

Etiologija virusnih infekcija dišnog sustava u djece hospitalizirane tijekom jednogodišnjeg razdoblja (2017./2018.) u Klinici za dječje bolesti Zagreb

Kale, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:105:313800>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-27**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivana Kale

**Etiologija virusnih infekcija dišnog sustava u
djece hospitalizirane tijekom jednogodišnjeg
razdoblja (2017./2018.) u Klinici za dječje
bolesti Zagreb**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ i Klinici za dječje bolesti Zagreb pod vodstvom prof.dr.sc. Sunčanice Ljubin Sternak, prim. dr. med., u sklopu projekta financiranog od Hrvatske zaklade za znanost, IP-2006-06-7556, voditeljice Sunčanice Ljubin Sternak pod naslovom: Novi i zapostavljeni virusni uzročnici infekcija dišnog sustava u vulnerabilnim skupinama bolesnika. Rad je predan je na ocjenu u akademskoj godini 2018./2019.

POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA

ARI - akutne respiratorne infekcije

IGDP - infekcije gornjih dišnih putova

IDDP - infekcije donjih dišnih putova

RSV A - respiratorni sincicijski virus A

RSV B - respiratorni sincicijski virus B

AdV - adenovirusi

HRV - humani rinovirusi

HBoV - humani bokavirus

HMPV - humani metapneumovirus

HEV - humani enterovirusi

HCoV-OC43 - humani koronavirus OC43

HCoV-229E - humani koronavirus 229E

HCoV-NL63 - humani koronavirus NL63

PIV-1 - virus parainfluenze tip 1

PIV-2 - virus parainfluenze tip 2

PIV-3 - virus parainfluenze tip 3

PIV-4 - virus parainfluenze tip 4

Flu A - virus influence A

Flu B - virus influence B

Flu C - virus influence C

NPEV - non-polio enterovirusi

HA - hemaglutinin

NA - neuraminidaza

CPU - citopatični učinak

ICA - imunokromatografska metoda (eng. *Immunochromatographic Assay*)

DFA - izravna imunofluorescencija (eng. *Direct Immunofluorescent Assay*)

IFA - neizravna imunofluorescencija (eng. *Indirect Immunofluorescent Assay*)

ELISA - imunoenzimaska reakcija (eng. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

PCR - lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*)

RNA - ribonukleinska kiselina (eng. *ribonucleic acid*)

RVK - reakcija vezanja komplementa

NT - neutralizacijski test

IHA - inhibicija hemaglutinacije

CFR - febrilni respiratorni katar (lat. *catarrhus febrilis respiratorius*)

BHS-A - β -hemolitički streptokok grupe A

CRP - C-reaktivni protein

bp - parovi baza (eng. *base pairs*)

SADRŽAJ

I.	Sažetak	
II.	Summary	
1.	UVOD	1
1.1.	VIRUSNI UZROČNICI AKUTNIH RESPIRATORNIH INFEKCIJA	2
1.1.1.	Humani rinovirusi	2
1.1.2.	Adenovirusi	2
1.1.3.	Respiratorni sincicijski virus	4
1.1.4.	Virusi parainfluenze	5
1.1.5.	Virusi influenza	6
1.1.6.	Humani koronavirusi	7
1.1.7.	Humani bokavirus	8
1.1.8.	Humani metapneumovirus	8
1.1.9.	Humani enterovirusi	9
1.2.	LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA AKUTNIH RESPIRATORNIH VIRUSNIH INFEKCIJA	11
1.2.1.	Izravna dijagnostika	11
1.2.1.1.	Kultivacija	11
1.2.1.2.	Nekultivacijske metode detekcije virusa	14
1.2.1.2.1.	Detekcija antigena	14
1.2.1.2.1.1.	Imunokromatografska metoda	14
1.2.1.2.1.2.	Imunofluorescentna metoda	15
1.2.1.2.1.3.	Imunoenzimska metoda	15
1.2.1.2.2.	Molekularne metode detekcije	17
1.2.1.2.2.1.	Detekcija DNA/RNA	17
1.2.2.	Neizravna dijagnostika	21
1.2.2.1.	Detekcija specifičnih protutijela u bolesnikovu serumu	22
1.2.2.1.1.	Postupci u serološkoj dijagnostici virusnih infekcija dišnog sustava	22
1.2.2.1.1.1.	Neizravni imunoenzimski postupak	22
1.2.2.1.1.2.	Neizravni imunofluorescentni postupak	23
1.2.2.1.1.3.	Reakcija vezanja komplementa	23
1.2.2.1.1.4.	Neutralizacijski test	24
1.2.2.1.1.5.	Inhibicija hemaglutinacije	24

1.3.	KLINIČKI OBLICI AKUTNIH RESPIRATORNIH INFEKCIJA.....	25
1.3.1.	Infekcije gornjih dišnih putova.....	25
1.3.1.1.	Akutni nazofaringitis (obična prehlada).....	25
1.3.1.2.	Febrilni respiratorni katar.....	26
1.3.1.3.	Tonzilofaringitis.....	26
1.3.1.4.	Akutni laringotraheobronhitis (krup).....	27
1.3.2.	Infekcije donjih dišnih putova.....	28
1.3.2.1.	Akutni bronhitis.....	28
1.3.2.2.	Bronhiolitis.....	29
1.3.2.3.	Pneumonija.....	30
1.4.	LIJEČENJE, PREVENCIJA I KONTROLA AKUTNIH RESPIRATORNIH INFEKCIJA.....	32
1.4.1.	Liječenje akutnih respiratornih infekcija.....	32
1.4.2.	Prevenција i kontrola akutnih respiratornih infekcija.....	34
2.	HIPOTEZA.....	36
3.	CILJEVI RADA.....	36
4.	ISPITANICI I METODE.....	37
4.1.	ISPITANICI.....	37
4.2.	UZORCI.....	37
4.3.	METODE.....	38
5.	REZULTATI.....	43
6.	RASPRAVA.....	60
7.	ZAKLJUČAK.....	67
8.	ZAHVALA.....	68
9.	LITERATURA.....	69
10.	ŽIVOTOPIS.....	79

I. Sažetak

Etiologija virusnih infekcija dišnog sustava u djece hospitalizirane tijekom jednogodišnjeg razdoblja (2017./2018.) u Klinici za dječje bolesti Zagreb

Ivana Kale

Uvod: Akutne respiratorne infekcije (ARI) najčešće su infekcije, ali i najučestalije bolesti čovjeka uopće. Odrasli u prosjeku obole 3 do 5 puta, a djeca u prosjeku 4 do 7 puta na godinu. Najčešći su uzročnici respiratorni virusi koji su odgovorni za više od 85% svih ARI. ARI su najčešći razlog hospitalizacije djece širom svijeta, najčešći razlog za propisivanje antibiotika te jedan od vodećih razloga za izbjivanje s posla i iz škole. Izravni i posredni troškovi zbrinjavanja ARI iznose oko 30% ukupne zdravstvene potrošnje u jednoj zajednici.

Cilj: Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi virusnu etiologiju ARI, ali i epidemiološke i kliničke karakteristike 15 respiratornih virusa, a s ciljem uvođenja metoda molekularne dijagnostike u rutinsku praksu.

Ispitanici i metode: Prospektivno istraživanje provedeno je na 239 djece hospitalizirane zbog ARI u Klinici za dječje bolesti Zagreb u razdoblju od 5. mjeseca 2017. godine do 4. mjeseca 2018. godine. Pacijentima sa sumnjom na virusnu etiologiju ARI uzeti su obrisici nazofarinksa i ždrijela i testirani na 15 respiratornih virusa multiplex PCR metodom.

Rezultati: Virusna etiologija ustanovljena je u uzorku 75.3% pacijenata. Najčešće detektirani virus u uzorcima ispitanika bio je humani rinovirus - HRV (56.1%), a slijede ga adenovirusi - AdV (24.4%) te respiratorni sincicijski virus A/B - RSV A/B (17.7%) i humani koronavirus OC43 - HCoV-OC43 (10%). U skupini pacijenata s infekcijom gornjih dišnih putova najčešće su detektirani HRV (48.9%) i AdV (21.7%), a u skupini pacijenata s infekcijom donjih dišnih putova HRV (67.4) i RSV A/B (32.6%). Koinfekcija/kodetekcija utvrđena je u 32.8% uzoraka pozitivnih na respiratorne viruse. U pacijenata s koinfekcijom/kodetekcijom najčešće je detektiran HRV (64.4%), zatim AdV (59.3%), RSV A/B (28.8%) i HCoV-OC43 (20.3%). Nije nađena statistički značajna razlika između infekcije jednim virusom i koinfekcije/kodetekcije u odnosu na dob i spol ispitanika te na lokalizaciju i težinu infekcije.

Zaključak: Metode molekularne dijagnostike kao visoko specifične i osjetljive najpogodnije su za laboratorijsku dijagnostiku ARI. Njihovu relativno višu cijenu treba razmatrati u svjetlu ukupne cijene liječenja pacijenta. Pravovremenim utvrđivanjem etiologije ARI može se primijeniti odgovarajuće liječenje i izbjeći nepotrebna upotreba antibiotika, a praćenje epidemioloških osobina respiratornih virusa omogućuje planiranje i provođenje mjera prevencije.

Ključne riječi: akutne respiratorne infekcije (ARI), respiratorni virusi, etiologija, prospektivno istraživanje, multiplex PCR

II. Summary

Etiology of respiratory virus infections in children hospitalized during a one-year period (2017/2018) in Children's Hospital Zagreb

Ivana Kale

Background: Acute respiratory infections (ARIs) are the most common infections and the most frequent human diseases in general. In average, adults experience three to five and children four to seven episodes of ARI per year. Respiratory viruses are the major cause of ARIs and account for more than 85% of all ARIs. ARIs are the most common cause of children's hospitalization worldwide, as well as the main reason for prescribing antibiotics. ARIs are also among the leading causes for missing work or school. Direct and indirect costs associated with ARIs consume around 30% of local community healthcare resources.

Objective: The aim of this study was to determine the viral etiology of ARIs, as well as investigate clinical and epidemiological characteristics of 15 respiratory viruses, in order to demonstrate the need for molecular diagnostics introduced in routine practice.

Patients and methods: A prospective study was conducted on 239 children admitted to Children's Hospital Zagreb due to ARI. Nasopharyngeal and pharyngeal flocculated swabs were collected from patients with symptoms of ARI and suspected for viral etiology. Specimens were tested using multiplex PCR test for detection of 15 respiratory viruses.

Results: Viral etiology was established in 75.3% of the patients. The most commonly diagnosed virus was human rhinovirus - HRV (56.1%), followed by adenovirus - AdV (24.4%), respiratory syncytial virus A/B - RSV A/B (17.7%) and human coronavirus OC43 - HCoV-OC43 (10%). The most commonly identified viruses in a group of patients with upper respiratory tract infection were HRV (48.9%) and AdV (21.7%), and in a group of patients with lower respiratory tract infection HRV (67.4) and RSV A/B (32.6%). Coinfection/codetection rate was 32.8% in samples positive for respiratory viruses. In multiple viral infections HRV (64.4%), AdV (59.3%), RSV A/B (28.8%) and HCoV-OC43 (20.3%) were most frequently detected. There were no statistically significant differences between single and multiple virus infection regarding patients age, gender, localization of infection and severity of disease.

Conclusion: Molecular methods are highly sensitive and specific, and therefore most suitable for detection of respiratory viruses. Their relatively higher price should be evaluated in the light of total costs regarding ARI. Establishing viral etiology in due time enables the start of specific therapy and prevents unnecessary antibiotic administration. Epidemiologic follow-up of respiratory viruses allows planning and implementation of appropriate preventive measures.

Keywords: acute respiratory infections (ARIs), respiratory viruses, etiology, prospective study, multiplex PCR

1. UVOD

Akutne respiratorne infekcije (ARI) najčešće su infekcije suvremenog čovjeka i čine dvije trećine svih infekcija. Time su ARI i najučestalije bolesti čovjeka uopće. Odrasli u prosjeku obole 3 do 5 puta na godinu, dok djeca obole češće, u prosjeku 4 do 7 puta, a ona koja borave u kolektivima kao što su jaslice i dječji vrtići prebole i po 12 infekcija na godinu, osobito u prvih 5 godina života (1, 2).

U zdravstvenoj službi u Hrvatskoj godišnje se registrira 2,5 milijuna bolesnika s ARI, a to je oko 30% svih registriranih bolesnika. Najveći je udio ARI u ukupnom pobolu predškolske djece (više od 50%), a u dobnoj skupini školske djece od 7 do 19 godina 45-50% (3).

Bolesnici s akutnim respiratornim infekcijama najčešći su posjetitelji pedijatrijskih i drugih ordinacija primarne zdravstvene zaštite. ARI su najčešći razlog hospitalizacije djece širom svijeta. Bolesti dišnog sustava čine 34,6% od ukupnih hospitalizacija djece u dobi od 1 do 5 godina, a stopa hospitalizacija zbog bolesti dišnog sustava najviša je u dojenačkoj dobi (4). ARI su i najčešći razlog za propisivanje antibiotika te jedan od vodećih razloga za izbjavanje s posla i iz škole. Izravni i posredni troškovi zbrinjavanja ARI iznose oko 30% ukupne zdravstvene potrošnje u jednoj zajednici. Za liječenje ARI propisuje se oko 70% svih peroralnih oblika antibiotika (5).

Učestalost ARI i dalje je visoka unatoč napretku i uspjesima u dijagnosticiranju, liječenju i sprečavanju infektivnih bolesti. Razlozi tome su mnogi, u prvome redu činjenica da je dišni sustav čovjeka najotvoreniji organski sustav koji je u neprekidnoj komunikaciji s vanjskom sredinom što omogućuje vrlo učinkovit način prijenosa infekcije (dodir, kapljični put, aerosol). Sljedeći razlog velike učestalosti ARI je veliki broj uzročnih mikroorganizama i njihovih antigenskih varijanti. Do sada je poznato više od 500 antigenski različitih tipova i podtipova mikroorganizama koji uzrokuju respiratorne infekcije (6). Iako i bakterije, u prvom redu *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis*, atipične bakterije *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* (7), kao i gljive (*Pneumocystis jirovecii*) (8), mogu uzrokovati akutne respiratorne infekcije, najčešći su uzročnici respiratorni virusi koji su odgovorni za više od 85% svih ARI. Ovim istraživanjem obuhvaćeni su najčešći uzročnici akutnih respiratornih infekcija: rinovirusi, koronavirusi, virusi parainfluence, virusi influence, adenovirusi, humani metapneumovirus i respiratorni sincicijski virus čije su kliničke karakteristike i regionalna epidemiološka obilježja već upoznati kroz razna istraživanja (9-12), ali također i virusi otkriveni u posljednjih desetak godina (humani bokavirus, novoizdvojeni enterovirusi, humani koronavirus NL63, humani rinovirus C) te virusi čija je dijagnostika bila otežana zahtjevnom kultivacijom i nedostupnošću komercijalnih testova (virus

parainfluence tip 4), a za čije kliničke karakteristike i regionalna epidemiološka obilježja postoje nedostatni podatci (13, 14).

1.1. VIRUSNI UZROČNICI AKUTNIH RESPIRATORNIH INFEKCIJA

1.1.1. Humani rinovirusi

Humani rinovirusi (HRV) članovi su porodice *Picornaviridae*. Svrstani su u rod *Enterovirus*, i to kao tri vrste: humani rinovirus A, B, i C (HRV-A, HRV-B i HRV-C). Prvi rinovirus otkriven je 1956. godine. HRV-C otkriven je 2006. godine u uzorcima pacijenata u Queenslandu i New Yorku (15). Danas je poznato više od 100 antigenski različitih tipova rinovirusa. U određenoj populaciji obično kruži nekoliko serotipova, a prevalencija pojedinih mijenja se iz godine u godinu. Rašireni su svuda u svijetu (16).

To su mali, neovijeni virusi, a genom virusa čini jednolančana, pozitivna (+) RNA. Naziv im označuje primarno mjesto infekcije (grč. *rhis, rhinos - nos*) (17). Replikacija virusa prvenstveno se zbiva u epitelnim stanicama s trepetljikama gornjeg dijela respiratornog trakta. Receptor za većinu virusa jest interstanična adhezijska molekula 1 (ICAM-1), dok se manja skupina koristi lipoproteinom niske gustoće (LDL). Premda dolazi do oštećenja epitela, on se smatra manje važnim patogenetskim mehanizmom za nastanak simptoma bolesti u usporedbi s oslobađanjem medijatora upalne reakcije (18). Rinovirusi su najčešći uzročnici obične prehlade, a smatra se da su odgovorni i za 2/3 svih egzacerbacija astme u djece. Infekcije se pojavljuju tijekom cijele godine, ali su učestalije u ranu jesen i kasno proljeće u umjerenome klimatskom pojasu (19).

Budući da se mogu replicirati i u stanicama donjeg dišnog sustava, mogu uzrokovati i infekcije donjih dišnih putova s teškim kliničkim slikama, osobito u najmlađih i imunokompromitiranih bolesnika (20).

1.1.2. Adenovirusi

Adenovirusi (AdV) su članovi porodice *Adenoviridae*. Serotipovi patogeni za čovjeka svrstani su u rod *Mastadenovirus*. Otkriveni su 1953. godine kada su ih Rowe i suradnici izolirali iz kirurški odstranjenog adenoidnog tkiva po kojem su i dobili ime (grč. *aden - žlijezda*). Poznato je 55 humanih tipova koji su na temelju podudarnosti DNK genoma i hemaglutinacijskih osobina podijeljeni u sedam grupa (A-G) (21).

Adenovirusi su srednje veliki virusi bez lipidne ovojnice. Sadržavaju dvolančanu linearnu DNK. DNK virusa obložena je proteinskom ovojnicom (kapsidom) koja je sastavljena od 252

podjedinice (kapsomere). Razlikujemo heksone, kapsomere građene od šest podjedinica, te pentone koji su građeni od pet podjedinica. Na svakoj se pentonskoj bazi nalazi vlaknasti izdanak (17).

Bolesti uzrokovane adenovirusima zajedničkim imenom nazivaju se adenoviroze, a među njima klinički najvažnije su ARI koje se nerijetko javljaju i u obliku manjih ili većih epidemija. Osim ARI, adenovirusi uzrokuju i gastroenteritis, akutni hemoragijski cistitis, meningoencefalitis, genitalne infekcije te infekcije u imunodeficijentnih osoba - najčešće pneumoniju i hepatitis (22).

Adenovirusi uzrokuju barem 5 do 10% svih ARI u djece (23). Ulaze u organizam preko usta, nazofarinksa ili očne spojnice. Primarno mjesto umnožavanja virusa jest respiratorni epitel u nazofarinksu, odakle se može spustiti u donji dio respiratornog trakta. Spektar kliničkih sindroma koje adenovirusi izazivaju u sklopu infekcije dišnog sustava kreće se od obične prehlade, febrilnog respiratornog katara, akutnog febrilnog faringitisa, faringokonjunktivalne groznice, epidemijskog keratokonjunktivitisa, preko traheitisa i bronhitisa, sve do pneumonije. Najveći broj infekcija uzrokuju tipovi 1-7. Adenovirus tip 5 povezuje se i sa sindromom pertusisa, budući da se često nađe sam ili uz *Bordetella pertussis* u djece s hripavcem (21).

Tablica 1. Bolesti izazvane adenovirusima

(preuzeto iz: Kalenić S i sur. Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.)

Sindrom	Serotip
Akutni febrilni faringitis	1-3, 5-7
Faringokonjunktivalna groznica	3,4,7
Sindrom pertusisa	5
Pneumonija	3,4,7,21
Epidemijski keratokonjunktivitis	8,19,37
Gastroenteritis u djece	2,31,40,41
Akutni hemoragijski cistitis	7,11,21
Genitalne infekcije	2,19,37
Infekcije središnjega živčanog sustava	2,6,7,12
Infekcije imunodeficijentnih osoba	31,34,35,37,43,45

Adenoviroze su proširene u cijelom svijetu. Češće se pojavljuju u djece do četvrte godine života. Najranije u životu nastupa infekcija tipovima 1 i 2, a poslije tipovima 3 i 5. Infekcije se pojavljuju i u mlađih odraslih koji borave u gusto napučenim kolektivima, a osobito ročnih vojnika. Adenovirusi uzrokuju više od 50% slučajeva febrilnog respiratornog katarata i pneumonije među necijepljenim ročnim vojnicima. Respiratorne infekcije uzrokovane adenovirusima mogu se javiti tijekom cijele godine, ali češće se pojavljuju zimi i u rano proljeće. Infekcije adenovirusom tipa 3 s kliničkom slikom faringokonjunktivalne groznice češće su ljeti (23).

1.1.3. Respiratorni sincicijski virus

Respiratorni sincicijski virus (RSV) pripada u porodicu *Pneumoviridae*, rod *Orthopneumovirus*. Prvi put je opisan 1956. godine kao uzročnik prehlada u čimpanza i nazvan je CCA (eng. *Chimpanzee Coryza Agent*). Uskoro su protutijela na CCA otkrivena u djece s respiratornim infekcijama, a isti je virus izoliran iz obrisaka ždrijela djece s bronhopneumonijom i laringotraheobronhitisom. Uzročnik je 1957. godine zbog povezanosti s respiratornim infekcijama i karakterističnog citopatskog efekta u kulturi stanica preimenovan u respiratorni sincicijski virus (24).

To je ovijeni virus čiji genom čini jednolančana, negativna (-) RNA. Na površini virusa nalaze se mnogobrojni izdanci koji se sastoje od dvaju glukoproteina (G i F). Veći virusni glukoprotein (G) omogućuje prihvaćanje virusa za stanicu, a manji virusni glukoprotein (F) odgovoran je za ulazak virusa u stanicu te fuziju inficiranih stanica. Postoje dva antigena tipa virusa, A i B (RSV A i RSV B) koji se prvenstveno razlikuju u antigenoj strukturi proteina G. Unutar dva antigena tipa javljaju se također antigene varijacije, što omogućuje reinfekcije ovim virusom tijekom čitavog života (18).

Respiratorni sincicijski virus uzrokuje ARI svih dobnih skupina. Primarne infekcije najčešće su u dojenčadi s vrhom incidencije u prvih 6 mjeseci života. Virus se nakon ulaska u organizam umnaža u nazofarinksu i može uzrokovati febrilni respiratorni katar, često praćen upalom srednjeg uha. U 50% djece koja su mlađa od 8 mjeseci virus se postupno širi u donji dio dišnog sustava, te uzrokuje bronhiolitis, pneumoniju i bronhitis. RSV je najvažniji i najčešći uzročnik infekcija donjih dišnih putova u dojenčadi i male djece (25). U Hrvatskoj je RSV uzročnik 78.4% svih bronhiolitisa, 43.3% pneumonija i 55% bronhitisa u djece. Težu kliničku sliku uzrokuje RSV A. Učestalost obolijevanja postupno pada do kraja druge godine života. Svaka sljedeća reinfekcija obično je blaža (17). U starije djece i odraslih RSV najčešće uzrokuje infekcije gornjeg dijela dišnog sustava, i to kao reinfekcije. Manifestiraju se kao prehlada, febrilni

respiratorni katar, upala srednjeg uha i sinusitis. RSV je i najčešći uzročnik virusnih nozokomijalnih respiratornih infekcija na dječjim bolničkim odjelima (26).

RSV je proširen po čitavom svijetu, a javlja se redovito svake godine u obliku manjih ili većih epidemija. U srednjoeuropskoj regiji dokazani su izmjenični dvogodišnji epidemijski ciklusi u usporedbi s pojavnosću u nekim drugim umjerenim klimatskim područjima svijeta, gdje se epidemije pojavljuju svake godine u isto vrijeme. Dvogodišnji RSV ciklus u Hrvatskoj se ponavlja svakih 23 - 25 mjeseci. Nakon veće zimske RSV epidemije slijedi manja proljetna nakon 14 - 16 mjeseci, a potom za 8 - 10 mjeseci opet veća epidemija (27).

