. Direct detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiplex reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol*. 1998;36(11):3149-54.
95. Ebner K, Suda M, Watzinger F, Lion T. Molecular detection and quantitative analysis of the entire spectrum of human adenoviruses by a two-reaction real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2005;43:3049-53.
96. Morris DJ, Cooper RJ, Barr T, Bailey AS. Polymerase chain reaction for rapid diagnosis of respiratory adenovirus infection. *J Infect* 1996;32(2):113-7.
97. Kidd AH, Jonsson M, Garwicz D, Kajon AE, Wermtenbol AG, Verweij MW, De Jong JC. Rapid subgenus identification of human adenovirus isolates by a general PCR. *J Clin Microbiol* 1996;34(3):622-7.
98. Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 2001;39:498-505.
99. Kinchington PR, Romanowski EG, Jerold Gordon Y. Prospects for adenovirus antivirals. *J Antimicrob Chemother* 2005;55(4):424-9.
100. Naesens L, Lenaerts L, Andrei G, Snoeck R, Van Beers D, Holy A, Balzarini J, De Clercq E. Antiadenovirus activities of several classes of nucleoside and nucleotide analogues. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(3):1010-6.
101. Kojaoghlanian T, Flomenberg P, Horwitz MS. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev Med Virol* 2003;13(3):155-71.
102. Couch RB, Chanock RM, Cate TR, Lang DJ, Knight V, Huebner RJ. Immunization with types 4 and 7 adenovirus by selective infection of the intestinal tract. *Am Rev Respir Dis* 1963;88:SUPPL 394-403.

103. Gray GC, Goswami PR, Malasig MD, Hawksworth AW, Trump DH, Ryan MA, Schnurr DP. Adult adenovirus infections: loss of orphaned vaccines precipitates military respiratory disease epidemics. For the Adenovirus Surveillance Group. *Clin Infect Dis* 2000;31(3):663-70.
104. Mlinarić-Galinović G, Grljušić V. Nazofaringealni sekret bolesnika kao klinički materija kod virusnih respiratornih infekcija. *Liječ Vjesn* 1989;111:213-4.
105. Brunetti M, Cohen J. Hematology. *In* Robertson J, Shilkovski N (eds). *The Harriet Lane Handbook. A manual for pediatrics house officers.* 17th ed. Mosby Inc., Philadelphia, 2005; pp. 346-7.
106. Gajewski KK. Cardiology. *In* Robertson J, Shilkovski N (eds). *The Harriet Lane Handbook. A manual for pediatrics house officers.* 17th ed. Mosby Inc., Philadelphia, 2005; p. 173.
107. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr. *Color atlas and textbook of a diagnostic microbiology.* 5th ed. Lippincot W&W-Wolters Kluwer, Philadelphia, 1997.
108. Murray PR, Baron JE, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manula of clinical microbiology.* 8th ed. Washington DC. ASM Press; 2003.
109. Ivanković D. *Statistička analiza podataka u medicini.* Zagreb: Medicinska naklada, 2004.
110. Wadell G, Varsanyi TS, Lord A, Sutton RN. Epidemic outbreak of adenovirus 7 with special reference to the patogenicity of adenovirus genome type 7b. *Am J Epidemiol* 1980;112:619-28
111. Wadell G. Molecular epidemiology of human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1984;110:191-220.
112. Lin KH, Lin YC, Chen HL, Ke GM, Chiang CJ, Hwang KP, Chu PY, Lin JH, Liu DP, Chen HY. A two decade survey of respiratory adenovirus in Taiwan. The reemergance of adenovirus types 7 and 4. *J Med Virol* 2004;73:274-9.
113. Sakamoto M, Yazaki N, Katsushima N, Mizuta K, Suzuki H, Numazaki Y. Longitudinal investigation of epidemiologic feature of adenovirus infections in acute respiratory illness among children in Yamagata, Japan (1986-1991). *Tohoku J Exp Med* 1995;175:185-93.
114. Rocholl C, Gerber K, Daly J, Pavia AT, Byington CL. Adenoviral infections in children: The impact of rapid diagnosis. *Pediatrics* 2004;113:e51-6.
115. Peled N, Nakar C, Huberman H, Scherf E, Samra Z, Finkelstein Y, Hoffer V, Garty BZ. Adenovirus infection in hospitalized immunocompetent children. *Clin Pediatr (Phila)* 2004;43:223-9.
116. Cheng CC, Huang LM, Kao CL, Lee PI, Chen JM, Lu CY, Lee CY, Chang SY, Chang LY. Molecular and clinical characteristics of adenoviral infections in Taiwanese children in 2004-2005. *Eur J Pediatr* 2008;167:633-40.
117. Chang SY, Lee CN, Lin PH, Huang HH, Chang LY, Ko W, Chang SF, Lee PI, Huang LM, Kao CL. A community-derived outbreak of adenovirus type 3 in children in Taiwan between 2004 and 2005. *J Med Virol* 2008;80:102-12.