1.1.4. Virusi parainfluence

Virusi parainfluence (PIV) pripadaju u porodicu *Paramyxoviridae*. Razlikujemo četiri tipa virusa parainfluence (PIV 1-4). Tipovi 1 i 3 članovi su roda *Respirovirus*, a tipovi 2 i 4 roda *Rubulavirus*. Prvi virus parainfluence izoliran je 1955. godine u SAD-u u djece oboljele od krupa i nazvan je virusom CA (eng. *Croup Associated*). Kasnije je CA virus nazvan virusom parainfluence tip 2. Virus parainfluence tipovi 1 i 3 otkriveni su 1957. godine u SAD-u u djece s krupom i pneumonijom, a PIV-4 otkriven je 1958. godine također u SAD-u i ima dva antigena podtipa - PIV-4A i PIV-4B (28).

Genom virusa čini jednolančana, negativna (-) RNA. Virus parainfluence važni su uzročnici infekcija respiratornog trakta u ljudi. U dojenčadi i male djece čest su uzrok infekcija donjih dišnih putova, koje se mogu klinički manifestirati kao sindrom krupa, bronhitis, bronhiolitis ili pneumonija (29). U starije djece i odraslih uzrokuju uglavnom infekcije gornjih dišnih putova, malokad dolazi do akutnih egzacerbacija kroničnog bronhitisa i pneumonija (30).

Svi tipovi parainfluence prošireni su po čitavom svijetu te pokazuju određenu sezonsku distribuciju i kliničke osobitosti vezano uz tip virusa. Djeca oboljevaju od PIV-3 u prvoj godini života, često sa slikom bronhiolitisa, te 50% djece s navršenom prvom godinom života ima protutijela za ovaj tip. U djece od jedne do tri godine uzrokuje sindrom krupa, a u starije djece traheobronhitis. Prisutan je u populaciji tijekom čitave godine s najvećom incidencijom u proljeće. Virus parainfluence tipovi 1 i 2 javljaju se naizmjenično u manjim ili većim epidemijama od listopada do ožujka i glavni su uzročnici laringotraheobronhitisa ili sindroma krupa. Glavni uzročnik krupa je PIV-1 te se najčešće pojavljuje u djece od 8 do 30 mjeseci. PIV-1 također uzrokuje i nešto teže kliničke slike, posebice u dječaka. Može povremeno izazvati i bronhiolitis i pneumoniju u dojenčadi starije od 5 mjeseci. PIV-2 je na drugom mjestu kao uzročnik krupa i češće ga izaziva u djece predškolskog i školskog uzrasta. PIV-3, ali i PIV-2 mogu izazvati teške infekcije donjih dišnih putova u imunosuprimiranih osoba (31). PIV-4 uzrokuje uglavnom blaže infekcije gornjih dišnih putova, i to već vrlo rano u djetinjstvu, ali i

reinfekcije u odraslih, također kao blage infekcije. Infekcija PIV-4 vrlo je česta, 70-80% djece u dobi od 10 godina ima protutijela za ovaj tip. Virusi parainfluence su i česti uzročnici nozokomijalnih respiratornih infekcija na dječjim odjelima (32).

1.1.5. Virusi influence

Virusi influence (Flu) članovi su porodice *Orthomyxoviridae*. Virus influence A (Flu A) pripada u rod *Influenzavirus A*, virus influence B (Flu B) u rod *Influenzavirus B*, a virus influence C (Flu C) u rod *Influenzavirus C*. Godine 1933. Smith, Andrewes i Laidlaw su u Velikoj Britaniji prvi put izolirali virus influence A. Godine 1940. Francis je izolirao virus influence B, a 1947. Taylor virus influence C (33).

Virusi influence A i B uzrokuju gripu ili influencu. Virus influence C uzrokuje blaži oblik respiratorne bolesti, najčešće običnu prehladu. Influenca je akutna infektivna bolest dišnog sustava koja je klinički karakterizirana općim simptomima, poglavito visokom temperaturom, glavoboljom, mialgijama te suhim kašljem. Naziv je dobila u srednjem vijeku u Italiji, jer se smatralo da nastaje pod utjecajem (tal. *influenza*) zvijezda ili hladne vode, a prvi vjerodostojan opis bolesti potječe još od Hipokrata u 5. stoljeću pr. Krista (18). Iako je u većini slučajeva samoizlječiva bolest, influenza može imati brojne komplikacije, osobito u rizičnim skupinama bolesnika kao što su imunokompromitirana djeca i djeca mlađa od dvije godine (34).

Virus influence sadržava jednolančanu, segmentiranu, negativnu (-) RNA. Na površini lipidne ovojnice strše dvije vrste glukoproteinskih izdanaka: hemaglutinin i neuraminidaza (NA). HA je zadužen za vezanje sa stanicom domaćina, a NA pomaže virusu pri ulasku i izlasku iz stanice domaćina i otapa sekret u dišnom sustavu. HA i NA su tipno specifični antigeni i u njima su moguće mnogobrojne varijacije, tj. promjene u antigenskoj strukturi. Kod manjih promjena, tzv. antigenskog skretanja (eng. *drift*) riječ je o promjeni sekvencije nekoliko aminokiselina. To omogućuje virusu da i unatoč postojećoj imunosti inficira manji dio pučanstva svake godine i dovede do epidemije. Virusne antigenske izmjene (eng. *shift*) rezultat su korjenite promjene sastava i redoslijeda aminokiselina. Za takvu antigensku promjenu virusa pučanstvo nema imunost i obolijeva u obliku pandemije (17). Antigenske promjene su poglavito važne za Flu A, a u manjoj mjeri se događaju s Flu B, dok se Flu C antigenski ne mijenja. Time se objašnjava jača virulencija Flu A nego Flu B i C, i samo njegova sposobnost izazivanja pandemija, za što je potrebno da se humani soj virusa rekombinira sa životinjskim (35). Flu A ima 16 različitih HA i 9 različitih NA podtipova, od kojih su samo H1, H2, H3, N1 i N2 bili uzročnici velikih epidemija u ljudi. U 20. stoljeću dogodile su se tri pandemije: 1918. godine (španjolska gripa - H1N1), 1957. godine (azijska gripa - H2N2) i 1968. (hongkonška gripa - H3N2). U proljeće 2009. godine iz Meksika i Kalifornije krenula je nova

pandemija, tzv. svinjska gripa. Novi virus influence A (H1N1) nastao je rekombinacijom čak četiriju virusa influence A (dva svinjska, jedan humani i jedan ptičji). Veliku zabrinutost u svijetu izazvala je pojava virusa ptičje gripe A (H5N1) 1997. godine u Hong Kongu, koji u ljudi uzrokuje vrlo tešku bolest sa smrtnošću višom od 50%. No, ovaj virus nije postao pandemijski jer se ne širi s čovjeka na čovjeka, već izravno od inficiranih ptica (36).

Manje ili veće epidemije influence A pojavljuju se svake godine tijekom zimskih mjeseci u umjerenome klimatskom pojasu. Prvi je znak epidemije porast broja djece s ARI. Taj porast prati povećanje broja oboljelih među odraslima. Epidemija izbija naglo, vrhunac doseže za 3 do 4 tjedna, a obično traje 7 do 10 tjedana te prestaje isto tako naglo kao što je počela. U epidemiji obično oboli 5 do 15% pučanstva. U prosjeku svake sezone oboli jedan od 10 odraslih i jedno od troje djece. Epidemije influence B uvijek su manjih razmjera, a pojavljuju se svakih 5 do 6 godina (37).

1.1.6. Humani koronavirusi

Humani koronavirusi (HCoV) članovi su porodice *Coronaviridae*, potporodice *Coronavirinae*, rodova *Alfacoronavirus* (HCoV-229E i HCoV-NL63) i *Betacoronavirus* (HCoV-OC43). To su kuglasti, ovijeni virusi, a genom virusa čini jednolančana, pozitivna (+) RNA. Naziv su dobili prema latinskoj riječi *corona* što znači kruna, zbog izgleda S-glikoproteinskih izdanaka na njihovoj ovojnici. Inficiraju cilijarne epitelne stanice u nazofarinksu, a izdanci su odgovorni za adsorpciju na stanice domaćina (38).

Prvi humani koronavirusi otkriveni su 1965. godine u dišnom sekretu odraslih osoba koje su bolovale od prehlade i kasnije su nazvani virusi OC43 i 229E (HCoV-OC43 i HCoV-229E) (39, 40). Virus NL63 (HCoV-NL63) prvi je put izoliran 2004. godine u sedmomjesečnog djeteta s bronhiolitisom u Nizozemskoj. Nedugo nakon tog otkrića uslijedila su još dva opisa istog virusa u studijama u Nizozemskoj i SAD-u, u kojima je nazvan virus NL, odnosno New Haven koronavirus (41).

Humani koronavirusi prisutni su diljem svijeta i najčešće uzrokuju akutnu febrilnu bolest gornjeg dišnog sustava u obliku prehlade te se smatra da 30% svih prehlada otpada na koronavirus. Također su i važan uzročnik akutne upale srednjeg uha u djece (42). Infekcije se pojavljuju sporadično i u epidemijama najčešće u zimu i proljeće, ali mogu se pojaviti bilo kada tijekom godine. Najčešće se pojavljuje HCoV-OC43, zatim HCoV-NL63, ali prevalencija pojedinih virusa varira ovisno o populaciji i godini. Infekcije su najučestalije u djece u dobnoj skupini od 7 do 12 mjeseci, ali javljaju se u manjoj mjeri i u starije djece i odraslih (43). Koronavirusi mogu rjeđe izazvati i infekcije donjih dišnih putova, pneumoniju i bronhiolitis, osobito u djece do 18 mjeseci (44), a HCoV-NL63 se povezuje i sa sindromom krupa (45).

Teže kliničke slike vide se u vrlo male djece, osobito imunokompromitirane, te u djece s predliježećim kroničnim bolestima, a budući da se koronavirusi vrlo često nalaze u koinfekciji s drugim respiratornim virusima (osobito RSV i Flu A), i to može utjecati kliničku prezentaciju koronavirusne infekcije (46).

1.1.7. Humani bokavirus

Humani bokavirus (HBoV) pripada u porodicu *Parvoviridae*, potporodicu *Parvovirinae*, rod *Bocavirus*. To je mali, neovijeni virus čiji genom čini linearna, jednolančana DNA. Otkrili su ga Allander i sur. 2005. godine u Stockholmu u Švedskoj, u nazofaringealnom aspiratu djece s ARI (47). Humani bokavirus je srodan goveđem parvovirusu (*bovine parvovirus* - BPV) i psećem parvovirusu (*canine minute virus* - MVC), prema čemu je i dobio ime. Razlikujemo četiri tipa humanog bokavirusa (HBoV 1-4). HBoV-1 se povezuje s akutnim respiratornim infekcijama, dok su HBoV-2, HBoV-3 i HBoV-4 primarno enterički virusi, nađeni u uzorcima stolice djece s akutnim gastroenteritisom (48).

Globalna prevalencija HBoV u uzorcima iz respiratornog trakta djece s ARI je od 1.5% do 19% (49). Povezuje se s blagim infekcijama gornjih dišnih putova, ali i bronholitom, bronhitisom i pneumonijom, a nađen je i u uzorcima zdrave djece. Koinfekcija s drugim respiratornim virusima je česta, a posebno koinfekcija s RSV. HBoV je proširen po cijelom svijetu i uzrokuje infekcije u svih dobnih skupina, a osobito u djece starosti 6 do 24 mjeseca, češće u dječaka. Infekcije su moguće tijekom cijele godine, s vrhom učestalosti tijekom zimskih i proljetnih mjeseci (50).

1.1.8. Humani metapneumovirus

Humani metapneumovirus (HMPV) član je porodice *Pneumoviridae*, roda *Metapneumovirus*. Otkrili su ga 2001. godine u Nizozemskoj Bernadette van den Hoogen i sur. u nazofaringealnim sekretima 28-ero djece koja su hospitalizirana zbog infekcije donjeg dijela dišnog sustava. Retrospektivne serološke studije pokazale su da taj virus cirkulira među ljudima najmanje 50 godina (51).

Genom virusa čini jednolančana, negativna (-) RNA. Postoje dva podtipa virusa, HMPV A i HMPV B. Inficiraju epitelne stanice u dišnom sustavu, a kao receptor za virus služi integrin alfa V beta 1 (aVb1) (52).

HMPV se javlja širom svijeta, u svim dobnim skupinama i u oba spola. Primarna infekcija odvija se u ranom djetinjstvu, najčešće prvom i drugom godini života, te su praktički sva djeca u dobi od

5 godina već imala takvu infekciju. Kasnije tijekom djetinjstva i u odraslih česte su reinfekcije (53).

HMPV je detektiran u 5 do 15% djece s ARI, najčešće u djece mlađe od godinu dana, i procjenjuje se da je odgovoran za 5-7% svih hospitalizacija djece zbog ARI, najčešće u dobi 6 do 12 mjeseci. Virus može uzrokovati blage infekcije gornjeg dijela dišnog sustava kao što su obična prehlada i febrilni respiratorni katar, ali i krup, pneumoniju, i osobito bronhiolitis. Pod rizikom za razvoj teške kliničke slike su nedonošena i imunokompromitirana djeca (54). Infekcije HMPV-om ne mogu se klinički razlikovati od infekcija RSV-om, ali su prema dosad objavljenim studijama infekcije HMPV-om blaže (55). HMPV se često nalazi u koinfekciji s drugim respiratornim virusima, osobito RSV-om, te je u dijelu studija pronađena povezanost HMPV/RSV koinfekcije s težom kliničkom slikom (56), dok u drugim studijama ta povezanost nije potvrđena (57). HMPV se pojavljuje u zimskim i proljetnim mjesecima. Kao i RSV epidemije, i epidemije HMPV-a imaju dvogodišnji ciklus pojave u središnjoj Europi, prethodeći ili izbijajući nakon epidemija što ih je uzrokovao RSV (58).

1.1.9. Humani enterovirusi

Humani enterovirusi (HEV) pripadaju u porodicu *Picornaviridae*, rod *Enterovirus*. Naziv porodice označuje da je riječ o malim (lat. *pico - mali*) virusima čiji genom čini jednolančana, pozitivna (+) RNA. Na osnovu bioloških osobina i serotipizacije humani enterovirusi podijeljeni su u 5 grupa: poliovirus (tip 1, 2 i 3), coxsackievirusi grupe A, coxsackievirusi grupe B, echovirusi i enterovirusi. Razvojem molekularnih dijagnostičkih metoda uspostavljena je nova klasifikacija roda *Enterovirus* u kojoj su ljudski non-polio enterovirusi (NPEV) svrstani u 4 vrste: HEV-A, HEV-B, HEV-C i HEV-D. Infekcija enterovirusima uglavnom se prenosi fekalno-oralnim putem, ali može se prenijeti i kapljičnim putem (59).

Iako većina infekcija uzrokovana NPEV prolazi bez simptoma, ili kao blaga febrilna bolest, NPEV mogu uzrokovati i različite teške simptomatske infekcije (60).

Coxsackievirusi su dobili ime po mjestu Coxsackie u državi New York, SAD, gdje su 1948. godine izolirana 2 soja iz stolice dva dječaka za koje se sumnjalo da boluju od paralitičnog poliomijelitisa (61). Coxsackievirusi se pojavljuju diljem svijeta. U tropskim i suptropskim predjelima javljaju se tokom čitave godine, a u područjima umjerene klime najčešće u ljeto i ranu jesen. Uzrokuju širok spektar kliničkih sindroma, a zajedno s echovirusima odgovorni su za više od 85% svih slučajeva aseptičnog (seroznog) meningitisa. Osim sa slučajevima meningitisa, echovirusi (*echo - „enteric cytopathic human orphan“*) se povezuju i s razvojem febrilne bolesti s ili bez osipa, proljeva u dojenčadi, akutnog hemoragičnog konjunktivitisa, encefalitisa i Guillain-Barré sindroma. Također se najčešće pojavljuju u ljeto i ranu jesen. (62)

Tablica 2. Klinički sindromi izazvani coxsackievirusima

(prilagođeno iz: Coxsackieviruses Clinical Presentation. Medscape.

Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/215241-clinical>)

Coxsackievirusi grupe A	Coxsackievirusi grupe B
Herpangina (tipovi 2-6, 8 i 10)	Pleurodinija (tipovi 1-5)
Aseptični meningitis (tipovi 2, 4, 7, 9, 10)	Aseptični meningitis (tipovi 1-6)
Rijetko paralize (tipovi 7 i 9)	Rijetko paralize (tipovi 2-5)
Egzantem (tipovi 4-6, 9 i 16)	Egzantem (tip 5)
Akutni limfatični ili nodularni faringitis (tip 10)	Meningoencefalitis, miokarditis novorođenčadi (tipovi 1-5)
Pneumonitis novorođenčadi (tipovi 9 i 16)	Perikarditis i miokarditis (tipovi 1-5)
Hepatitis (tipovi 4 i 9)	Hepatitis (tip 5)
Akutne respiratorne infekcije (tipovi 2, 10, 21, 24)	Akutne respiratorne infekcije i pneumonija (tipovi 4 i 5)
Bolest šake, stopala i usta (tipovi 5, 10, 16)	Nediferencirana febrilna stanja (tipovi 1-6)

Od velikog broja serotipova enterovirusa, mnogi se mogu povremeno dokazati u uzorcima iz dišnog sustava, a serotipovi detektirani predominantno ili isključivo u respiratornim uzorcima jesu EV-C104, EV-C105, EV-C109, EV-C117, EV-C118 i EV-D68 (63).

Enterovirus 68 (EV-D68) prvi je puta izoliran 1962. godine u Kaliforniji iz uzoraka četvero djece koja su bolovala od pneumonije i bronhiolitisa (64). Od tada se povremeno i sporadično opisivao, sve do ranih dvijetisućitih godina, kada su širom svijeta opisana veća izbijanja infekcija ovim virusom. Najveće je bilo od sredine kolovoza do listopada 2014. godine diljem SAD-a, kada je opisano i pet smrtnih slučajeva djece (65). EV-D68 uzrokuje blage infekcije gornjih dišnih putova kao što su obična prehlada i febrilni respiratorni katar, ali i teške infekcije donjih dišnih putova, osobito pneumoniju i bronhiolitis (66). Veći rizik za obolijevanje od teškog oblika bolesti imaju djeca mlađa od 5 godina i djeca s astmom (67). Osim respiratornih infekcija, povezuje se i sa slučajevima akutnog flakcidnog mijelitisa (68). EV-D68 se najčešće detektira kao jedini virus u uzorku, a pojavljuje se pretežno u kasno ljeto i ranu jesen (69).

Noviji enterovirusi koji pripadaju u vrstu HEV-C, otkriveni su u posljednjih 8 godina širom svijeta kao uzročnici od blagih do vrlo teških respiratornih infekcija (63).

1.2. LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA AKUTNIH RESPIRATORNIH VIRUSNIH INFEKCIJA

Dijagnostika virusnih infekcija dišnog sustava započinje 1933. godine otkrićem virusa influence A. Smith, Andrewes i Laidlaw su inokulirali sekret oboljelog u pokusnu životinju - tvora, koji je nakon 48 sati počeo pokazivati simptome bolesti (70).

Suvremena laboratorijska dijagnostika respiratornih virusnih infekcija provodi se izravnim dokazom virusa ili njegovih antigena ili nukleinskih kiselina u kliničkom uzorku, zatim izolacijom virusa iz kliničkih uzoraka na staničnoj kulturi, ili se infekcija dijagnosticira dokazom porasta titra specifičnih protutijela u bolesnikovu serumu (71).

1.2.1. Izravna dijagnostika

Uzorke materijala bolesnika za izravnu detekciju i izolaciju virusa treba uzeti prvih nekoliko dana od početka bolesti. Većina uzoraka može se pohraniti nekoliko dana na temperaturi od 4 do 8 °C. Zamrzavanjem uzoraka na temperaturi od -70 °C i nižoj dugotrajnije je očuvana infektivnost virusa (72).

Klinički materijali koji se koriste su obrisak nazofarinksa, obrisak ždrijela, aspirat nazofarinksa ili ispirak nosa. Kod infekcija donjih dišnih putova mogu se dodatno u opravdanim slučajevima koristiti i iskašljaj, endotrahealni aspirat, bronhoalveolarni ispirak i biopstat pluća (73).

1.2.1.1. Kultivacija

Stanična kultura je biološki sustav *in vitro*, u kojem stanice stavljene u umjetni okoliš (laboratorijska hranjiva podloga) zadržavaju sposobnost dijeljenja. Staničnu kulturu čine tri osnovna elementa: prvi je element nosač stanica, a to su plosnate boce ili epruvete od plastike ili plastične mikrotitarske pločice s bazenima različita volumena. Drugi element stanične kulture jesu hranjive podloge za umnožavanje stanica, npr. Eagleov medij koji sadržava puferski sustav, aminokiseline, vitamine, šećere, životinjski serum, antibiotike i indikator pH sredine. Treći element su same stanice. Razlikujemo tri vrste staničnih sustava: primarne stanice, kontinuirane stanične linije i diploidne stanice (74).

Primarne stanične kulture - npr. stanična kultura bubrega majmuna (PMK), kultura stanica bubrega humanog embrija (HEK), kultura stanica pluća humanog embrija (HEL), kultura epitelnih stanica traheje humanog embrija (HTEpC). Pripremaju se iz različitih tkiva ljudi i životinja embrionalnog ili odraslog organizma. Životni vijek jednoslojne kulture stanica npr. majmunskog bubrega približno je 15 do 20 dana. Tijekom toga vremena očuvane su osnovne

karakteristike stanica koje su jednake stanicama njihova izvornog tkiva. U primarnim staničnim kulturama može se izolirati većina respiratornih virusa - humani rinovirus (PMK), adenovirusi (HEK), respiratorni sincicijski virus (PMK, HEL), virusi influence (PMK), humani koronavirusi (HTEpC), humani bokavirus (HTEpC) (75) i virusi parainfluence 1-3 (PMK). PIV-4 se teško uzgaja u kulturi (76).

Kontinuirane stanične kulture - npr. kultura stanica raka grlića maternice (HeLa), kultura stanica karcinoma larinksa (Hep-2), kultura epitelnih stanica bubrega afričkog zelenog majmuna (Vero), kultura epitelnih stanica bubrega rezus majmuna (LLC-MK2), kultura stanica bubrega psa (MDCK), kontinuirana stanična kultura malignog melanoma (MNT-1), kontinuirana stanična kultura kolorektalnog karcinoma (Caco-2), kontinuirana stanična kultura hepatocelularnog karcinoma (HuH7). Staničnu liniju smatramo kontinuiranom onda kada je broj supkultivacija neograničen. Te stanične linije imaju kromosomske nepravilnosti koje se očituju ili u broju ili u građi kromosoma. Podrijetla su tumorskih stanica ili „besmrtnih“ stanica nastalih kemijskom obradbom. U kontinuiranim staničnim kulturama mogu se izolirati brojni respiratorni virusi - adenovirusi (HeLa, Hep-2, HuH7), respiratorni sincicijski virus (HeLa, Hep-2), virusi parainfluence (Vero, HuH7, MNT-1, LLC-MK2) (77), virusi influence (MCDK, HuH7), koronavirusi (HuH7), humani bokavirus (Caco-2) (78), humani metapneumovirus (Vero, LLC-MK2, MNT-1) (79) i humani rinovirus (HeLa, HuH7). HRV-C se ne može izolirati u kontinuiranim staničnim kulturama (76).

Diploidne stanične kulture - u diploidnim staničnim kulturama kao što je kultura plućnih fibroblasta fetusa (WI-38, MRC-5) mogu se izolirati humani rinovirusi, koronavirusi i enterovirusi. Diploidne stanice imaju očuvani kariotip prirodnih stanica od kojih su dobivene, a supkultivirati ih se može samo ograničeni broj pasaža (30 do 50 uzastopnih supkultivacija) (80).

Nakon inokulacije u staničnu kulturu, prisutnost virusa može se otkriti tipično za 10 do 14 dana, odnosno od 5 pa sve do 30 dana, ovisno o virusu. Prisutnost virusa u staničnoj kulturi može se otkriti citopatološkim promjenama koje su posljedica umnožavanja virusa. Te se promjene nazivaju citopatičnim učinkom (CPU) (81).

Adenovirusi stvaraju karakterističan CPU, koji se sastoji u zaokruživanju i grupiranju stanica s bazofilnim intranuklearnim inkluzijskim tjelešcima (82), a CPU humanog rinovirusa uključuje žarišta malih i velikih zaobljenih stanica s piknotičkim jezgrama i staničnim debrisom (83). Respiratorni sincicijski virus se može prepoznati po stvaranju malih sincicija koji se za nekoliko dana povećaju i postaju multinuklearni. U području sincicija mogu se vidjeti i citoplazmatske eozinofilne inkluzije (24). Humanu koronavirusi stvaraju CPU u obliku vakuola (84), a pojava CPU kod humanog metapneumovirusa je varijabilna. Mogu se vidjeti male, zaokružene, granulirane stanice, ali i pojava većeg ili manjeg sincicija (85). CPU humanih enterovirusa se

vidi kao piknoza i liza stanica (86), a CPU virusa parainfluence uključuje žarišta zaokruživanja i destrukcije, izdužene stanice i mjestimičnu pojavu sincicija (87).

Tablica 3. Citopatični učinci (CPU) virusa u staničnoj kulturi

(preuzeto iz: Presečki V i sur. Virologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2002.)

Smrt stanice	zaokruživanje stanice liza stanice agregacija stanica gubitak sposobnosti pričvršćivanja na površinu
Histološke promjene	virusne inkluzije u jezgri ili citoplazmi nagomilavanje kromatina uz jezgrinu opnu
Sincicij	multinuklearne stanice: fuzija stanica inducirana virusom
Promjene na površini stanica	prisutnost virusnih antigena hemadsorpcija

Virusi influence u većini slučajeva ne stvaraju citopatični učinak, ali, kao i virusi parainfluence, tijekom umnožavanja ugrađuju svoje glikoproteine (hemaglutinin) na površinu inficiranih stanica. Prisutnost virusnih hemaglutinina na površini inficirane stanice očituje se spajanjem eritrocita (određenih vrsta životinja) na hemaglutinin. To je **hemadsorpcija**. Viruse koji pak hemaglutinin oslobađaju u podlogu stanične kulture otkriva se s pomoću aglutinacije naknadno dodanih eritrocita, tzv. postupkom **hemaglutinacije**. Konačna identifikacija i tipizacija izoliranog virusa izvodi se tipno-specifičnim protutijelima koja specifično neutraliziraju citopatični učinak virusa ili reagiraju s virusnim antigenima (**inhibicija hemaglutinacije**). Prisutnost virusa u staničnoj kulturi moguće je otkriti i postupcima izravne ili neizravne imunofluorescencije, kao i molekularnim metodama (17).

Prednost kultivacije je što je moguće izolirati širok spektar virusa, ali je potrebno dobro odabrati staničnu kulturu. Također je pogodna i za detekciju nepoznatih ili neočekivanih virusa, kao i za izolaciju sojeva za epidemiološke studije i izradu cjepiva. Međutim, to je tehnički zahtjevna i skupa metoda i ne izvodi se izvan referalnih laboratorija, a rezultati ovise o vijabilnosti virusa tj. brzom transportu i održavanju hladnog lanca. Osim toga, budući da se vrijeme do identifikacije virusa mjeri u danima, to je i prespora metoda za pravovremenu odluku o liječenju. Osim ove klasične kultivacije, postoji i skraćena metoda kultivacije - *shell vial technique* kod koje se uzorak centrifugira na staničnu kulturu kako bi se pospješila interakcija virusa i stanica, te se nakon skraćene inkubacije inficirane stanice detektiraju monoklonskim protutijelima. Moguće je detektirati 8 virusa - Flu A i B, PIV 1-3, RSV, HMPV i AdV. Vrijeme

detekcije virusa je 48 sati te je to relativno brza metoda koja omogućava pravovremenu odluku o liječenju, a također ima osjetljivost i specifičnost bolju od metoda detekcije antigena. Međutim, tehnički je zahtjevnija i ne izvodi se izvan referalnih laboratorija, a rezultati isto tako ovise o brzom transportu i održavanju hladnog lanca (88).

1.2.1.2. **Nekultivacijske metode detekcije virusa**

1.2.1.2.1. Detekcija antigena

1.2.1.2.1.1. Imunokromatografska metoda

Imunokromatografska metoda (*Immunochromatographic Assay - ICA*) se temelji na upotrebi trakice koja sadrži nitroceluloznu membranu s antitijelima protiv virusnih antigena. Test je specifičan zbog monoklonskih protutijela protiv virusnih antigena koja su konjugirana na čestice koloidnog zlata, a konjugat je imobiliziran na poliesterskoj membrani. Nakon što se trakica umoči u uzorak razrijeđen u malom volumenu fiziološke otopine, uzorak i konjugat se kreću kapilarnim gibanjem i dolaze u kontakt s antitijelima adsorbiranim na nitroceluloznu membranu. Ukoliko uzorak sadrži virus, kompleks konjugat-virus ostaje vezan za antitijelo na nitroceluloznoj membrani. Rezultat je vidljiv nakon 15 minuta kao obojena linija na trakici. Otopina nastavlja migrirati do sekundarnog reagensa, anti-mišjeg IgG poliseruma koji veže višak konjugata i stvara drugu obojenu liniju na trakici. Ukoliko su obje linije prisutne, rezultat je pozitivan, ako je prisutna samo jedna linija, rezultat je negativan, a ukoliko linija nema, test nije važeći (89).

Imunokromatografskom metodom mogu se detektirati virusi influence A i B (Influ-A+B Respi-Strip) i respiratorni sincicijski virus (RSV Respi-Strip). To je vrlo brza i jednostavna metoda detekcije virusa koja ne iziskuje specijalnu opremu i može se izvoditi izvan virološkog laboratorija. Takav oblik testiranja naziva se *point-of-care* (POC) testiranje - testiranje na mjestu gdje se bolesniku pruža skrb. Test također pokazuje i dobru negativnu prediktivnu vrijednost (broj stvarno negativnih nalaza / broj svih negativnih nalaza) u vrijeme kada je prevalencija virusa visoka npr. u sezoni influence. Nedostatak testa, osim mogućnosti detekcije malog broja virusa, je i manja osjetljivost i specifičnost u odnosu na druge metode detekcije antigena kao što je izravna imunofluorescencija, a također i niska pozitivna prediktivna vrijednost testa (broj stvarno pozitivnih nalaza / broj svih pozitivnih nalaza) u vrijeme niske prevalencije virusa (88).

1.2.1.2.1.2. Imunofluorescentna metoda

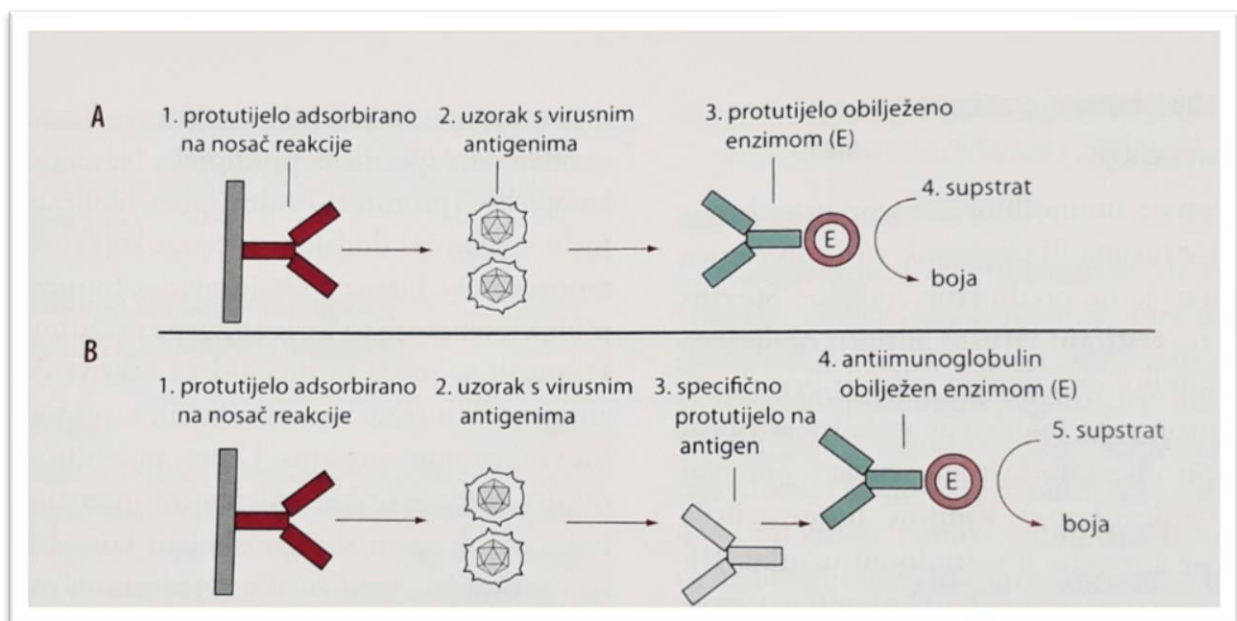
Izravna imunofluorescencija (*Direct Immunofluorescent Assay - DFA*) je metoda u kojoj se potencijalno inficirane epitelne stanice dišnog sustava iz uzorka fiksiraju na predmetno stakalce. Specifična protutijela na testirani virusni antigen obilježena su fluorescentnom bojom (fluorescein izotiocijanatom) i dodaju se na pripravak antigena. Nakon inkubacije stakalca se ispiru i gledaju u snopu ultraljubičastoga svjetla s pomoću fluorescentnog mikroskopa. Vidljiva fluorescencija otkriva prisutnost antigena u testiranom uzorku. U postupku neizravne imunofluorescencije (*Indirect Immunofluorescent Assay - IFA*) upotrebljava se sekundarno antiimunoglobulinski obilježeno protutijelo radi jačeg fluorescentnog signala. Pripravku uzorka najprije se dodaje neobilježeno protutijelo specifično za traženi virusni antigen. To su većinom kuničji imunoglobulini. Potom se nastali kompleksi antigena i protutijela otkrivaju sekundarnim antiimunoglobulin obilježenim protutijelima. Sekundarna antiimunoglobulinska protutijela obično potječu od kože i specifična su na kuničje imunoglobuline (90).

Detekcija virusa izravno iz kliničkog materijala imunofluorescentnom metodom s pomoću monoklonskih protutijela je brza metoda koja omogućuje potvrdu prisutnosti virusnih antigena u roku 2 do 4 sata. Moguće je detektirati 8 respiratornih virusa - Flu A i B, PIV 1-3, RSV, HMPV i AdV. Osjetljivost imunofluorescentne metode u prosjeku je oko 81% i najviša je za respiratorni sincicijski virus (84-99%), dok je najniža za adenoviruse (do 58%). Nedostatak metode je što je potreban adekvatno opremljen laboratorij i oprema (fluorescentni mikroskop) (73). Novija metoda je automatizirani imunofluorescentni esej čiji je spektar detekcije proširen za HCoV-OC43 i HBoV. Uzorak se postavi u aparat koji mjeri fluorescentni signal specifičnih imunokompleksa vezanih na polistirenske čestice. To je vrlo brza metoda s vremenom detekcije virusa od 20 minuta do 2 sata, a testiranje se može provoditi i u nelaboratorijskim uvjetima - *point-of-care* (POC) testiranje. Test ima bolju osjetljivost i specifičnost u odnosu na druge metode detekcije antigena, međutim ima visoku cijenu i potrebna je specijalna oprema (88).

1.2.1.2.1.3. Imunoenzimska metoda

U imunoenzimskoj reakciji (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA*) upotrebljavaju se specifična protutijela obilježena enzimom (peroksidaza ili alkalna fosfataza). U izravnoj imunoenzimskoj reakciji (*Direct ELISA*) obilježena protutijela specifična na virusne antigene adsorbirana su za dno i stijenke bazena mikrotitarske ploče. Uzorak pacijenta s potencijalno prisutnim virusnim antigenima dodaje se u bazene. Nakon inkubacije u sve bazene dodaju se obilježena specifična protutijela. Nastalom imunokompleksu (protutijelo + antigen + obilježeno protutijelo; antigen je u sendviču između dvaju protutijela) dodaje se supstrat kojeg će enzim

hidrolizom pretvoriti u boju. Intenzitet boje mjeri se fotometrom. Što je boja intenzivnija, više je antigena prisutno u uzorku. U neizravnoj imunoenzimskoj reakciji (*Sandwich ELISA*) faza 1 i 2 jednake su fazama postupka izravne imunoenzimске reakcije. U trećoj fazi dodaju se specifična protutijela na antigen koja su priređena u vrsti pokusne životinje različite od vrste uporabljene za izradu protutijela prve faze. Potom se dodaju antiimunoglobulini obilježeni enzimom. Dodavanjem supstrata enzimi će ga pretvoriti u obojeni produkt. Reakcija se otkriva fotometrijskim mjerenjem intenziteta nastale boje (91).



Slika 1. A - izravna; **B** - neizravna imunoenzimska reakcija za otkrivanje virusnih antigena u uzorku

(preuzeto iz: Kalenić S i sur. Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.)

Imunoenzimska metoda koristi se za brzo otkrivanje virusnih antigena (15-30 min), najčešće u dijagnostici virusa influence A i B i respiratornog sincicijskog virusa. Osjetljivost imunoenzimске metode vrlo je raznolika i može se kretati u rasponu 44-95% u dijagnostici virusa influence i 59-89% pri otkrivanju RSV-a. Tijekom povećane incidencije infekcija dišnih putova (prosinac-ožujak), osjetljivost ELISA testa za RSV povećava se na 93-100%, a za viruse influence do 74-100% (92). Imunoenzimski testovi obično su namijenjeni za korištenje u akutnim infekcijama kada je prisutan velik broj virusnih čestica. Klinički uzorci uzeti prekasno ili preuzeti i pohranjeni na pogrešan način (zamrzavanje materijala može dovesti do degradacije antigena i kao rezultat smanjuje osjetljivost ispitivanja) mogu sadržavati koncentraciju antigena ispod praga otkrivanja (73).

1.2.1.2.2. Molekularne metode detekcije

1.2.1.2.2.1. Detekcija DNA/RNA

Metodama detekcije zasnovanim na nukleinskim kiselinama otkrivaju se za virus specifični nizovi DNA ili RNA (*nucleic acid tests - NATs*). Nukleinska kiselina virusa izolirana je iz uzorka te se dio specifičan za patogen amplificira, odnosno umnoži, kako bi se povećala osjetljivost ovih testova. Budući da je u uzorku prisutna mala količina virusnog genoma, amplifikacija je nezaobilazan korak, te se nazivaju i metode detekcije zasnovane na amplifikaciji nukleinskih kiselina (*nucleic acid amplification tests - NAATs*). Umnožena nukleinska kiselina se detektira gel elektroforezom, spektrofotometrijski ili pomoću specifičnih proba koje se komplementarno vežu na ciljnu nukleinsku kiselinu (93). Postupci amplifikacije nukleinskih kiselina su:

Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom (*Polymerase Chain Reaction - PCR*) je metoda eksponencijalne *in vitro* sinteze fragmenata molekule DNA. Tom metodom se relativno kratki dio DNA umnožava u veliki broj identičnih kopija.

Izolirana DNA odnosno dvolančana DNA koja sadrži fragment od interesa naziva se DNA matrica. DNA matrica služi kao kalup po kojem se vrši umnažanje fragmenta od interesa odnosno sinteza amplikona. Amplificirani fragment od interesa ne smije biti manji od 50 ni veći od 35000 parova baza.

Za izvođenje PCR-a, pored izolirane DNA potreban je niz reagensa koje zajedno nazivamo PCR mješavina (eng. *PCR master mix*). PCR mješavina sadrži:

Početnice (eng. *primers*) - *in vitro* sintetizirani jedolančani oligonukleotidi dužine 20-30 nukleotida čije su sekvence komplementarne krajevima DNA fragmenata od interesa. Za umnažanje jednog DNA fragmenta potrebne su dvije početnice; F (eng. *forward*) početnica komplementarna 5' kraju DNA fragmenta te R (eng. *reverse*) početnica komplementarna 3' kraju. Specifičnost PCR reakcije temelji se na specifičnosti sekvence početnica. Početnice čija je sekvenca specifična za točno određeni fragment DNA uvjetovat će umnažanje isključivo dotičnog fragmenta DNA matrice. Razvijeni su i multiplex PCR protokoli kojima se u jedinstvenoj PCR reakciji, korištenjem adekvatnog broja specifičnih početnica, umnažaju dva ili više specifična fragmenta DNA matrice.

dNTP (eng. *deoxynucleoside triphosphates*) - smjesa deoksinukleozid trifosfata (dATP, dTTP, dCTP i dGTP). Deoksinukleozid trifosfati su osnovne građevne jedinice DNA, te se njihovom polimerizacijom u PCR-u sintetiziraju amplikoni odnosno umnaža DNA fragment od interesa.

DNA polimeraza - enzim s funkcijom sinteze odnosno replikacije DNA. U PCR reakciji najčešće se koristi Taq polimeraza izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus* koja živi u termalnim izvorima. Upravo je stoga Taq polimeraza otporna na visoke temperature i najaktivnija oko 70 °C.

MgCl₂ - ioni magnezija neophodni su za aktivnost DNA polimeraze.

PCR pufer - standardni pufer u kojem se odvija PCR. Po sastavu je blago lužnata vodena otopina soli poput primjerice KCl i MgCl₂.

Reakcijska smjesa (DNA matrica i PCR mješavina) stavlja se u PCR tubice koje se potom polažu u termocycler aparat. Termocycler aparat izvodi zadani PCR protokol te se PCR reakcija provodi pod kontrolom računala.

Osnovni PCR protokol:

Inicijalizacija (eng. *initialization*) - u prvome stadiju grijanje (90-98 °C) uzrokuje kidanje vodikovih veza između A-T i C-G, odnosno odvajanje lanaca izdvojene DNA, te se dvolančana DNA denaturira na jednolančane molekule.

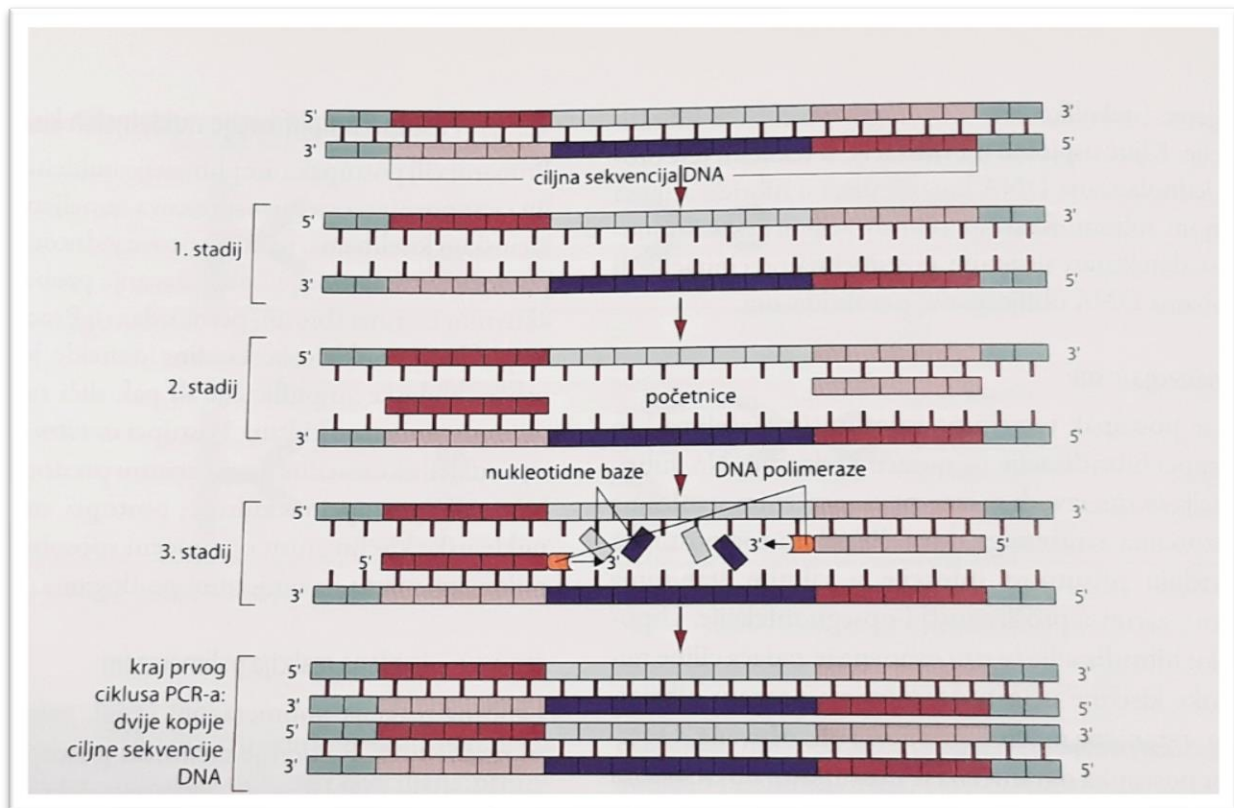
Umnažanje (eng. *amplification*) - ciklus umnažanja ponavlja se više puta (20-50) kako bi se eksponencijalno povećao broj umnoženih fragmenata DNA (amplikoni). U ponovljenim ciklusima umnažanja, pored osnovne DNA matrice, i novosintetizirani amplikoni služe kao kalup za umnažanje fragmenata.

- 1. Denaturacija (eng. *denaturation*)** - svaki ponovljeni ciklus umnažanja započinje grijanjem na 90-98 °C i denaturacijom DNA. U ponovljenim ciklusima umnažanja, pored osnovne DNA matrice, i novosintetizirani amplikoni služe kao kalup za sintezu novih lanaca.
- 2. Prijanjanje (eng. *annealing*)** - u drugom stadiju snižavanjem temperature dolazi do hibridizacije DNA i početnica, odnosno ponovne tvorbe vodikovih veza između početnica i komplementnih nukleotidnih sekvencija lanca DNA. Temperatura ovisi o vrsti početnica, no uglavnom je između 45 i 65 °C.
- 3. Elongacija (eng. *elongation*)** - faza sinteze amplikona, tj. novih DNA lanaca na temperaturi 70-80 °C. Taj je lanac u biti ekstenzirani dio svake početnice, a za njegovu sintezu potrebni su DNA polimeraza i supstrat nukleotida.

Terminacija (eng. *termination*) - dovršavanje sinteze nedovršenih amplikona na temperaturi 70-80 °C. Nakon ponavljanja PCR ciklusa zadani broj puta, korakom terminacije završava PCR reakcija.

Održavanje (eng. *hold*) - nije dio PCR reakcije već pomoćni korak koji osigurava stabilnost amplikona na 4-15 °C do njihove upotrebe ili pohrane. Amplikoni su u normalnim uvjetima

stabilni te se mogu skladištiti mjesecima na 8 °C, godinama na -20 °C i neodređeno na -80 °C ili u tekućem dušiku (94).



Slika 2. Lančana reakcija polimerazom za amplifikaciju specifične sekvencije DNA (preuzeto iz: Kalenić S i sur. Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.)

Amplifikacija RNA postupkom reverzne transkripcije

Amplifikacija RNA postupkom reverzne transkripcije (*Reverse Transcription PCR - RT-PCR*) je metoda u kojoj je polazni genetski materijal molekula RNA budući da su mnogi virusni genomi prisutni samo kao RNA. Ciljna se RNA može detektirati PCR-om pod određenim uvjetima. Izdvojena molekula RNA najprije se mora pretvoriti u komplementarni lanac DNA (eng. *copy DNA*, *cDNA*). Ta se pretvorba radi s pomoću reverzne transkriptaze. Komercijalni pripravak termostabilne polimeraze DNA dobiven je iz termofilne bakterije *Thermus thermophilus* (Tth pol) ili *Thermus aquaticus* (Taq pol). Ta termostabilna polimeraza DNA posjeduje učinkovitu aktivnost reverzne transkriptaze. Novonastale cDNA rabe se kao kalupi u PCR-u (95, 96).