118. Brandt CD, Kim HW, Jeffries BC, Pyles G, Christmas EE, Reid JL, Chanock RM, Parrott RH. Infections in 18,000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease. II. Variation in adenovirus infections by year and season. *Am J Epidemiol* 1972;95:218-27.
119. Yamadera S, Yamashita K, Akatsuka M, Kato N, Inouye S. Trend of adenovirus type 7 infection, an emerging disease in Japan. *Jpn J Med Sci Biol* 1998;51:43-51.
120. Houg HS, Liang , Chen CM, Keith J, Echavarria M, Sanchez JL, Kolavic SA, Vaughn DW, Binn LN. Rapid type-specific diagnosis of adenovirus type 4 infection using hexon-based quantitative fluorogenic PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;42:227-36.
121. Kato N. Pyrogenicity of human adenoviruses. *J Gen Virol* 2000;81:2611-6.
122. Alper CM, Winther B, Mandel EM, Hendly JO, Doyle WJ. Rate of concurrent otitis media acuta in upper respiratory tract infections with specific viruses. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;135:17-21.
123. Putto A, Ruuskanen O, Meurman O, Ekbald H, Korvenranta H, Mertsola J, Peltola H, Sarkkinen H, Viljanen MK, Halonen P. C-reactive protein in the evaluation of febrile illness. *Arch Dis Child* 1986;61:24-9.
124. Ruuskanen O, Putto A, Sarkkinen H, Meurman O, Irjala K. C-reactive protein in respiratory virus infections. *J Pediatr* 1985;107:97-100.
125. Putto A, Meurman O, Ruuskanen O. C-reactive protein in the differentiation of adenoviral, Epstein-Barr viral and streptococcal tonsillitis in children. *Eur Pediatr* 1986;145:204-6.
126. Pulliam PN, Attia MW, Cronan KM. C-reactive protein in febrile children 1 to 36 months of age with clinically undetectable serious bacterial infection. *Pediatrics* 2001;108:1275-9.
127. Mistchenko AS, Diez RA, Mariani AL, Robaldo J, Maffey AF, Bayley-Bustamante G, Grinstein S. Cytokines in adenoviral disease in children. Association of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor alpha levels with clinical outcome. *J Pediatr* 1994;124:714-20.
128. Kaiser L, Fritz RS, Straus SE, Gubareva L, Hayden FG. Symptom pathogenesis during acute influenza. Interleukin-6 and other cytokine responses. *J Med Virol* 2001;64:262-8.
129. Ruuskanen O, Meurman O, Sarkkinen H. Adenoviral diseases in children: A study of 105 hospital cases. *Pediatrics* 1985;76:79-83.

## 10. ŽIVOTOPIS

Irena Tabain rođena je 1972. godine u Zagrebu, gdje je završila osnovnu školu i Matematički informativni obrazovni centar. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirala je 1997. godine.

Obavezni pripravnički staž obavila je u periodu 1997-1998. godine te je u prosincu 1998. godine položila državni ispit.

Od 1999. do 2003. godine radila je kao znanstveni novak na Klinici za onkologiju i nuklearnu medicinu, KBC-a „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu. Od 1999. do 2002. godine sudjelovala je na znanstveno-istraživačkom projektu „Ispitivanje etioloških čimbenika guše u Hrvatskoj“ voditelja akademika Zvonka Kusića, a 2002/2003. na projektu „Karcinogeneza u štitnjači i gušavost u Hrvatskoj“ istog voditelja. Tijekom tog vremena završila je stručni poslijediplomski studij Kliničku citologiju te znanstveni poslijediplomski studij Biomedicinu i zdravstvo.

Od 2003. do 2008. radila je u tvrtki Belupo, lijekovi i kozmetika, d.d. u službi Medicinskih poslova.

Od rujna 2008. zaposlena je u Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo, a tada je započela i specijalističko usavršavanje iz Medicinske mikrobiologije s parazitologijom. Sudjeluje na znanstveno-istraživačkom projektu voditeljice prof. dr. sc. Gordane Mlinarić Galinović pod naslovom „Virusne infekcije dišnog sustava“. Tijekom dosadašnjeg specijalističkog usavršavanja završila je stručni poslijediplomski studij Medicinska mikrobiologija s parasitologijom.

Aktivno je sudjelovala na brojnim domaćim i međunarodnim skupovima. Član je Hrvatske liječničke komore.

### Objavljeni članci:

1. Meštrović T, Sviben M, Vilibić-Čavlek T, Ljubin-Sternak S, **Tabain I**, G. Mlinarić Galinović. Seroprevalence of *Taenia solium* infections in Croatian patients presenting with epilepsy. J Helminthol 2011 *In press* (Current Contents)
2. **Tabain I**, Sviben M, Ljubin Sternak S, Vilibić Čavlek T, Mlinarić Galinović G. Seroprevalence of *Echinococcus granulosus* infection in Croatian patients with cystic liver disease. J Helminthol 2010;85:192-5. (Current Contents)
3. Mateša N, **Tabain I**, Kusić Z. The risk of thyroid malignancy in patients with solitary thyroid nodule versus patients with multinodular goiter. Acta clin Croat 2005;44:7-10. (Excerpta Medica)
4. **Tabain I**, Mateša N, Kusić Z. Accuracy of ultrasound guided fine needle aspiration in patients with nodular thyroid disease. Acta clin Croat 2004;43:21-6. (Excerpta Medica)
5. **Tabain I**, Mateša N, Kusić Z. Fine needle aspiration of Hürthle cell neoplasms of the thyroid: a clinicocytomorphologic study. Acta clin Croat 2002;41:335-9. (Excerpta Medica)
6. Mateša N, Dabelić N, **Tabain I**, Kusić Z. Fine Needle Aspiration of the Thyroid. Acta clin Croat 2002;41:123-31. (Excerpta Medica)
7. Mateša N, **Tabain I**, Dabelić N, Petric V, Kusić Z. Diagnostic Relevance Fine Needle Aspiration Cytology for Follicular Lesions of the Thyroid: Retrospective Study. Croat Med J 2002;43:606-9. (Current Contents)
8. **Tabain I**, Mateša N, Kusić Z. Follicular adenoma of the thyroid: retrospective review of the cytomorphologic characteristics in 104 cases. Acta clin Croat 2000;39:221-5. (Excerpta Medica)