Tablica 4. Metode detekcije zasnovane na amplifikaciji nukleinskih kiselina (NAATs)
 (preuzeto iz: Ljubin Sternak, S. Suvremena dijagnostika virusnih infekcija dišnog sustava.
 Dostupno na: [www.stampar.hr/sites/default/files/Projekti/ljubin_sternak - suvremena_dg.pdf](http://www.stampar.hr/sites/default/files/Projekti/ljubin_sternak_-_suvremena_dg.pdf))

METODA	GLAVNE ZNAČAJKE
<p>Konvencionalni PCR</p> <p>- detekcija na gelu ili spektrofotometrom</p>	<p>spor (2 dana)</p> <p>nema kvantifikacije</p> <p>visok rizik kontaminacije</p>
<p>Real-time PCR</p> <p>- istovremena detekcija uz amplifikaciju (hidroliza fluorescentnih proba emitira signal)</p> <p>Važno je da se postupak pretvaranja RNA u cDNA, označavan karticom RT-PCR, ne zamijeni s kvantitativnim PCR-om (eng. <i>quantitative PCR, qPCR</i>) koji se alternativno još naziva i PCR u realnom vremenu (eng. <i>real-time PCR, rt-PCR</i>)!</p>	<p>mogućnost kvantifikacije</p> <p>ograničena mogućnost detekcije više patogena istovremeno (do 5)</p>
<p>PCR vezan uz Luminex tehnologiju detekcije</p> <p>- klasični PCR uz detekciju amplikona hibridizacijom na specifično označene mikročestice koje se detektiraju laserom</p>	<p>velik broj detekcije više patogena istovremeno</p> <p>nema mogućnosti kvantifikacije</p>
<p>Izotermalne reakcije (NASBA, LAMP)</p> <p>- izotermalni enzimi koji dovode do stvaranja intermedijarnih DNA ili RNA/DNA produkata</p>	<p>nije potreban termalni cycler</p> <p>nije potreban RT korak za RNA viruse</p> <p>kvantifikacija zahtjevna</p>
<p>Brzi dijagnostički instrumenti - POC molekularni testovi</p> <p>- integrirana izolacija i amplifikacija nukleinskih kiselina u zatvorenim kasetama ili vrećicama</p>	<p>odlični POC testovi, ali zatvoreni sustavi</p> <p>kontaminacija svedena na minimum</p> <p>skupi</p>

Metode detekcije zasnovane na amplifikaciji nukleinskih kiselina (NAATs) danas su prihvaćene kao jedan od zlatnih standarda molekularne biologije u biomedicini i zdravstvu zbog svoje visoke specifičnosti i osjetljivosti, jednostavnosti i sve veće automatiziranosti. To su vrlo brze metode s vremenom detekcije virusa od 30 minuta do 2 dana, a spektar detekcije virusa ovisi o specifičnim početnicama i metodi te je moguća istovremena detekcija od jednog do nekoliko desetaka patogena. Posebno su pogodne za viruse koji se teško kultiviraju ili se ne mogu kultivirati kao što su HBoV i PIV-4 (97).

Za razliku od većine tradicionalnih mikrobioloških dijagnostičkih postupaka, za PCR testiranje potrebna je vrlo mala količina uzorka, a čak se i izrazito male količine DNA mogu uspješno umnožiti metodom *nested* PCR kojom se PCR produkt iz prve PCR reakcije koristi kao kalup za novi PCR. Također, modifikacijom konvencionalnog PCR-a u real-time PCR, postavljanje dijagnoze nadopunjuje se kvantitativnim nalazom prisustva infektivnog agensa, a kvantifikacija virusa u uzorku može pomoći i kod razlučivanja pravog uzročnika bolesti u slučajevima kodetekcije više respiratornih virusa (98).

Pored navedenih karakteristika, PCR je iznimno vrijedna metoda dijagnostike infektivnih bolesti jer prepoznaje isključivo živi ili neposredno umrli mikroorganizam. Naime, DNA odumrlog mikroorganizma brzo je razgrađena djelovanjem okolnog tkiva i imunološkog sustava domaćina. Zbog toga PCR prepoznaje gotovo isključivo aktivnu infekciju neovisno o stupnju razvijenosti kliničke slike. Iz istog razloga PCR testiranje ne signalizira u prošlosti preboljele infekcije što je pak veliki nedostatak nekih imunoloških dijagnostičkih testova (94).

Međutim, visoka osjetljivost NAATs nosi sa sobom rizik da se detektira asimptomatsko izlučivanje virusa, a postoji i mogućnost kontaminacije zbog velike osjetljivosti što će dovesti do pojave lažno pozitivnih rezultata. Također, provođenje ovih metoda zahtijeva skupu opremu te visoku profesionalnost i educiranost laboratorijskog osoblja (88).

1.2.2. Neizravna dijagnostika

Uzorak bolesnikove krvi uzima se za dokaz specifičnih protutijela na virusne antigene i mjerenje njihove razine u svrhu utvrđivanja imunosnog odgovora na virusnu infekciju. Za serološka testiranja rabi se serum odvojen iz uzorka bolesnikove krvi. Uobičajeno se uzima 8-10 mL venske krvi, odnosno 3-4 mL u djece. Epruvetu s uzorkom krvi treba ostaviti na sobnoj temperaturi najmanje 20-30 minuta, sve dok se ne stvori ugrušak. Ugrušak se potom odstrani, a preostali se dio centrifugira radi izdvajanja seruma (99).

Uzorak seruma može se pohraniti na temperaturi od 4 do 6 °C nekoliko tjedana, a dugoročno se pohranjuje na temperaturi -20 °C i nižoj (17).

1.2.2.1. **Detekcija specifičnih protutijela u bolesnikovu serumu**

Primarne virusne infekcije karakterizira promjena imunosnoga statusa od neprisutnih do prisutnih specifičnih protutijela u serumu inficiranog domaćina. To je „serološka konverzija“ ; od početka infekcije razine su specifičnih protutijela u krvi postupno sve više. Akutna infekcija se može dokazati i otkrivanjem prisutnih određenih imunoglobulinskih klasa (IgM, IgA) kao i usporedbom titra protutijela u uzorcima bolesnikova seruma uzetih u pravilnim razmacima tijekom bolesti. Na akutnu infekciju upućuje četverostruki (ili viši) porast titra protutijela između seruma uzetih u akutnoj fazi bolesti i seruma uzetih tijekom rekonvalescentne faze. Serume akutne i rekonvalescentne faze bolesti treba testirati istodobno. Uzorke krvi u akutnoj fazi bolesti poželjno je uzeti što prije, ne nakon 5 do 7 dana od početka bolesti. Uzorci rekonvalescentne faze bolesti obično se uzimaju 10 do 14 dana nakon uzimanja uzoraka akutne faze bolesti. Ponovne infekcije (reinfekcije) domaćina, kasnije tijekom života, uzrokuju anamnestički (sekundarni ili dodatno pojačani „booster“) odgovor (72).

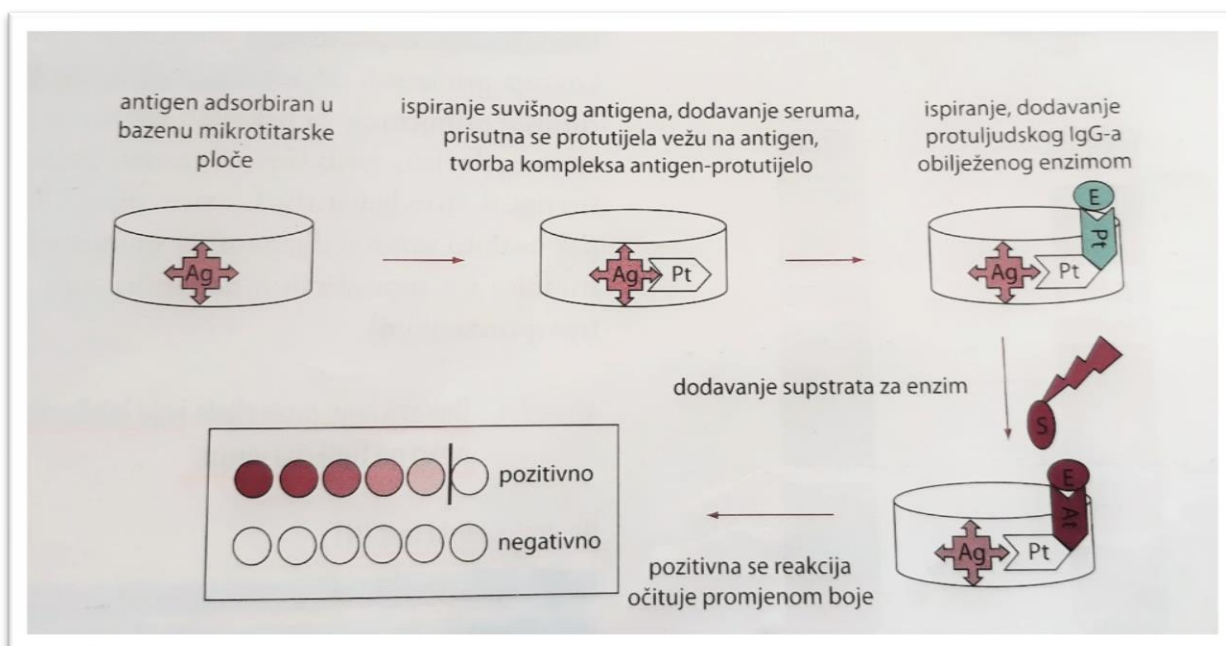
1.2.2.1. Postupci u serološkoj dijagnostici virusnih infekcija dišnog sustava

Postupci koji se primjenjuju u serološkoj dijagnostici virusnih infekcija mogu se svrstati u tri skupine:

- 1. Postupci kojima se izravno dokazuje interakcija antigena i protutijela** - neizravni imunoenzimski postupak, neizravni imunofluorescentni postupak
- 2. Interakcija antigena i protutijela koja se otkriva pojavama nespecifičnima za virus** - reakcija vezanja komplementa
- 3. Dokazivanje protutijela koja inhibiraju neku od funkcija virusa** - neutralizacijski test, inhibicija hemaglutinacije (17)

1.2.2.1.1.1. Neizravni imunoenzimski postupak

U neizravnom imunoenzimskom postupku (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA*) virusni su antigeni vezani za nosač reakcije (npr. stijenke i dno bazena mikrotitarske ploče) radi hvatanja i odvajanja specifičnih protutijela iz testiranog uzorka seruma. Protutijela vezana za antigen dokazuju se s pomoću protutijela na ljudske imunoglobuline obilježene enzimom. Razine protutijela određuju se spektrofotometrijski na osnovi intenziteta boje nastale enzimatskom promjenom upotrijebljenog supstrata. Rezultati ELISA postupka izražavaju se kvalitativno (pozitivno, negativno) ili kvantitativno (titar, laboratorijske jedinice) (100).



Slika 3. Neizravni imunoenzimski postupak (ELISA) za otkrivanje specifičnih protutijela u testiranim uzorcima bolesnikova seruma; Ag - antigen; Pt - protutijelo; E - enzim; S - supstrat (preuzeto iz: Kalenić S i sur. Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.)

1.2.2.1.1.2. Neizravni imunofluorescentni postupak

Neizravni imunofluorescentni postupak (*Indirect Immunofluorescent Assay - IFA*) primjenjuje se za detekciju specifičnih virusnih protutijela u uzorcima bolesnikova seruma s pomoću stanica inficiranih virusom i pričvršćenih na predmetno stakalce. Nastalom kompleksu antigen-protutijelo se dodaje protutijelo na ljudske imunoglobuline obilježeno fluorescentnom bojom, te se kompleks otkriva nastalom fluorescencijom u snopu ultraljubičastih zraka pomoću fluorescentnog mikroskopa (100).

1.2.2.1.1.3. Reakcija vezanja komplementa

Reakcija vezanja komplementa (RVK) je postupak kojim se dokazuje prisutnost kompleksa antigen-protutijelo s pomoću aktiviranoga komplementa; ako se komplement veže za kompleks antigen-protutijelo, tada izostaje liza eritrocita u indikatorskom sustavu (ovčji eritrociti + hemolizin). U suprotnome, ako u testiranom serumu nema protutijela, komplement se ne veže za kompleks, nego nastaje liza eritrocita u indikatorskom sustavu. Prije izvođenja serološke reakcije potrebno je ukloniti komplement prisutan u testiranom uzorku seruma tako da se serum toplinski obradi u vodenoj kupelji (30 min/56 °C) (101).

1.2.2.1.1.4. Neutralizacijski test

Neutralizacijski test (NT) se osniva na tome da protutijela vezana za virusnu česticu onemogućuju virusu vezanje za receptore primljivih stanica. Protutijela neutraliziraju virus i inhibiraju infekciju stanične kulture, pa izostaje pojava citopatičnog učinka virusa u kulturi. Neutralizacijska su protutijela humoralni odgovor na tipno-specifične virusne antigene. Nastaju rano u tijeku infekcije i dugo perzistiraju (102).

1.2.2.1.1.5. Inhibicija hemaglutinacije

Inhibicija hemaglutinacije (IHA) primjenjuje se u serološkoj dijagnostici virusnih bolesti koje uzrokuju hemaglutinacijski virusi koji su sposobni aglutinirati eritrocite čovjeka (krvna grupa 0) i različitih vrsta životinja (npr. pile, zamorac). Ta se reakcija može specifično inhibirati krvnim serumima koji sadržavaju specifična heminhibicijska protutijela. Protutijela iz seruma inhibiraju vezanje virusa za eritrocite, odnosno inhibiraju aglutinaciju eritrocita (103).

Tablica 5. Serološki testovi za dokaz specifičnih protutijela na virusne antigene

(prilagođeno iz: Kalenić S i sur. Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.)

Protutijela na antigene virusa	Serološki postupak
HRV	ELISA, RVK, NT, IHA
AdV	ELISA, IFA, RVK, NT, IH
RSV	ELISA, IFA, RVK, NT
PIV	RVK, NT, IHA
Flu	ELISA, IHA
HCoV	ELISA, IFA, RVK, IHA (HCoV-OC43)
HBoV	ELISA, IFA
HMPV	ELISA, IFA
HEV	IFA, RVK, NT, IHA

Dokazivanje porasta titra specifičnih protutijela upotrebljava se uglavnom retrospektivno za epidemiološka istraživanja te radi otkrivanja najimunogenijeg proteina virusa u proizvodnji cjepiva. Rutinska primjena serološke dijagnostike često nema dijagnostičku važnost zbog velikog broja različitih serotipova i nedovoljne križne reaktivnosti. Osim toga, utvrđivanje dinamike stvaranja protutijela može biti otežano zbog križnih reakcija između protutijela i

srodnih virusnih antigena, npr. infekcija virusom parainfluence jednog tipa koja se pojavljuje u prisutnosti protutijela za drugi tip. Serološki odgovor u djece često je slab, a stvaranje protutijela može katkad i izostati unatoč prisutnosti teškog oblika bolesti (17). U Odsjeku za virološku serologiju i zoonoze Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo radi se serološka dijagnostika adenovirusa, virusa influence, virusa parainfluence i respiratornog sincicijskog virusa (104).

1.3. KLINIČKI OBLICI AKUTNIH RESPIRATORNIH INFEKCIJA

Klinički se akutne respiratorne infekcije očituju cijelim spektrom različitih simptoma i različitom težinom bolesti, što ponajprije ovisi o otpornosti, odnosno sklonosti čovjeka prema infekciji, a zatim i o vrsti i patogenosti uzročnog mikroorganizma. Zbog toga su ARI najučestalije i s težim kliničkim slikama u ranoj dječjoj, poglavito dojenačkoj dobi, u kojoj još nije dovršeno dozrijevanje, niti uspostavljena puna funkcija imunskog sustava. Vjerojatnost da će se nakon ekspozicije razviti klinički uočljiva bolest jest 1:1 ili 1:2 za dojenčad, a 1:4 ili 1:5 u starije djece i odraslih (2). Osim toga, jedan uzročnik može uzrokovati različite oblike bolesti, a određeni klinički sindrom može biti uzrokovan različitim mikroorganizmima. Akutne respiratorne infekcije klinički se dijele na infekcije gornjih i infekcije donjih dišnih putova (6).

1.3.1. Infekcije gornjih dišnih putova

Infekcije gornjih dišnih putova (IGDP) višestruko su češće, te u pravilu lakše od infekcija donjih dišnih putova. Najvažnije komplikacije virusnih infekcija gornjeg dijela dišnog sustava jesu upala sinusa (sinusitis) i srednjeg uha (otitis media). One u pravilu nastaju nakon prethodne virusne infekcije kao rezultat superinfekcije, odnosno prodora kolonizirajućih bakterija iz nazofarinksa prirodnim komunikacijskim putovima u sinusne šupljine i srednje uho. Najvažniji bakterijski uzročnici superinfekcija su *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis* (6).

1.3.1.1. Akutni nazofaringitis (obična prehlada)

Najblaži oblik bolesti, bez povišene temperature, naziva se akutni nazofaringitis, odnosno obična prehlada. Obična prehlada pojavljuje se tijekom cijele godine, ali je zimi češća zbog slabije otpornosti respiratorne sluznice, češćih i bližih međusobnih dodira ljudi i neprovjetravanja prostorija. Uzročnici su različiti respiratorni virusi, u pravilu oni slabije

virulencije. Najvažniji i najbrojniji su rinovirusi, zatim po učestalosti slijede koronavirusi, virusi parainfluence, respiratorni sincicijski virusi te zimi virusi influence (18).

Prehlada je vrlo blaga bolest, a ističu se samo lokalni respiratorni simptomi - hunjavica, kihanje, osjećaj punoće i začepjenosti nosa, pečenje očiju, a katkad i blaža grlobolja. Uz to se pojavljuje sekrecija bistrog, tekućeg ili sluzavog iscjetka iz nosa. U manjem broja oboljelih pojavljuje se i nadražajni kašalj, koji nije dugotrajan. Osjet mirisa je obično oslabljen. Zbog edema i začepjenosti Eustachijeve cijevi može se pojaviti i zaglušenost s blažim bolima u uhu, što je osobito karakteristično u male djece. Povišena temperatura i drugi opći simptomi obično izostaju. Bolest je samoizlječiva nakon prosječnog trajanja od 4 do 6 dana, a u nekih bolesnika respiratorni simptomi mogu potrajati i do dva tjedna (105, 106).

1.3.1.2. Febrilni respiratorni katar

Prehlada koja je praćena povišenom temperaturom i drugim općim simptomima naziva se febrilni respiratorni katar (lat. *catarrhus febrilis respiratorius* - *CFR*). Taj naziv izvodi se iz samih simptoma, a označuje bolesnika s povišenom temperaturom (febrilan) i nekim respiratornim simptomima (respiratorni) te virusnom naravi upale koja je kataralna (katar), za razliku od gnojne (bakterijske) upale (105). Uzročnici su različiti respiratorni virusi, koji imaju jaču virulenciju. Najvažniji su virusi parainfluence (tipovi 1, 2 i 3) i adenovirusi, a u male djece osobito je čest respiratorni sincicijski virus. Težina bolesti ovisi o vrsti i patogenosti uzročnika te otpornosti čovjeka, a simptomi se pojavljuju u čitavom spektru od konjunktivitisa, hunjavice, začepjenosti nosa do grlobolje, promuklosti, kašlja i znakova karakterističnih za krup (18).

1.3.1.3. Tonzilofaringitis

U starije djece i adolescenata često se pojavljuje tonzilofaringitis, akutna upala sluznice ždrijela i Waldeyerova limfatičkog prstena (tonzila i adenoidnih vegetacija) uzrokovana različitim virusima (rinovirusi, koronavirusi, adenovirusi, virusi parainfluence), atipičnim bakterijama i β -hemolitičkim streptokokom grupe A (BHS-A) (1). U tonzilektomirane djece obično govorimo o akutnom faringitisu. Glavni simptom tonzilofaringitisa jest bol u ždrijelu, osobito pri gutanju. U dojenčadi i male djece koja ne znaju lokalizirati i opisati bol, prvi simptom može biti odbijanje hrane (2). Ključno je razlikovati faringitis uzrokovan BHS-A od znatno češćih virusnih faringitisa. Vjerojatnost streptokokne angine procjenjuje se na temelju Centorovih kriterija: nagao početak uz febrilitet $> 38^{\circ}\text{C}$, gnojni eksudat na tonzilama, povećani i bolni angularni vratni limfni čvorovi, odsutnost kataralnih simptoma i kašlja (**4 boda** - bolesnici s velikom vjerojatnošću za streptokoknu grlobolju, **2-3 boda** - bolesnici s umjerenom vjerojatnošću za

streptokoknu grlobolju, **0-1 bod** - bolesnici s malom vjerojatnošću za streptokoknu grlobolju). Ipak, definitivna dijagnoza faringitisa uzrokovanog β -hemolitičkim streptokokom grupe A počiva na mikrobiološkom dokazu uzročnika u kulturi („zlatni standard“) i/ili testovima za brzi dokaz antigena u obrisku ždrijela (107).

Tablica 6. Razlike između streptokokne angine i virusnih tonzilofaringitisa

(preuzeto iz: Kuzman I. Osobitosti akutnih respiratornih infekcija u starije djece i adolescenata. Medicus, 19(1_Adolescencija_2). 2010:41-50.)

Značajke	Streptokokna angina	Virusni tonzilofaringitis
Početak	nagao	postupan
Temperatura	vrlo visoka, često s tresavicom	umjereno povišena, bez tresavice
Opći simptomi	jače izraženi	manje izraženi
Respiratorni simptomi	samo grlobolja, osobito naglašena	hunjavica, konjunktivitis, promuklost, kašalj; grlobolja je slabije istaknuta
Ždrijelo	izrazito crveno s gnojnim eksudatom	crveno bez eksudata ili sa seroznim eksudatom
Limfni čvorovi	angularni povećani i bolni	mogu biti povećani svi na vratu, nisu bolni
Broj leukocita	leukocitoza s neutrofilijom	obično normalan s limfocitozom
Obrisak ždrijela	BHS, skupina A	negativan
Liječenje	antibiotik	simptomatsko

1.3.1.4. Akutni laringotraheobronhitis (krup)

Akutni laringotraheobronhitis (krup) je virusna infekcija respiratornog sustava od koje obolijevaju uglavnom djeca u dobi od 6 mjeseci do 3 godine života (108). Najčešće ga uzrokuje virus parainfluence tip 1, ali i tipovi 2 i 3, respiratorni sincicijski virus te virusi influence A i B. Pojavi krupa prethodi jedan do nekoliko dana povišene temperature i simptoma infekcije gornjih dišnih putova (sekrecija iz nosa, crvenilo i pečenje u grlu, kašalj). Početak krupa obilježava pojava promuklosti i neproduktivnoga lavežnog kašlja, uz brz razvoj inspiratornog stridora. To su karakteristični znakovi krupa koji nastaju kao posljedica upalnih promjena na

sluznicama larinksa i traheje, i opstrukcije osobito u subglotičkom području. Stridor je zvučni fenomen koji nastaje aktivnim uvlačenjem zraka kroz suženo subglotičko područje u inspiriju. Zbog visoke popustljivosti stijenki zračnih putova u dojenčadi i male djece opstrukcija je u njih najintenzivnija. Bržemu nastanku i većemu stupnju opstrukcije pridonosi općenito uzak promjer larinksa i glotisa u dječjoj dobi (18).

Za razliku od blagog oblika bolesti, djeca s umjerenim i teškim oblikom krupa razvijaju tahipneju, obično 35-45/min, te pri disanju koriste pomoćnu respiratornu muskulaturu (109), a auskultatorno se uz inspiratorni stridor nalaze i šumovi, hropci, pa čak i produženi izdisaj. Krup je u većini slučajeva samoizlječiva bolest s trajanjem 3-7 dana. Simptomi blagog laringotraheobronhitisa povlače se već nakon 48 sati. Manje od 5% djece zbog težine bolesti zahtijeva hospitalizaciju, a među hospitaliziranimima 1-3% zbog razvoja respiratorne insuficijencije zahtijeva intenzivno liječenje intubacijom i mehaničkom ventilacijom (110). Krup se javlja češće i u težem obliku u muške djece (18).

1.3.2. Infekcije donjih dišnih putova

U infekcije donjih dišnih putova (IDDP) ubrajaju se akutni bronhitis, bronhiolitis te pneumonija kao najteža upalna bolest u dišnome sustavu (6).

1.3.2.1. Akutni bronhitis

Akutni bronhitis je kliničko stanje karakterizirano kratkotrajnom upalom sluznice traheobronhalnog stabla, koje je obično povezano s virusnim respiratornim infekcijama gornjeg dijela dišnog sustava. Posebno je čest za vrijeme epidemije influence A. Najčešći uzročnici akutnog bronhitisa su virusi influence, adenovirusi, ali i rinovirusi i koronavirusi, te u djece osobito respiratorni sincicijski virus i virusi parainfluence (111). Češće se pojavljuje u zimskim mjesecima, a najčešće oboljevaju djeca do 5 godina (6).

Početni simptomi bronhitisa najčešće su istovjetni sa simptomima infekcije gornjih dišnih putova: hunjavica, blaža grlobolja, promuklost. Vodeći simptom bronhitisa je kašalj koji se pojavljuje rano i razvija tijekom bolesti. U početku je suh i nadražajan, a sljedećih dana postaje produktivan s bjelkastim ili žućkastim iskašljajem. Iskašljaj može biti i zelenkast, mukopurulentan ili purulentan ako nastane sekundarna bakterijska infekcija (112). U male djece temperatura je redovito povišena, a može biti i vrlo visoka. Auskultacijskim pregledom pluća nalaze se difuzno pooštreno disanje i difuzno prošireni polifoni bronhitički šumovi. Ako uz to postoje znakovi opstrukcije bronha (produljen ekspirij s mnoštvom visokotonskih,

polifonih zvižduka pretežno u ekspiriju), nije više posrijedi jednostavni traheobronhitis, nego je riječ o opstruktivnom bronhitisu koji se javlja najčešće u prvoj i drugoj godini života i pokazuje sklonost recidivima (2). Rendgenska je slika pluća uredna i najvažniji je razlikovni znak prema pneumoniji. U akutnom bronhitisu svi simptomi i znakovi bolesti povlače se najkasnije za tri tjedna (18).

1.3.2.2. Bronhiolitis

Bronhiolitis je akutna infekcija donjeg dijela respiratornog trakta virusne etiologije. Obolijevaju djeca mlađa od 2 godine, s najvećom učestalošću od 3 do 6 mjeseci života. Obolijevaju češće muška djeca u omjeru 1.5:1 (18). Virusni bronhiolitis najčešći je uzrok hospitalizacija male djece u razvijenom svijetu te se zbog razvoja bronhiolitisa hospitalizira jedno od devetero djece u prvoj godini života (113). Bronhiolitis najčešće uzrokuje respiratorni sincicijski virus, a odmah iza njega virusi parainfluence. U Hrvatskoj je RSV uzročnik 78.4% svih bronhiolitisa (17). Zahvaljujući epidemijskoj pojavi RSV infekcija u zimi i ranom proljeću (114) i virusa parainfluence u jeseni i proljeću, bronhiolitis je bolest sezonskog javljanja. Bronhiolitis rjeđe mogu uzrokovati i ostali respiratorni virusi. Slučajevi uzrokovani adenovirusima i rinovirusima javljaju se endemski tijekom cijele godine, a slučajevi uzrokovani enterovirusima epidemijski u ljetnoj sezoni (18).

Pojavi bolesti obično prethodi infekcija gornjeg dijela dišnog sustava praćena rinitisom i kašljem, a nakon 2-3 dana nastupaju simptomi bronhiolitisa s pojačavanjem kašlja, razvojem opstruktivne dispneje, tahipneje (do 80/min), tahikardije, uvlačenjem međurebrenih prostora i juguluma. Kašalj je suh i tvrdokoran. Tjelesna temperatura može biti normalna ili povišena do 40°C (115). Opće stanje djeteta može varirati od stanja sličnog prehladi do teškoga respiratornog distresa koji nalaže primjenu mehaničke ventilacije (5 do 10% hospitalizirane djece) (2). Auskultatorni nalaz nad plućima uključuje oslabljeni šum disanja, produljen, otežan ekspirij s mnogo visokotonskih polifonih zvižduka (eng. *wheezing*) te mnoštvo vlažnih hropčića i kreptacija u inspiriju (18). Na rendgenogramu pluća nalazi se karakteristična hiperinflacija sa spuštenim dijafragmama, povećanom prozračnošću plućnog parenhima i pojačanim bronhovaskularnim crtežom. Obično se nalaze i područja atelektaza različite veličine koja je često teško razlikovati od pneumoničnih infiltrata (116).

Bronhiolitis traje 3-7 dana. Oporavak je postepen i traje 1-2 tjedna, katkad i duže (18). Velik broj djece i nakon infekcije ima ponavljane epizode kašlja i opstrukcije koje traju tjednima i mjesecima, a katkad i do 11 - 13. godine života uz povećan rizik od razvoja astme (117).

1.3.2.3. Pneumonija

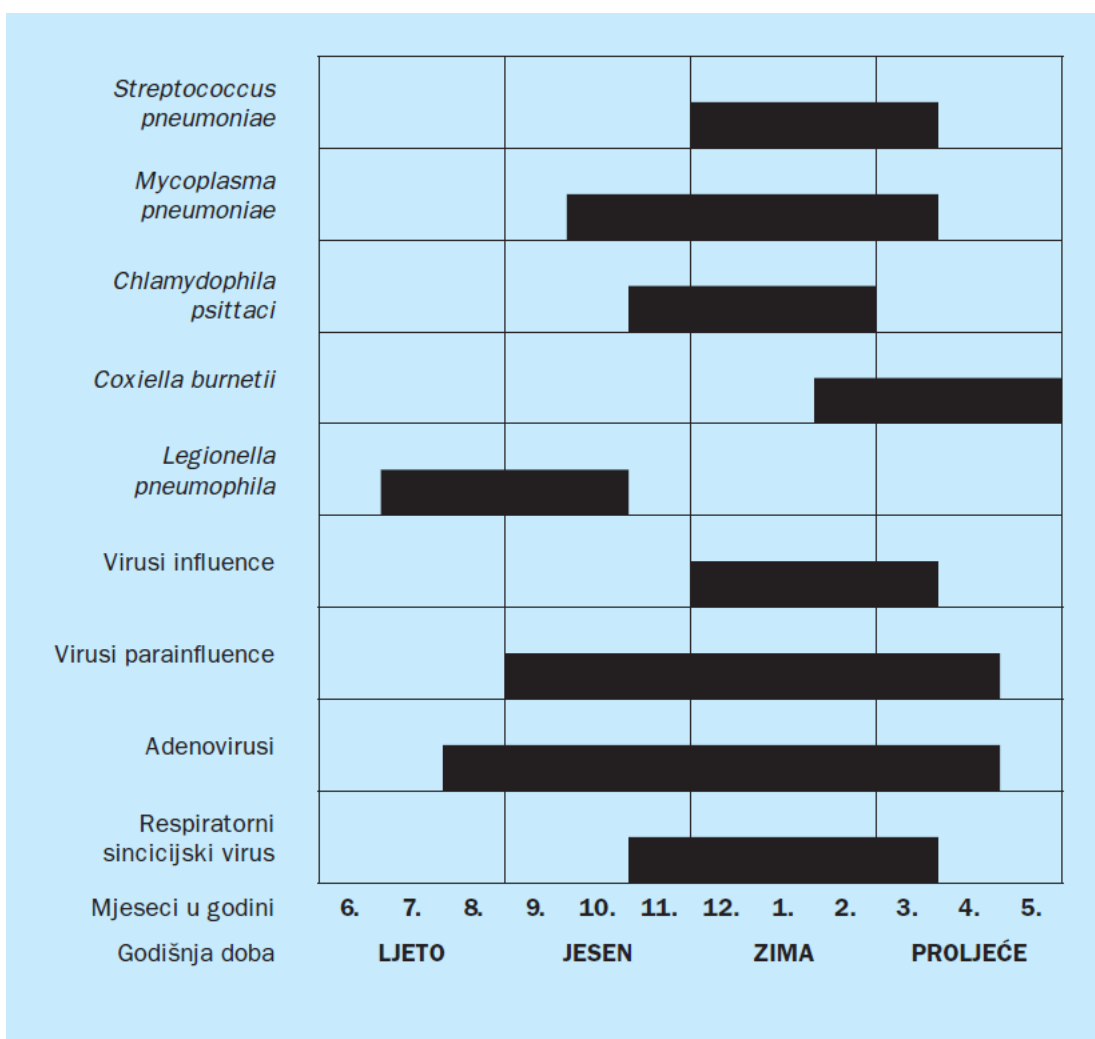
Pneumonijom se označava akutna upala plućnog parenhima koja je uzrokovana brojnim i raznovrsnim mikroorganizmima. To je najvažnija upalna bolest u dišnom sustavu, iako sudjeluje samo s jednim postotkom u svim akutnim infekcijama dišnog sustava (6). Incidencija pneumonija u djece mlađe od pet godina u Europi i Sjevernoj Americi kreće se od 3 do 4% , a u djece između dvanaeste i petnaeste godine života oko 0.7%. U zemljama u razvoju godišnja je stopa učestalosti i do deset puta veća uzrokujući smrt u više od dva milijuna djece (118). Prema okolnostima nastanka i poticajnim čimbenicima pneumonije se dijele na izvanbolničke pneumonije (pneumonije iz opće populacije, eng. *community-acquired pneumonia*), bolničke pneumonije (hospitalne, nozokomijalne) i pneumonije u bolesnika s oslabljenom imunošću. Klinički se razvrstavaju na bakterijske i atipične, koje su uzrokovane atipičnim bakterijama i virusima (18). Nakon novorođenačke dobi, pa sve do navršenog 6. mjeseca života djeteta prevladavaju virusni uzročnici izvanbolničkih pneumonija, osobito respiratorni sincicijski virus. U starijem dojenčeta i predškolskog djeteta izvanbolničke pneumonije uzrokovane su češće virusima (RSV, PIV 1-3, Flu, AdV), a među bakterijama je po učestalosti na prvome mjestu *Streptococcus pneumoniae*, zatim slijedi *Haemophilus influenzae*. Od pete godine života prema školskoj dobi sve se češće javljaju atipične bakterije kao uzročnici pneumonije (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae* i *Legionella pneumophila*, rjeđe *Chlamydophila psittaci* i *Coxiella burnetii*) (118) . Najčešći su uzročnici bolničkih pneumonija *Staphylococcus aureus* te gram negativne bakterije kao *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, i *Proteus spp.* No, i respiratorni virusi, posebno RSV, Flu A i AdV mogu biti uzročnici bolničkih pneumonija u djece (119).

Bakterijske pneumonije karakterizira nagli nastup simptoma. Visoka temperatura često je praćena tresavicom, a redovito se pojavljuje i kašalj s iskašljajem koji je gnojan, a nerijetko sadržava i primjese krvi. Relativno se često registriraju probadanje i boli u prsištu, a prisutni su i opći simptomi infekcije te kod nekih bolesnika i kataralni simptomi (hunjavica, promuklost, grlobolja, sinusitis). U razvijenoj bakterijskoj pneumoniji auskultacijski je nalaz karakteriziran bronhalnim disanjem, pojavom krepitacija i vlažnih hropaca, a na rendgenogramu pluća se prikazuje alveolarni tip pneumonije kao lobarna ili segmentalna, homogena i oštro ograničena sjena (120).

Atipične pneumonije, u pravilu, imaju manje buran nastup od bakterijskih. Temperatura raste postupno, može narasti i do vrlo visokih vrijednosti, ali je izuzetno rijetko praćena tresavicom. Uz povišenu temperaturu, kliničkom slikom dominiraju opći simptomi. Često je glavobolja jače istaknuta, a redovito su prisutne i boli u mišićima i zglobovima, umor, opća slabost, gubitak teka, a ponekad mučnina, povraćanje i proljev. Kašalj se obično zapaža tek nakon 3 do 5 dana, a najčešće je suh i nadražajan, bez mogućnosti iskašljavanja. U atipičnim je pneumonijama

auskultacijski nalaz često uredan, poglavito na početku bolesti. Kasnije se, obično s pojavom kašlja, mogu registrirati fine krepitacije. Na rendgenogramu se prikazuje pneumonični infiltrat intersticijskih karakteristika kao nježna, mrljasta, neoštro ograničena sjena. Atipične pneumonije imaju blaži tijek bolesti, rijetko se kompliciraju i rjeđe hospitaliziraju od bakterijskih. Prognoza je također dobra, uz prikladno antimikrobno liječenje unutar 48 sati nastupa normalizacija tjelesne temperature uz postupno povlačenje ostalih simptoma (121).

Pneumonije se pojavljuju tijekom cijele godine uz povećanu prevalenciju u zimskim mjesecima zbog lakšeg prijenosa infekta u zatvorenim prostorima. No, neki uzročnici imaju točnije određenu sezonu pojavljivanja, s time da je sezonsvo karakterističnije za respiratorne viruse i atipične uzročnike pneumonija, a manje za bakterijske (122).



Slika 4. Karakteristična sezonska raspodjela nekih uzročnika pneumonije

(preuzeto iz: Kuzman I. Pneumonije: uzročnici i dijagnostika. Medicus, 14 (1_ARI).71-82.)

1.4. LIJEČENJE, PREVENCIJA I KONTROLA AKUTNIH RESPIRATORNIH INFEKCIJA

1.4.1. Liječenje akutnih respiratornih infekcija

Osnovno liječenje ARI je simptomatsko, a uključuje mirovanje, uzimanje dosta tekućine i antipiretike te eventualno lijekove za ublažavanje kašlja i nazalne dekongestive. Antipiretik izbora je paracetamol, a nesteroidni protuupalni lijekovi, u prvom redu ibuprofen, također se uspješno rabe kao antipiretici. Djeci se ne smiju davati salicilati (acetilsalicilna kiselina, Aspirin) zbog njihove povezanosti s nastankom Reyeova sindroma (105). Pri upornom suhom (neproduktivnom) kašlju katkad se rabe antitusici (kodein, folkodin), odnosno lijekovi koji suprimiraju refleks kašlja, međutim zbog nuspojava (mučnina, pospanost, vrtoglavica) se propisuju samo izuzetno i kroz ograničeno vrijeme. Mukolitici (acetilcistein, karbocistein, bromheksidin) razrjeđenjem bronhalne sluzi mogu potaknuti iskašljavanje pa se daju kod produktivnog kašlja. Njihova primjena skraćuje trajanje i jakost kašlja, a nemaju važnijih nuspojava (123). Dekongestivi (pseudoefedrin, nafazolin) koji se najčešće rabe kao kapi za nos, smanjuju otok nosne sluznice i sekreciju te poboljšavaju prohodnost nosa. Međutim, brzo se pojavljuju neželjeni popratni učinci, odnosno suhoća sluznice i navikavanje, a mogu i povisiti krvni tlak, te ih treba rabiti samo nekoliko dana (124). U djece se za prohodnost nosa uglavnom preporučuje samo češće ispiranje fiziološkom otopinom ili otopinom morske vode. Time se smanjuje otok sluznice i postiže vlaženje, što skraćuje tijek bolesti. Učinkovitost vitamina C, preparata cinka i biljnih pripravaka u liječenju i sprečavanju virusnih respiratornih infekcija još nije konačno evaluirana (105).

U hipoksičnih bolesnika s teškim infekcijama donjih dišnih putova potrebno je primijeniti kisik radi postizanja i održavanja saturacije PO₂ arterijske krvi na nivou 92% i više, dok razvoj akutne respiratorne insuficijencije zahtijeva endotrahealnu intubaciju i mehaničku ventilaciju (125).

Što se tiče kauzalnog liječenja, mali je broj antivirusnih lijekova odobren za primjenu u ARI, ali u tijeku su opsežna istraživanja (126).

Od antivirusnih lijekova protiv HRV-a testirana je intranazalna primjena **pirodavira**. Česta primjena lijeka (šest puta na dan) smanjuje rizik pojave bolesti u pojedinaca izloženih virusu za 85%, a također je povezana i sa smanjenjem simptoma, osobito od trećeg do petog dana trajanja bolesti. Međutim, osim što je česta primjena lijeka nepraktična, povezana je i s učestalijom pojavom suhoće u nosu, krvi u sluzavom iscjetku iz nosa i neugodnog okusa u ustima, te zbog toga primjena pirodavira nema značajnu kliničku korist (127). Korist inhalacijske primjene **interferona beta (INF-β)** u egzacerbaciji astme povezane s rinovirusom zahtijeva daljnju evaluaciju (128).

Nijedan antivirusni lijek još nije odobren za liječenje adenovirusnih infekcija. U tijeku je ispitivanje **cidofovira (CDV)**, analoga citozina koji inhibira DNA polimerazu i ima veliku *in vitro* aktivnost protiv adenovirusa. Dostupan je samo za intravensku primjenu, a zbog potencijalne nefrotoksičnosti i mijelosupresije primjenjuje se samo u vrlo teških, obično imunosuprimiranih pacijenata (129). **Brincidofovir (CMX001)** je oralno aktivan lipofilni oblik cidofovira koji također pokazuje *in vitro* aktivnost protiv adenovirusa, a manje je nefrotoksičan od cidofovira (130).

Za liječenje teških infekcija donjih dišnih putova u dojenčadi i male djece uzrokovanih RSV-om odobren je **ribavirin**. Ribavirin je analog gvanozina, a aplicira se s pomoću raspršivača kao aerosol sitnih čestica u šator s kisikom 18 do 20 sati na dan tijekom 3 do 5 dana (131).

Nijedan antivirusni lijek nije odobren za liječenje infekcija virusima parainfluence, međutim kod imunokompromitiranih pacijenata s PIV-3 infekcijom primjenjuje se **ribavirin** koji ima *in vitro* i *in vivo* antivirusno djelovanje, ali njegova klinička korisnost nije definitivno potvrđena kliničkim studijama (132). Noviji antivirusni lijek je **DAS181** koji enzimatski razlaže sijaličnu kiselinu na površini respiratornog epitela koja je bitna za ulazak virusa u stanicu. DAS181 ima *in vitro* i *in vivo* djelovanje protiv virusa parainfluence, ali i virusa influence, humanog metapneumovirusa i humanog enterovirusa 68. Faza 3 kliničkih pokusa je u tijeku (133).

Za liječenje gripe upotrebljavaju se inhibitori neuraminidaze koji djeluju na viruse influence A i B. **Oseltamivir** se primjenjuje peroralno i odobren je za liječenje u djece starije od dva tjedna, te za profilaksu u djece starije od godinu dana (134). **Zanamivir** se primjenjuje inhalacijom i odobren je za liječenje u djece starije od 7 godina, te za profilaksu u djece starije od 5 godina (135). **Peramivir** se primjenjuje intravenski i odobren je u SAD-u za liječenje djece iznad dvije godine u kojih bolest traje kraće od dva dana (136). **Baloxavir marboxil** je inhibitor endonukleaze koji se primjenjuje peroralno u jednoj dozi. Odobren je 2018. godine u SAD-u i Japanu za liječenje nekomplicirane gripe u inače zdrave djece starije od 12 godina (137). **Amantadin** i **rimantadin** su lijekovi koji inhibiraju ulazak u stanicu i djelotvorni su samo protiv virusa influence A. Zbog visoke toksičnosti i razvoja rezistencije, primjena ovih lijekova je danas indicirana vrlo rijetko, u profilaksi influence A u djece starije od godinu dana (138).

Za liječenje koronavirusnih infekcija još nije odobren nijedan antivirusni lijek. Iako je dokazan antivirusni učinak antimalarika **klorokina** nedostaju kliničke studije učinkovitosti i sigurnosti primjene u ljudi (139, 140). Maria L. Agostini i sur. su u ožujku 2018. godine izvijestili o *in vitro* djelotvornosti analoga nukleozida **remdesivira**. U pripremi je faza 1 kliničkog ispitivanja (141).

Do danas je zabilježen samo jedan slučaj primjene antivirusnog lijeka u pacijenta s infekcijom humanim bokavirusom. U imunodeficijentnog pacijenta s koinfekcijom HBoV i HHV-6 (humani herpesvirus 6) primjenom **cidofovira** došlo je do uspješne eliminacije HBoV infekcije (142).

Za liječenje metapneumovirusnih infekcija nema odobrenih antivirusnih lijekova. **Ribavirin** pokazuje aktivnost protiv HMPV-a *in vitro* i u animalnom modelu, ali nedostaju kliničke studije. Također, u literaturi je prikazan slučaj izlječenja metapneumovirusne pneumonije u imunodeficijentne djevojčice kombiniranom primjenom oralnog ribavirina i intravenskog imunoglobulina (143).

Od antivirusnih lijekova koji mogu djelovati na enteroviruse, najviše se ispituju oni koji se vežu na virusnu kapsidu kao što je **pleconaril**, te inhibitori proteaza kao **rupintrivir** (144).

1.4.2. Prevencija i kontrola akutnih respiratornih infekcija

Zbog intenzivne i stalne izloženosti uzročnicima te lakog prijenosa virusa velikim kapljicama sekreta iz dišnog sustava, bliskim dodirima s kontaminiranim predmetima i zaraženim rukama pri rukovanju, mogućnosti opće prevencije ARI vrlo su skromne. Svode se na izbjegavanje bliskog kontakta s bolesnim osobama, često pranje ruku te izbjegavanje dodira potencijalno kontaminiranih ruku s nosom, ustima i očima (17).

Specifična prevencija aktivnom imunizacijom dostupna je za određene serotipove adenovirusa i virusa influence, dok za sve ostale respiratorne viruse, unatoč intenzivnim istraživanjima, još nema odobrenih cjepiva (145).

Živo cjepivo u kapsuli za peroralnu primjenu za tipove 4 i 7 adenovirusa proizvedeno je 1971. godine i rabilo se za cijepljenje novaka u SAD-u više od 25 godina. Premda je cjepivo bilo djelotvorno, 1999. godine se prestalo proizvoditi. Od listopada 2011. ponovno je u upotrebi živa peroralna vakcina za tipove 4 i 7 novog proizvođača, također za potrebe američke vojske (146).

Cjepiva protiv influence sadržavaju antigene hemaglutinina i neuraminidaze za najčešće tipove virusa influence: tip A (H1N1), tip A (H3N2) i jedan, odnosno dva tipa B. Postoje dvije vrste cjepiva protiv gripe:

1. Trovalentno/četverovalentno inaktivirano cjepivo

Inaktivirano cjepivo priređuje se umnožavanjem virusa u oplodjenim kokošjim jajima. Umnožene virusne čestice u alantoisnoj tekućini inaktiviraju se formaldehidom. Cjepivo može biti fragmentirano (virion razbijen u dijelove) ili podjedinčno (uniformirani dijelovi kapside s H i N antigenima) koje je niže reaktogenosti. Na antigene cjepnih virusa stvaraju se specifična IgG-protutijela koja pružaju jednogodišnju zaštitu (147). Inaktivirano cjepivo daje se intramuskularno, jedna doza od 0.5 mL prije sezone. Djeca mlađa od 9 godina koja se cijepu prvi put trebaju dobiti dvije doze od 0.5 mL u razmaku od 4 tjedna. Općenito, cjepivo se ne daje djeci mlađoj od 6 mjeseci, osobama alergičnima na supstancije jajeta te osobama s

nekom febrilnom bolesti. Najviše 5% osoba dobije povišenu temperaturu i blage sistavne znakove 8 do 24 sata nakon cijepljenja, a trećina ima crvenilo ili bol na mjestu uboda (148).

Svi proizvođači cjepiva slijede uputu Svjetske zdravstvene organizacije o serotipskom sastavu cjepiva za iduću sezonu. Trovalentno cjepivo za sezonu 2018./2019. u Hrvatskoj u skladu s preporukama Svjetske zdravstvene organizacije i EU sadrži dva podtipa virusa influence A i jedan tip virusa influence B. Djelatne tvari cjepiva su površinski antigeni virusa influence sljedećih sojeva:

- A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 - sličan soj
- A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2) - sličan soj
- B/Colorado/06/2017 - sličan soj (B/Victoria linija) (149)

Posljednjih godina uočava se da značajan broj oboljelih otpada na viruse influence tipa B. Stoga su 2012. godine odobrena, a u sezoni 2013./2014. postala dostupna četverovalentna cjepiva koja sadržavaju po dva tipa A i 2 tipa B (150). Četverovalentno cjepivo dostupno je i u Hrvatskoj - VaxigripTetra® za sezonu 2018./2019. osim sojeva kao u trovalentnom cjepivu sadrži i B/Phuket/3073/2013 - sličan soj (B/Yamagata linija) (151).

Djeca kojoj se preporuča cijepljenje protiv gripe su:

- djeca s kroničnim oboljenjima, posebice oboljenjima srca i pluća, a posebno s oštećenom plućnom funkcijom (cistična fibroza, kronična astma, bronhopulmonalna displazija) i kongenitalnim manama
- djeca s kroničnim bolestima metabolizma (uključujući dijabetes mellitus), kroničnim bolestima bubrega, hemoglobinopatijama i oštećenjem imunog sustava (uključujući HIV infekciju)
- djeca i adolescenti (6 mj. do 18. god.) na dugotrajnoj terapiji lijekovima koji sadrže acetilsalicilnu kiselinu (radi izbjegavanja nastanka Reyeve sindroma uz influencu) (149)

2. Živo atenuirano cjepivo

U cjepivu je živi, oslabljeni virus, uzgojen na oplođenu kokošjem jajetu. Daje se kao intranazalni sprej. Cjepivo je proizvedeno rekombinacijom sojeva virusa influence tipa A i B koji su u optjecaju s matičnim sojem na hladnoću adaptiranog i atenuiranog virusa. Upotrebljava se za cijepljenje zdrave djece i odraslih u dobi od 5 do 49 godina (152).

Oba cjepiva su visoko zaštitna. Prema serotipovima H1N1 zaštitnost prelazi 90%, dok je za H3N2 zaštitnost inaktiviranog cjepiva 75 - 80%, a atenuiranog 65 - 70%. Korisno je procjepljivanje svake godine, jer postoji križna imunost između raznih serotipova. Serotipovi u cjepivima vrlo često ne odgovaraju točnom serotipu koji je vodeći uzročnik epidemije u

određenoj sezoni, ali kumulativna i križna imunost serotipova iz prošlih cjepiva i cjepiva aktualne sezone daju na kraju izvrsnu zaštitu (153).

Specifična prevencija pasivnom imunizacijom provodi se u dojenčadi s visokim rizikom teške RSV infekcije donjih dišnih putova (gestacijska dob manja od 32 tjedna, postojanje kronične plućne bolesti ili težih prirođenih srčanih bolesti). Za to se donedavno primjenjivao intravenski pripravak specifičnog anti-RSV imunoglobulina, a danas je sredstvo izbora humanizirano monoklonsko antitijelo protiv RSV, **palivizumab**, koje se primjenjuje u dozi od 15 mg/kg tjelesne mase intramuskularno, jedanput na mjesec u periodu od studenog do svibnja (154).

2. HIPOTEZA

U uzorcima pacijenata sa simptomima akutne respiratorne infekcije, a u kojih je na temelju kliničke slike i laboratorijskih nalaza suspektna virusna etiologija infekcije, dokazat ćemo prisutnost jednog ili više respiratornih virusa.

3. CILJEVI RADA

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi prisutnost, učestalost, sezonstvo i kliničko-demografske karakteristike za petnaest virusa testiranih multiplex PCR metodom među djecom s ARI hospitaliziranom u Klinici za dječje bolesti Zagreb tijekom jednogodišnjeg razdoblja (2017./2018.), a s ciljem prikazivanja potrebe za uvođenjem metoda molekularne dijagnostike u rutinsku praksu.

Metode molekularne dijagnostike kao visoko specifične i osjetljive imaju prednost pred ostalim metodama, a pravovremenom, specifičnom i osjetljivom virološkom dijagnostikom:

- utječemo na odluku o liječenju
- utječemo na smanjenje administracije antibiotika (neadekvatna upotreba antibiotika poskupljuje liječenje i doprinosi razvoju rezistencije)
- etiološki pristup liječenju akutnih respiratornih infekcija smanjuje duljinu hospitalizacije i mogućnost izbijanja epidemije bolničke infekcije
- utječemo na smanjenje broja drugih dijagnostičkih pretraga i testova zbog nedostatka dijagnoze
- pratimo epidemiološke karakteristike akutnih respiratornih infekcija u djece u Hrvatskoj
- značajke akutnih respiratornih infekcija možemo uspoređivati sa zemljama srednjoeuropske regije, ali i svijeta
- detektiranjem sezone virusa utječemo na uvođenje specifične prevencije (npr. monoklonsko antitijelo protiv RSV-a)

4. ISPITANICI I METODE

4.1. ISPITANICI

Prospektivno istraživanje provedeno je na ukupno 239 djece hospitalizirane u Klinici za dječje bolesti Zagreb u razdoblju od 5. mjeseca 2017. godine do 4. mjeseca 2018. godine. U istraživanje su uključeni pacijenti koji su se prezentirali simptomima ARI sa sumnjom na virusnu etiologiju infekcije (normalni ili blago povišeni upalni parametri, npr. broj leukocita, CRP). Rendgenogram pluća je rađen prema potrebi, a uključeni su pacijenti kod kojih nalaz nije upućivao na bakterijsku pneumoniju.

Pacijenti su razvrstani prema spolu, zatim u četiri skupine prema dobi (≤ 1 , 1-3, 3-5, ≥ 5 godina), i u četiri skupine prema lokalizaciji infekcije (**IGDP** - infekcije gornjih dišnih putova, **IDDP** - infekcije donjih dišnih putova, **IGDP i IDDP**, **IGDP s osipom**). U skupinu **IGDP** su uključeni klinički sindromi - akutni nazofaringitis, febrilni respiratorni katar, (tonzilo)faringitis i laringitis. U skupinu **IDDP** su uključeni klinički sindromi - bronhiolitis, bronhitis i pneumonija. U skupinu **IGDP i IDDP** svrstani su pacijenti s dijagnozama bolesti i gornjeg i donjeg dišnog sustava. U skupinu **IGDP s osipom** svrstani su pacijenti s dijagnozom bolesti gornjeg dišnog sustava i pojavom osipa.

Za svakog ispitanika priložen je potpisani informirani pristanak roditelja ili skrbnika za sudjelovanje u istraživanju. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Nastavnog zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“.

Za usporedbu među skupinama korišten je Hi-kvadrat test, a statistička analiza rezultata je izvršena u programu IBM SPSS® Statistics. $P < 0.05$ je smatran značajnim.

4.2. UZORCI

Djeci sa sumnjom na akutnu virusnu infekciju dišnog sustava (u prvih 5 dana trajanja bolesti) uzeti su obrisak nazofarinksa (tanji bris) kao i obrisak ždrijela (deblji bris) pomoću visoko adsorbentnih pahuljastih obrisaka - tzv. *flocked swabs*. Nakon uzimanja obrisaka, oba brisa stavljena su u istu transportnu podlogu (UTM™, Copan, Italy). Uzorci su označeni (ime i prezime djeteta, dob, datum uzimanja) i do transporta čuvani na +4 °C, najdulje do 48 sati. Zajedno s informiranim pristankom roditelja ili skrbnika za pristanak sudjelovanja u istraživanju, uzorci su dostavljeni u prijamnu ambulantu za zaprimanje mikrobioloških uzoraka Nastavnog zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ i do testiranja u Laboratoriju za molekularnu mikrobiologiju pohranjeni na -80 °C.

4.3. METODE

Seeplex® RV15 One Step ACE Detection (V1.1) je multiplex PCR protokol kojim se u jedinstvenoj PCR reakciji korištenjem adekvatnog broja specifičnih početnica istovremeno umnažaju ciljne sekvence 15 respiratornih virusa.

Taj multiplex PCR protokol se temelji na DPO™ (Dual Priming Oligonucleotide) tehnologiji koja blokira elongaciju ne-specifično vezanih početnica osiguravajući visoku specifičnost PCR reakcije. DPO™ se sastoji od tri područja: duljeg 5'-segmenta, kraćeg 3'-segmenta i polideoksinozin poveznika koji premošćuje 5' i 3'-segmente. Na određenoj temperaturi prijanjanja poveznik poprima „strukturu poput mjehurića“ i odvaja jednu početnicu u dvije funkcionalne regije. Dulji 5' segment se veže za DNA koja služi kao kalup i osigurava stabilno prijanjanje, dok se kraći 3' segment specifično veže na ciljno mjesto i osigurava ciljno-specifičnu elongaciju.

Protokol za detekciju virusa se sastoji od tri dijela:

1. Izolacija nukleinskih kiselina iz kliničkih uzoraka

Izolacija virusne DNA i RNA iz obriska nazofarinksa i ždrijela izvodi se prema protokolu s pomoću QIAamp® MinElute® Virus Spin Kita, proizvođača Qiagen u preamplifikacijskom dijelu Laboratorija za molekularnu mikrobiologiju.

2. Amplifikacija ciljnog odsječka nukleinske kiseline pomoću One-step RT-PCR procesa

Amplifikacija se izvodi pomoću Seeplex® RV15 One Step ACE Detection kita, proizvođača Seegene, u preamplifikacijskom (priprema reakcijske mješavine) i postamplifikacijskom (amplifikacija) dijelu Laboratorija za molekularnu mikrobiologiju.

Kit je dovoljan za 50 reakcija i sastoji se od dva tipa reagensa pohranjenih u zasebne kutije.

Jedna kutija sadrži početnice i čuva se na **+ 4°C**. To su slijedeći reagensi:

1. 1 bočica od 500 µL reagensa **5X RV15 A OPM** (one step primer mix) – mješavina početnica za 5 patogena iz seta A + početnice i uzorak za PCR kontrolu
2. 1 bočica od 500 µL reagensa **5X RV15 B OPM** (one step primer mix) – mješavina početnica za 5 patogena iz seta B + početnice i uzorak za PCR kontrolu
3. 1 bočica od 500 µL reagensa **5X RV15 C OPM** (one step primer mix) – mješavina početnica za 5 patogena iz seta C+ početnice za kontrolu cijelog procesa

Set A - AdV, HCoV 229E/NL63, PIV-1, PIV-2, PIV-3

Set B - HCoV-OC43, HRV A/B/C, RSV A, RSV B, Flu A

Set C - HBoV 1/2/3/4, Flu B, HMPV, PIV-4, HEV

Flu A: početnice detektiraju sve podtipove virusa influence A, uključujući H5N1 podtip (virus ptičje gripe) i A(H1N1)pdm09 (pandemijski podtip iz 2009. godine)

AdV: početnice su dizajnirane za detekciju većine tipova adenovirusa iz grupa B, C i E, te nekih tipova iz grupa A i D

Druga kutija sadrži enzime i pufere i druge reagense koji se čuvaju na **-20°C**.

To su slijedeći reagensi:

1. 3 bočice od 100 µL OneStep RT-PCR enzima
2. 3 bočice od 500 µL 5X OneStep RT-PCR pufera (dNTPs i boja)
3. 1 bočicu od 375 µL random heksamera
4. 3 bočice od 500 µL 8-MOP otopine
5. 3 bočice od 500 µL PCR vode
6. 1 bočica od 150 µL pozitivne kontrole

Seeplex® RV15 One Step ACE Detection (V1.1) uključuje dvije interne kontrole: PCR kontrolu i kontrolu cijelog procesa. Setovi A i B sadrže PCR kontrolu koja služi detekciji tvari prisutnih u uzorku, a koje mogu interferirati s PCR amplifikacijom i dovesti do pojave lažno negativnih rezultata. Pozitivna PCR kontrola sadrži uzorak DNA odnosno RNA 15 patogena, dok je kao negativna kontrola korištena destilirana voda slobodna od RNAza. Set C sadrži humanu RNAzu P kao kontrolu cijelog procesa od izolacije nukleinskih kiselina do RT-PCR.

Prvi je korak priprema 3 mastermixa za A, B i C reakciju u odnosu na broj reakcija u epruvetama na ledu koje se omotaju folijom (broj reakcija = broj uzoraka + pozitivna kontrola + negativna kontrola + jedna reakcija u suvišku). Priprema mastermixa za jednu reakciju:

- 8 µL voda slobodna od RNAza
 - 7,5 µL 8-MOP otopina
 - 2,5 µL random heksamer
 - 10 µL 5X RV15 OPM
 - 10 µL 5X OneStep RT-PCR pufer
 - 2 µL OneStep RT-PCR enzim
- 40 µL ukupan volumen mastermixa

Zatim se pipetira 40 µL mastermixa A, B i C u 0,2 mL PCR tubice, sve na ledu. Doda se po 10 µL uzorka (izolirane nukleinske kiseline) u A, B i C mastermix, te 10 µL pozitivne i 10 µL negativne (voda) kontrole.

PCR tubice s priređenom reakcijskom mješavinom se potom polažu u termocycler aparat GeneAmp® 9700 PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA). Termocycler aparat izvodi zadani PCR protokol. Reverzna transkripcija i umnožavanje DNA odvijaju se u jednoj tubici, odnosno u jednom koraku reakcije (One Step Detection).

Tablica 7. Seeplex® RV15 One Step ACE Detection (V1.1) - PCR protokol

Reakcija	Broj ciklusa	Temperatura	Trajanje
INICIJALIZACIJA	1	94	15 min
UMNAŽANJE	45		
Denaturacija		94	0.5 min
Prianjanje		60	1.5 min
Elongacija		72	1 min
TERMINACIJA	1	72	10 min

3. Detekcija PCR produkta pomoću MultiNa System tehnologije

PCR produkti su detektirani elektroforezom na mikročipu u MCE®-202 MultiNA uređaju (Shimadzu, Kyoto, Japan) koji je opremljen LED-ekscitiranim fluorescentnim detektorom (valna duljina ekscitacije 470 nm), a rezultati su prikazani na zaslonu kompjutera u programu MultiNA viewer u obliku elektroferograma i virtualnog gela.

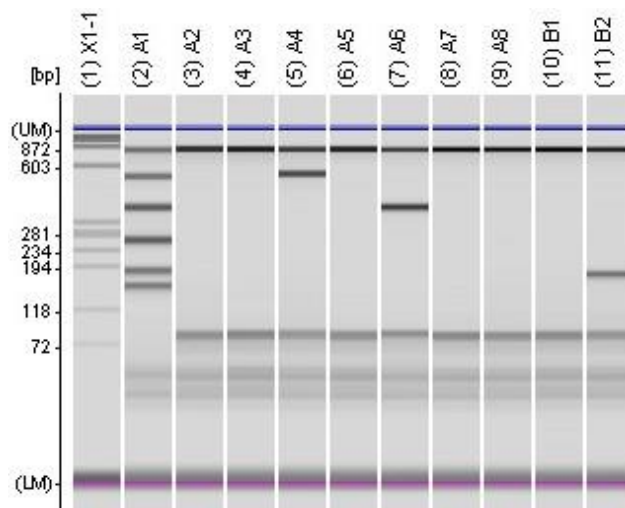
DNA-1000 Reagent Kit (Shimadzu) sadržava separacijski pufer. Fluorescentna boja SYBR® Gold (Invitrogen) se razrijedi sa TE puferom u kiveti obloženoj folijom u omjeru 1:99 tj. dilucijski faktor 100. Razrijeđena otopina boje i separacijski pufer se pomiješaju u bočici za radnu otopinu separacijskog pufera u omjeru 99:1, a prema broju analiza (broj analiza = broj uzoraka + kontrole x 3) i bočicu se postavi na njeno mjesto u aparat (boja mora odgovarati označenoj boji reagensa tj. za DNA-1000 zelena boja).

Zatim se pripremi otopina markera za procjenu veličine DNA fragmenata (eng. *ladder*). U mikrotubici se razrijedi ØX174 DNA/HaeIII ladder (Promega) s TE puferom u omjeru 1:99.

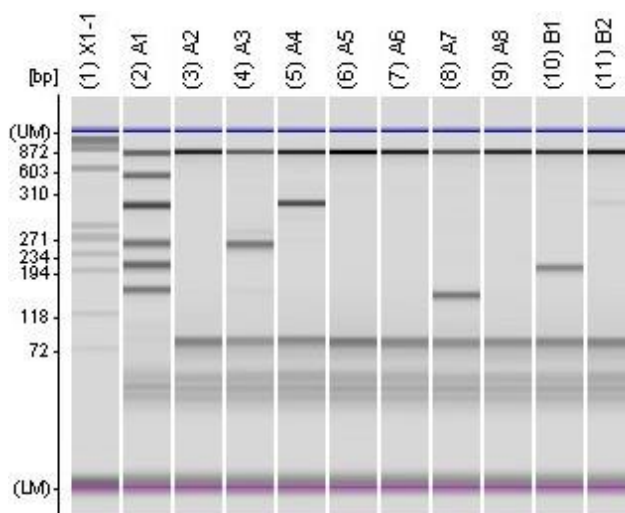
Prenese se 12 µL razrijeđenog markera u tubicu za MultiNA analizu (za svaki set A, B i C treba novi marker) i postavi ga se na poziciju u odvojeni red za uzorke (extra sample stand) u uređaj. Odpipetira se 3 µL PCR produkta + 9 µL TE pufera u pločicu za uzorke koja mora biti pokrivena aluminijskim pokrovom. Uzorci se postavu u predviđeno mjesto za uzroke te se upale MultiNA uređaj kao i kompjuter.

Tablica 8. Seeplex® RV15 One Step ACE Detection (V1.1) - informacije o amplikonima

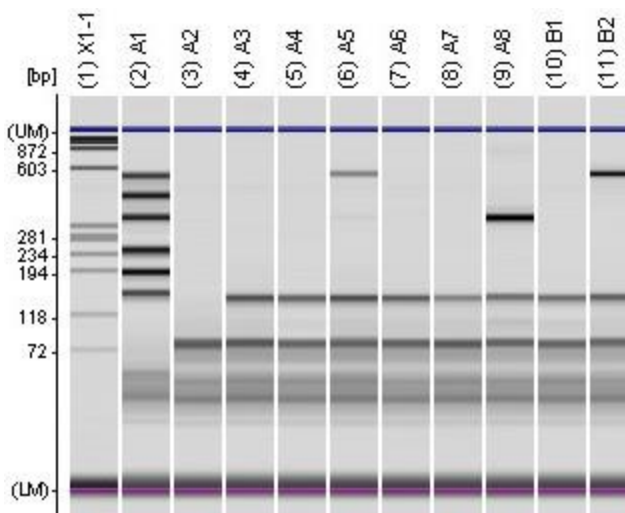
Seeplex® RV15 One Step ACE Detection (V1.1) A set	Veličina DNA fragmenta (bp)
PCR kontrola	850
Adenovirus	534
Humani koronavirus 229E/NL63	375
Virus parainfluenze tip 2	264
Virus parainfluenze tip 3	189
Virus parainfluenze tip 1	153
Seeplex® RV15 One Step ACE Detection (V1.1) B set	Veličina DNA fragmenta (bp)
PCR kontrola	850
Humani koronavirus OC43	578
Humani rinovirus A/B/C	394
Respiratorni sincicijski virus A	269
Virus influenza A	206
Respiratorni sincicijski virus B	155
Seeplex® RV15 One Step ACE Detection (V1.1) C set	Veličina DNA fragmenta (bp)
Humani bokavirus 1/2/3/4	579
Virus influenza B	456
Humani metapneumovirus	351
Virus parainfluenze tip 4	254
Humani enterovirus	194
Kontrola cijelog procesa	153



Slika 5. Virtualni gel. **Set A:** 1 - marker, 2 - pozitivna kontrola, 3 - negativna kontrola, 5 - AdV, 7 - HCoV-OC43, 11 - PIV-3 ; ostali negativni



Slika 6. Virtualni gel. **Set B:** 1 - marker, 2 - pozitivna kontrola, 3 - negativna kontrola, 4 - RSV A, 5 i 11 - HRV, 8 - RSV B, 10 - Flu A; ostali negativni



Slika 7. Virtualni gel. **Set C:** 1 - marker, 2 - pozitivna kontrola, 3 - negativna kontrola, 6 i 11 - HBoV, 9 - HMPV; ostali negativni

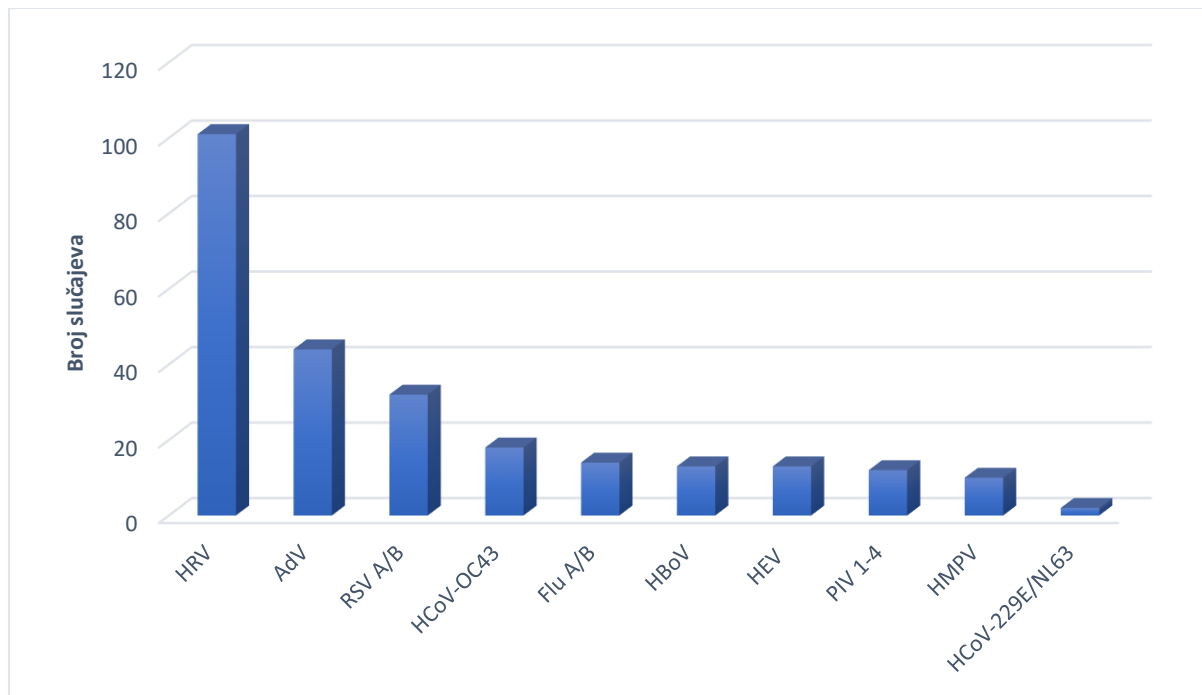
5. REZULTATI

Tijekom istraživanog perioda ukupno je testirano 239 djece, od čega 149 dječaka (62.3%) i 90 djevojčica (37.7%) s omjerom dječaka i djevojčica 1.6:1. Pacijenti su bili u dobi od jednog tjedna do 16 godina i 8 mjeseci s prosječnom dobi 3 godine i 6 mjeseci.

Jedan ili više respiratornih virusa dokazano je u uzorku 75.3% pacijenata (180/239).

Najčešće detektiran virus u uzorcima ispitanika bio je HRV (56.1%) (101/180), a slijede ga AdV (24.4%) (44/180) te RSV A/B (17.7%) (RSV A 4.4%, RSV B 13.3%) (32/180) i HCoV-OC43 (10%) (18/180).

Po učestalosti zatim slijede Flu A/B (7.7%) (Flu A 2.7%, Flu B 5%) (14/180), zatim HBoV i HEV s jednakom učestalošću (7.2%) (13/180), PIV 1-4 (6.6%) (12/180), HMPV (5.5%) (10/180) i na kraju HCoV 229/NL63 (1.1%) (2/180).



Slika 8. Raspodjela dokazanih slučajeva virusne etiologije prema uzročnicima

Virusni uzročnici respiratornih infekcija prema spolu ispitanika

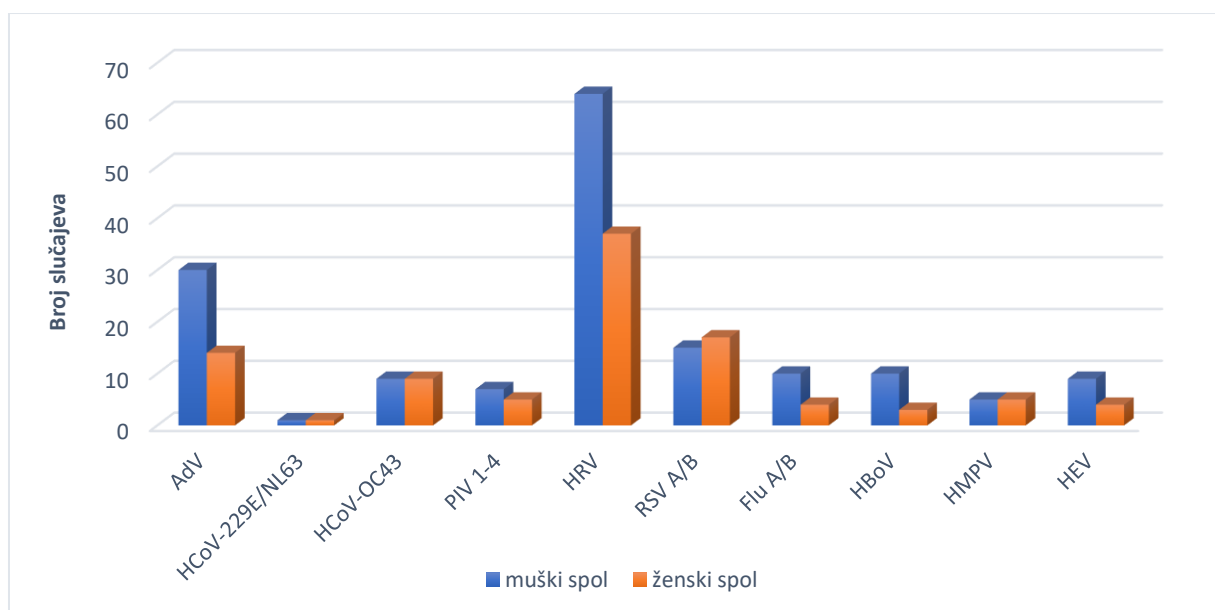
Među pacijentima s dokazanom virusnom etiologijom bilo je 111 dječaka (61,6%) i 69 djevojčica (38,3%) s omjerom dječaka i djevojčica 1.6:1. Distribucija pacijenata po spolu u skupini ispitanika s dokazanim virusnim uzročnicima ne razlikuje se statistički značajno od distribucije po spolu u ukupnom broju ispitanika ($P = 0.8876$).

Niti jedan virus nije dokazan u uzorcima samo jednog spola.

U dječaka je najčešće detektiran HRV (57,6%) (64/111), zatim AdV (27%) (30/111), RSV A/B (13,5%) (15/111) i HBoV (9%) (10/111).

U djevojčica je najčešće detektiran HRV (53,6%) (37/69), zatim RSV A/B (24,6%) (17/69), AdV (20,2%) (14/69), i HCoV-OC43 (13%) (9/69).

Učestalost triju najčešće detektiranih virusa s obzirom na spol se statistički značajno ne razlikuje ($P = 0.5185$).

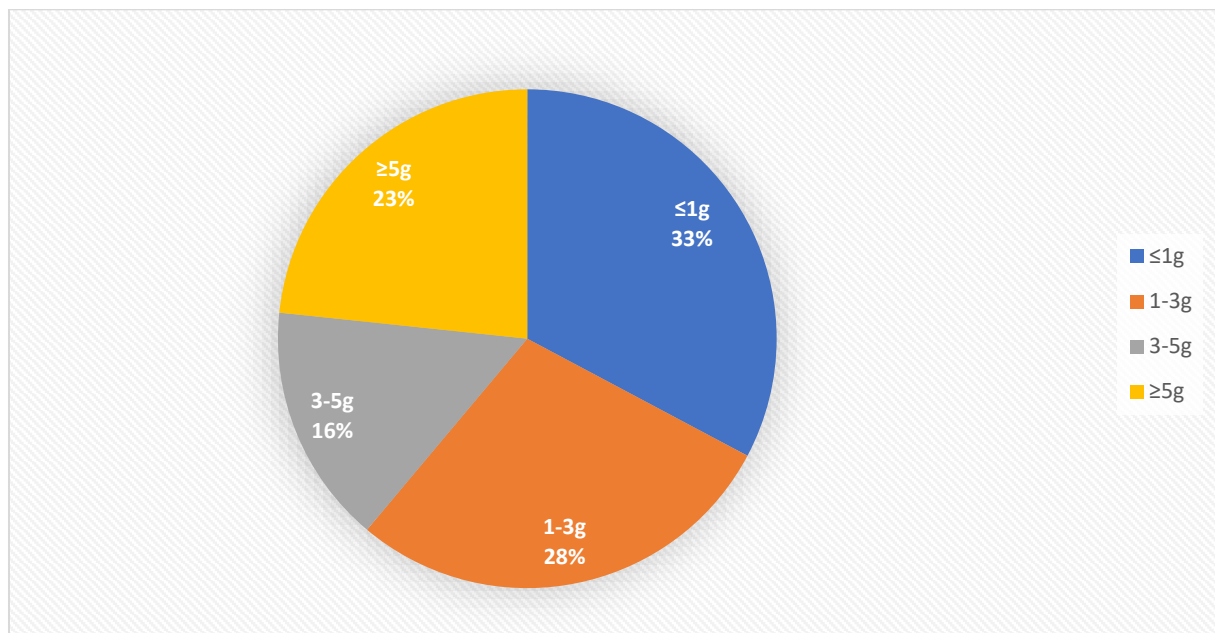


Slika 9. Raspodjela detektiranih respiratornih virusa prema spolu ispitanika

Virusni uzročnici respiratornih infekcija prema dobi ispitanika

Od 180 bolesnika u kojih je dokazan neki od respiratornih virusa, 59 ih je bilo u dobi do jedne godine (32.8%), 51 bolesnik u dobi od jedne do tri godine (28.3%), 28 u dobi od tri do pet godina (15.6%) te 42 u dobi iznad 5 godina (23.3%).

Dakle, virusne infekcije su češće dokazane u mlađim dobnim skupinama do tri godine (61.1%), u odnosu na starije dobne skupine iznad tri godine (38.9%).



Slika 10. Raspodjela bolesnika u kojih je detektiran jedan ili više respiratornih virusa prema dobi

Nije utvrđena statistički značajna razlika u dobi pacijenata s dokazanom virusnom etiologijom ARI i dobi ukupnog broja ispitanika ($P = 0.9347$).

Najčešće detektiran virus u dobi do jedne godine bio je HRV (50.8%) (30/59), zatim RSV A/B (25.4%) (15/59) i AdV (22%) (13/59).

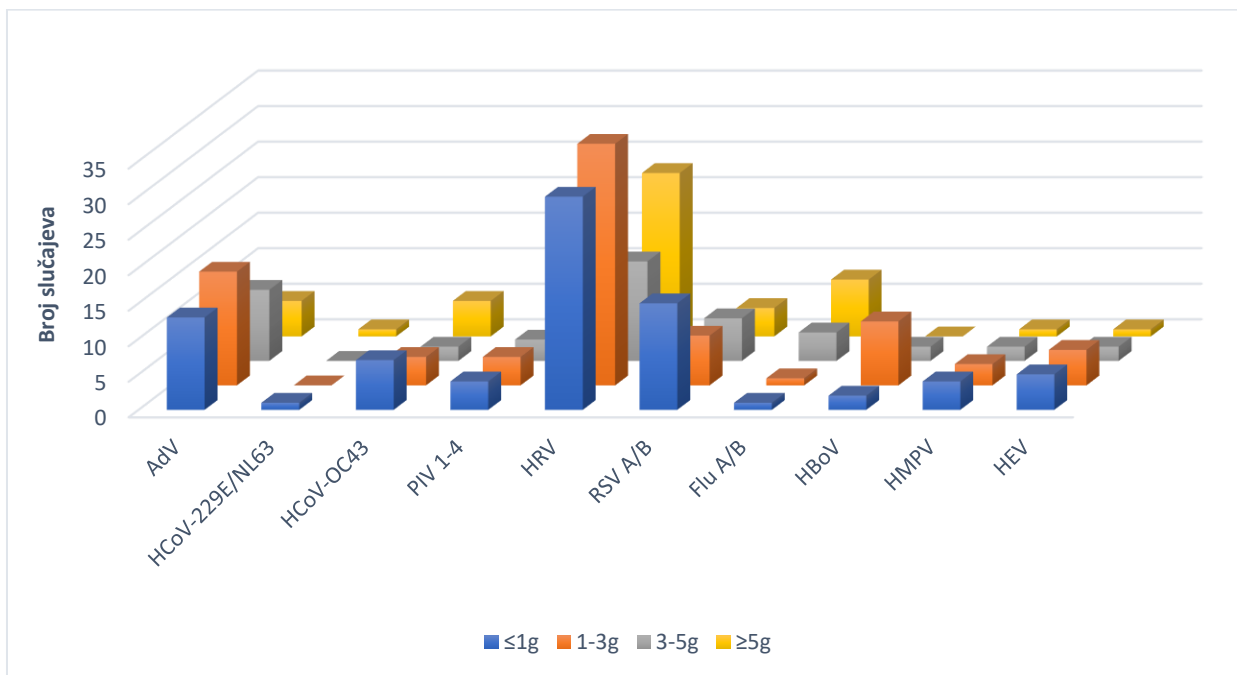
U skupini bolesnika od jedne do tri godine najčešće detektiran virus bio je HRV (66.7%) (34/51), zatim AdV (31.3%) (16/51) te HBoV (17.6%) (9/51).

U skupini bolesnika od tri do pet godina najčešće detektiran virus bio je HRV (50%) (14/28), zatim AdV (35.7%) (10/28) i RSV A/B (21.4%) (6/28).

U skupini bolesnika starijih od 5 godina najčešće detektiran virus bio je HRV (54.7%) (23/42), zatim Flu A/B (19.0%) (8/42) te AdV i HCoV-OC43 (11.9%) (5/42).

U djece stare do jedne godine nije detektiran Flu B, a u djece stare od 1-3 godine nisu detektirani HCoV 229E/NL63 i Flu A. HCoV 229E/NL63 nije detektiran u dobi od 3-5 godina, a u dobi iznad 5 godina HBoV.

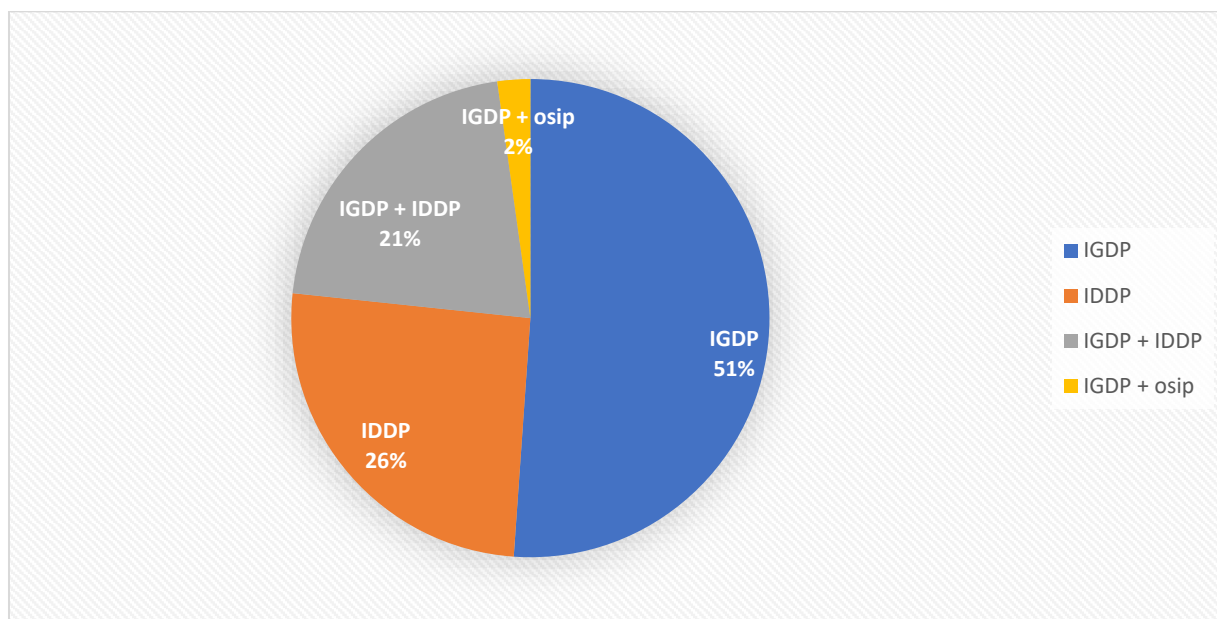
Flu A/B statistički je značajno češće detektiran u starijim dobnim skupinama iznad 3 godine ($P < 0.001$), nego u mlađim dobnim skupinama.



Slika 11. Učestalost detekcije respiratornih virusa prema dobi ispitanika

Virusni uzročnici respiratornih infekcija prema lokalizaciji infekcije

Od 180 bolesnika u kojih je dokazan neki od respiratornih virusa, 92 pacijenta imala su infekciju gornjih dišnih putova (51.1%), 46 pacijenata imalo je infekciju donjih dišnih putova (25.6%), 38 pacijenata imalo je infekciju i gornjih i donjih dišnih putova (21.1%), a 4 pacijenta su imala infekciju gornjih dišnih putova s pojavom osipa (2.2%).

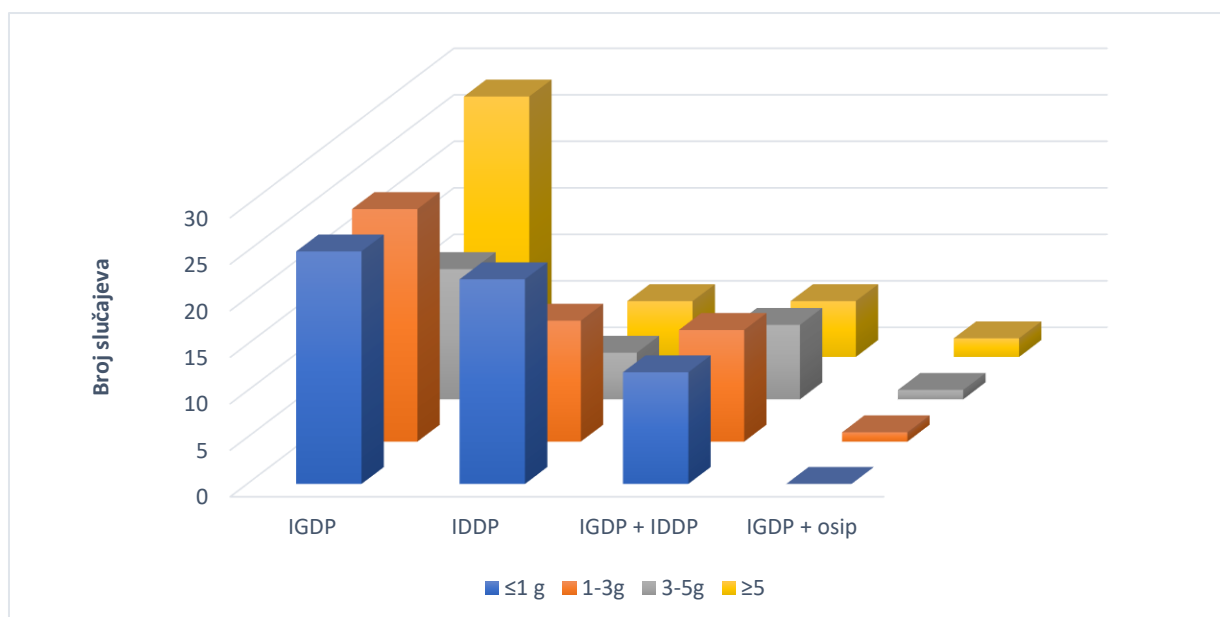


Slika 12. Raspodjela bolesnika s ARI virusne etiologije prema lokalizaciji infekcije (IGDP - infekcija gornjih dišnih putova, IDDP - infekcija donjih dišnih putova)

Dijagnoza infekcije gornjih dišnih putova u pacijenata s potvrđenom virusnom etiologijom najčešće je postavljena u dobnoj skupini iznad pet godina (30.4%) (28/92), kao i dijagnoza infekcije gornjih dišnih putova s pojavom osipa (50%) (2/4).

Dijagnoza infekcije donjih dišnih putova najčešće je postavljena u najmlađih pacijenta, tj. u dobnoj skupini do jedne godine (47.8%) (22/46).

Dijagnoza istovremene infekcije gornjih i donjih dišnih putova s jednakom je učestalošću postavljena u pacijenata do jedne godine te od jedne do tri godine (31.6%) (12/38).



Slika 13. Lokalizacija infekcija dišnog sustava s obzirom na dob bolesnika s dokazanom virusnom etiologijom (IGDP - infekcija gornjih dišnih putova, IDDP - infekcija donjih dišnih putova)

U djece oba spola s dokazanim virusnim uzročnikom najčešće je postavljena dijagnoza IGDP, zatim IDDP te IGDP + IDDP i na kraju IGDP + osip.

Pritom nije utvrđena statistički značajna razlika između muškog i ženskog spola u pojavnosti IGDP ($P = 0.8983$), IDDP ($P = 0.7122$), IGDP + IDDP ($P = 0.6335$) te IGDP + osip ($P = 0.5869$).



Slika 14. Lokalizacija infekcija dišnog sustava s obzirom na spol bolesnika s dokazanom virusnom etiologijom (IGDP - infekcija gornjih dišnih putova, IDDP - infekcija donjih dišnih putova)

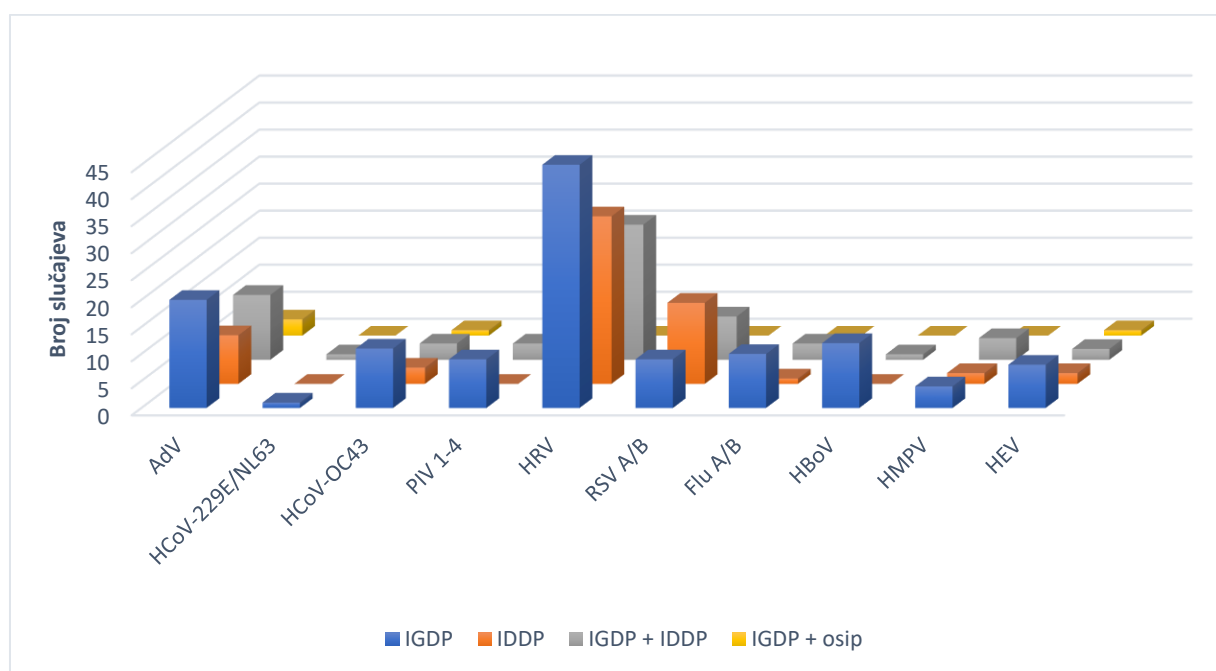
Svi ispitivani virusi detektirani su u barem jednog pacijenta s IGDP i IGDP + IDDP.

U skupini pacijenata s IGDP najčešće detektiran virus je HRV (48.9%) (45/92), zatim AdV (21.7%) (20/92) te HBoV (13%) (12/92).

U skupini pacijenata s IGDP + IDDP najčešće detektiran virus je HRV (65.7%) (25/38), zatim AdV (31.5%) (12/38) i RSV A/B (21%) (8/38).

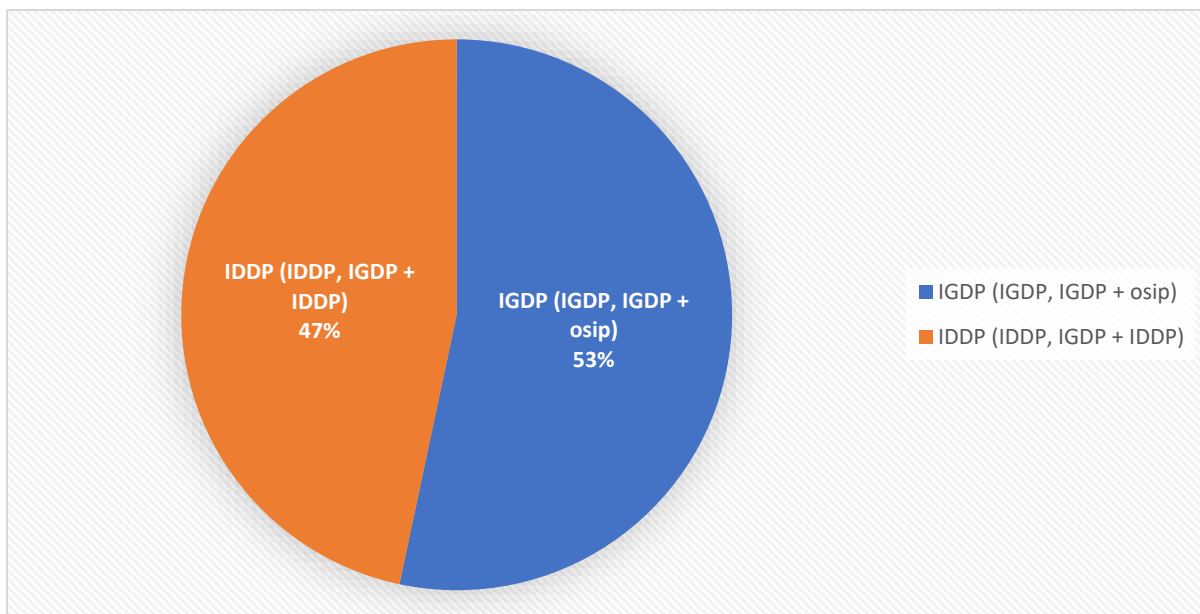
U skupini pacijenata s IDDP najčešće detektiran virus je HRV (67.4%) (31/46), zatim RSV A/B (32.6%) (15/46) te AdV (19.5%) (9/46), a nisu detektirani virusi HCoV-229E/NL63, PIV 1-4, Flu A i HBoV.

U skupini pacijenata s IGDP + osip najčešće je detektiran AdV (75%) (3/4), a osim njega detektirani su još i HCoV-OC43 i HEV (25%) (1/4).



Slika 15. Učestalost detekcije pojedinih virusa s obzirom na lokalizaciju infekcije dišnog sustava (IGDP - infekcija gornjih dišnih putova, IDDP - infekcija donjih dišnih putova)

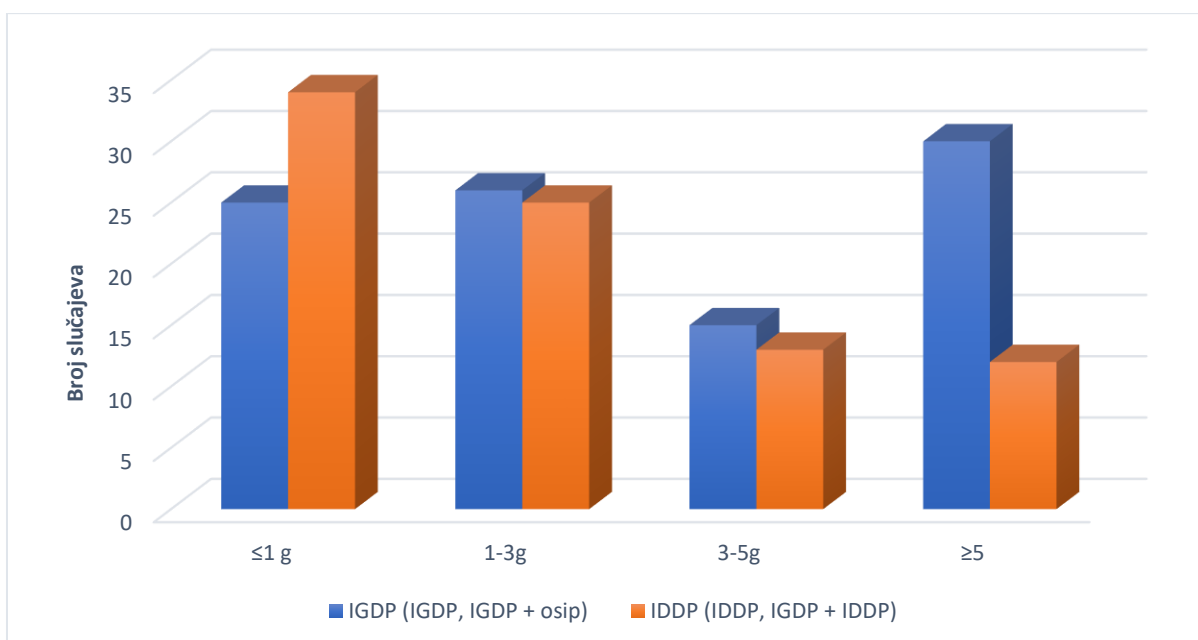
S obzirom na kliničku interpretaciju lokalizacije infekcije u dišnom sustavu, skupine IGDP i IGDP + osip svrstane su u infekcije isključivo gornjih dišnih putova, a skupine IDDP i IGDP + IDDP u infekcije koje zahvaćaju donje dišne putove. Od 180 bolesnika u kojih je dokazan neki od respiratornih virusa, 96 ih imalo isključivo IGDP (53.3%), a 84 IDDP (46.7%).



Slika 16. Raspodjela bolesnika s ARI virusne etiologije prema lokalizaciji infekcije (IGDP - infekcija gornjih dišnih putova, IDDP - infekcija donjih dišnih putova)

Razlika u pojavnosti IGDP, odnosno IDDP u dječaka i djevojčica nije bila statistički značajna ($P = 0.9704$).

Infekcije koje zahvaćaju samo gornje dišne putove najčešće su u dobnoj skupini iznad pet godina (31.2%) (30/96), a u toj su dobnoj skupini infekcije koje zahvaćaju donje dišne putove najmanje učestale (14.3%) (12/84). Infekcije koje zahvaćaju donje dišne putove najučestalije su u dobnoj skupini do jedne godine (40.5%) (34/84).

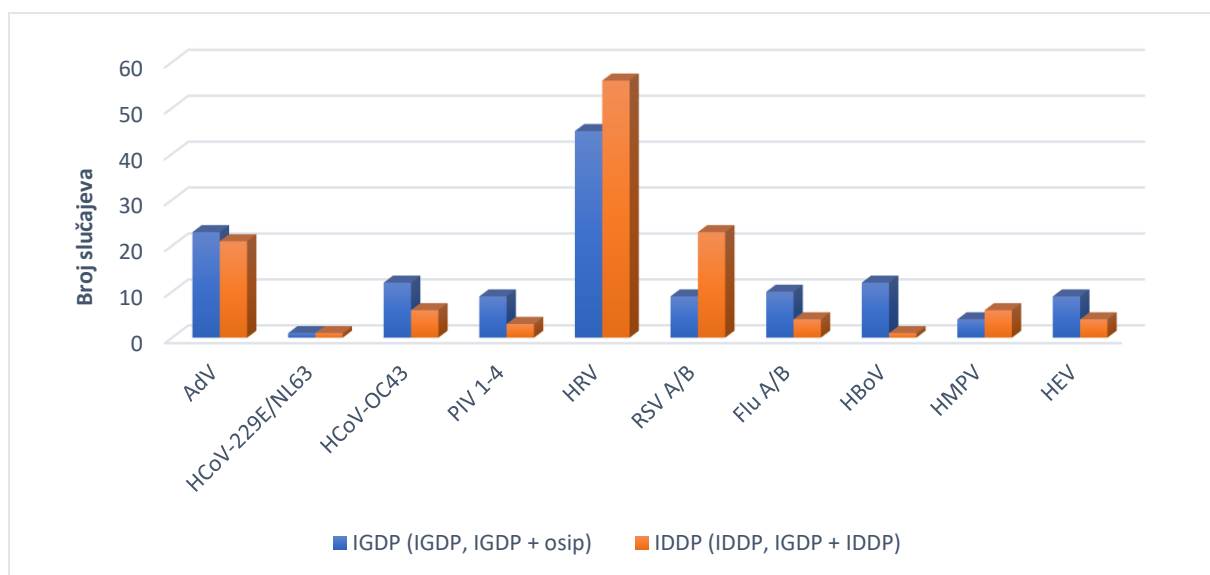


Slika 17. Lokalizacija infekcija dišnog sustava s obzirom na dob bolesnika s dokazanom virusnom etiologijom (IGDP - infekcija gornjih dišnih putova, IDDP - infekcija donjih dišnih putova)

Najčešće detektiran virus u infekcijama samo gornjih dišnih putova bio je HRV (46.8%) (45/96), zatim AdV (23.9%) (23/96) te HboV i HCoV-OC43 (12.5%) (12/96).

Najčešće detektiran virus u infekcijama koje su zahvaćale donje dišne putove bio je HRV (66.7%) (56/84), zatim RSV A/B (27.3%) (23/84) i AdV (25%) (21/84).

RSV A/B je statistički značajno češće detektiran u infekcijama donjih dišnih putova, nego u infekcijama samo gornjih dišnih putova ($P = 0.0085$), a HBoV statistički značajno češće u infekcijama samo gornjih dišnih putova, nego u onim koje zahvaćaju i donje dišne putove ($P = 0.0062$).



Slika 18. Učestalost detekcije pojedinih virusa s obzirom na lokalizaciju infekcije dišnog sustava (IGDP - infekcija gornjih dišnih putova, IDDP - infekcija donjih dišnih putova)

Koinfekcija/kodetekcija respiratornim virusima

Jedan virus detektiran je u 67.2% bolesnika s pozitivnim multiplex PCR testom na respiratorne viruse (121/180), odnosno 73 dječaka i 48 djevojčica.

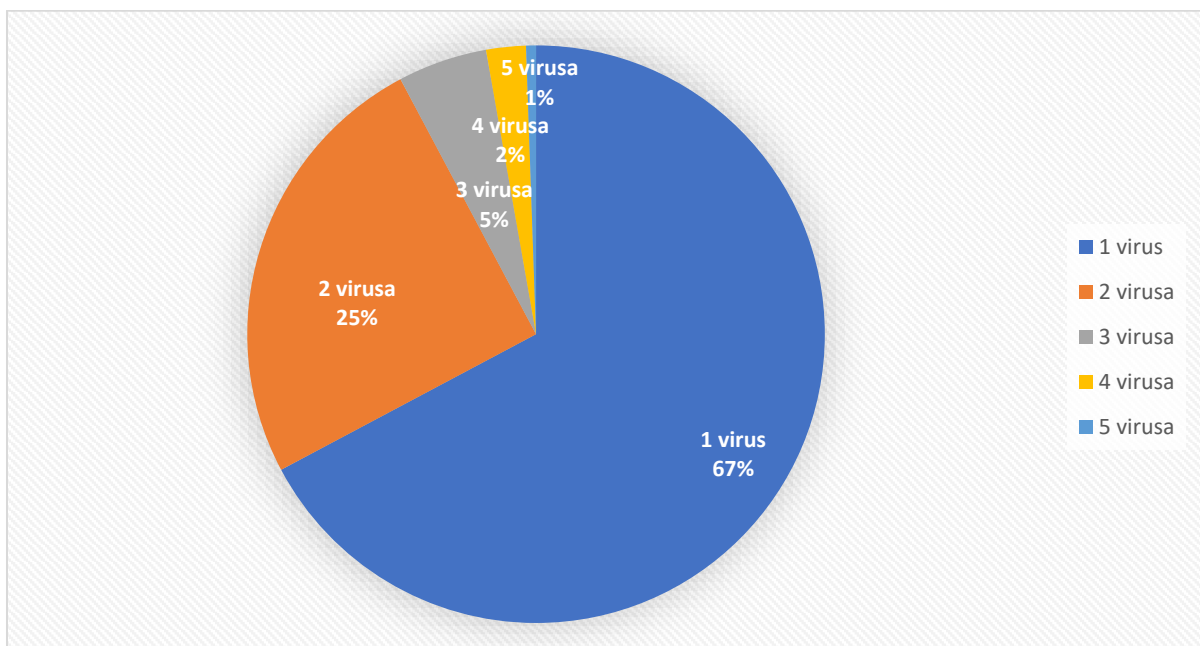
Prema tome, stopa koinfekcije/kodetekcije iznosila je 32.8%.

Koinfekcija/kodetekcija dvama virusima nađena je u 25% pacijenata (45/180), odnosno 30 dječaka i 15 djevojčica.

Koinfekcija/kodetekcija trima virusima nađena je u 5% pacijenata (9/180), 5 dječaka i 4 djevojčice.

Koinfekcija/kodetekcija s četiri virusa nađena je u 2.2 % pacijenata (4/180), 3 dječaka i jedne djevojčice.

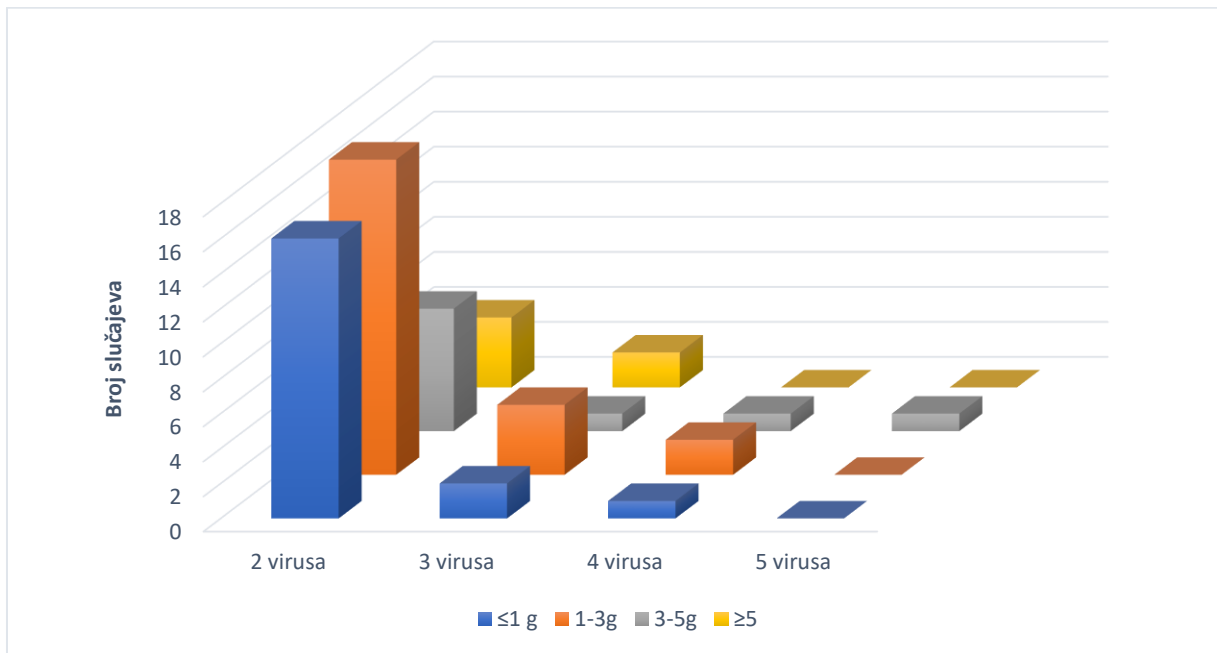
U jedne pacijentice nađena je koinfekcija/kodetekcija s pet virusa.



Slika 19. Raspodjela dokazanih slučajeva virusne etiologije prema broju detektiranih respiratornih virusa

Nije nađena statistički značajna razlika između infekcije jednim virusom i ukupne koinfekcije/kodetekcije u odnosu na dob ($P = 0.1091$) i spol ispitanika ($P = 0.7061$) te na lokalizaciju infekcije ($P = 0.6008$).

Koinfekcije s 2, 3, odnosno 4 virusa najčešće su u skupini ispitanika od 1-3 godine, a slučaj koinfekcije s 5 virusa bio je u dobnoj skupini od 3-5 godina.

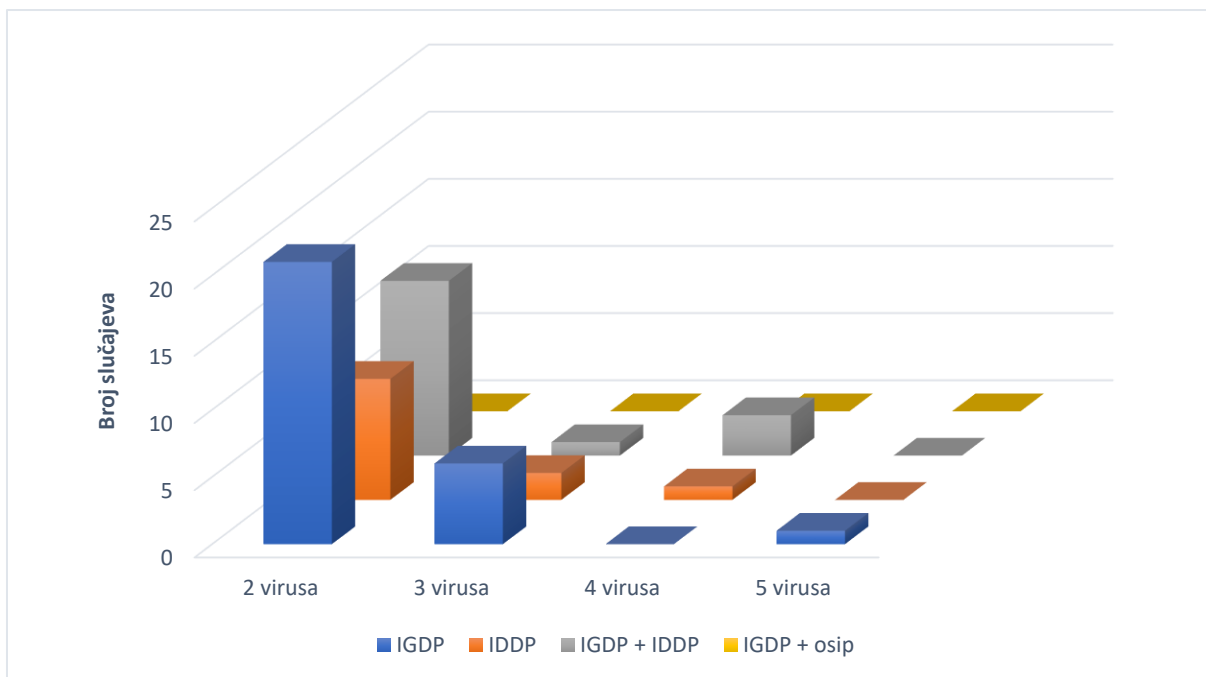


Slika 20. Raspodjela dokazanih slučajeva koinfekcije/kodetekcije respiratornim virusima prema dobi ispitanika

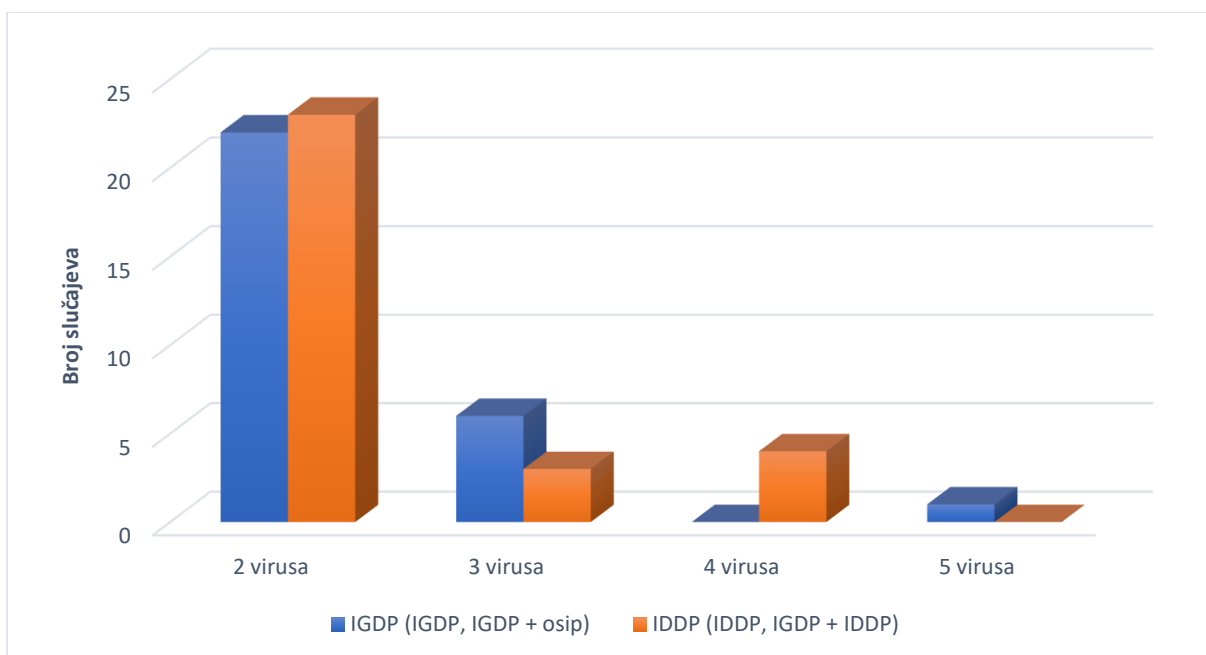
Koinfekcija/kodetekcija s 2, 3, odnosno 5 virusa najčešće je nađena u pacijenata s dijagnozom IGDP, a koinfekcija/kodetekcija s 4 virusa u pacijenata s dijagnozom IGDP + IDDP.

U koinfekciji/kodetekciji s 2 virusa podjednako su učestale infekcije u donjem kao i u samo gornjem dijelu dišnog sustava, a u koinfekciji/kodetekciji s 3 virusa češće su infekcije samo gornjih dišnih putova.

U svim slučajevima koinfekcije/kodetekcije s 4 virusa radilo se zahvaćanju donjih dišnih putova, a u slučaju koinfekcije/kodetekcije s 5 virusa o infekciji gornjih dišnih putova.



Slika 21. Učestalost koinfekcije/kodetekcije s obzirom na broj uzročnika i lokalizaciju infekcije (IGDP - infekcija gornjih dišnih putova, IDDP - infekcija donjih dišnih putova)



Slika 22. Učestalost koinfekcije/kodetekcije s obzirom na broj uzročnika i lokalizaciju infekcije (IGDP - infekcija gornjih dišnih putova, IDDP - infekcija donjih dišnih putova)

U 59 pacijenata s koinfekcijom/kodetekcijom najčešće detektiran virus je HRV (64.4%) (38/59), zatim AdV (59.3%) (35/59), RSV A/B (28.8%) (17/59) i HCoV-OC43 (20.3%) (12/59).

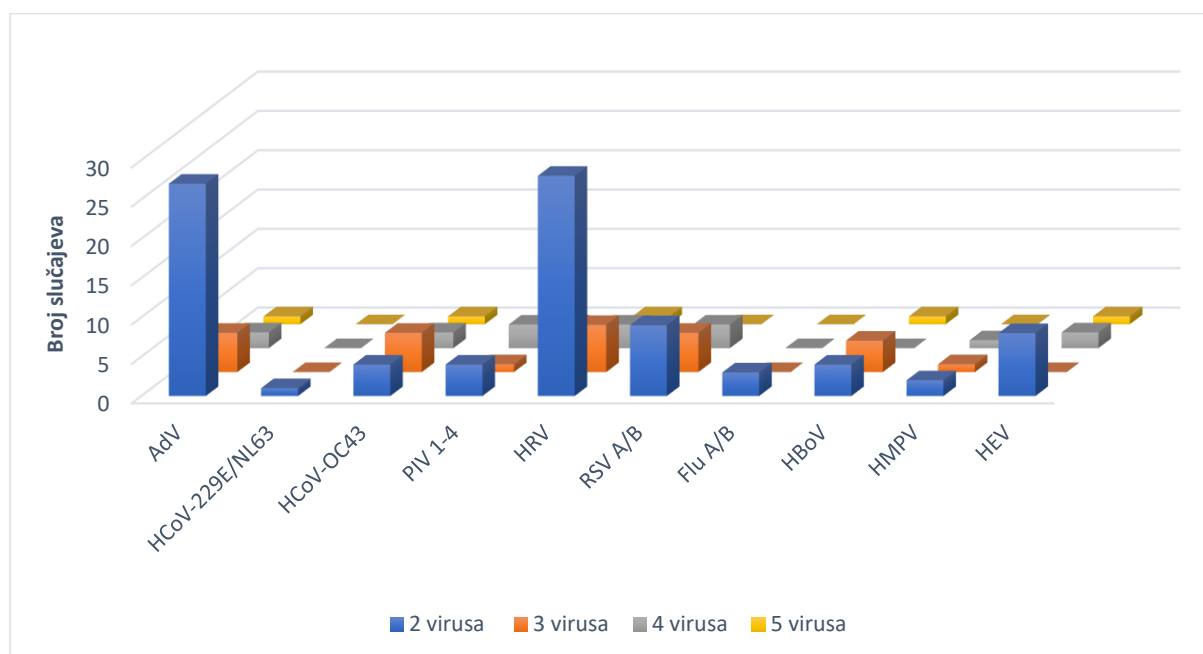
U slučajevima koinfekcije/kodetekcije s dva virusa detektirani su barem jednom svi ispitivani virusi.

Najčešće je detektiran virus HRV (62.2%) (28/45), zatim AdV (60%) (27/45) i RSV A/B (20%) (9/45).

U slučajevima koinfekcije/kodetekcije s tri virusa najčešće detektiran virus je HRV (66.7%) (6/9) te AdV i HCoV-OC43 (55.5%) (5/9).

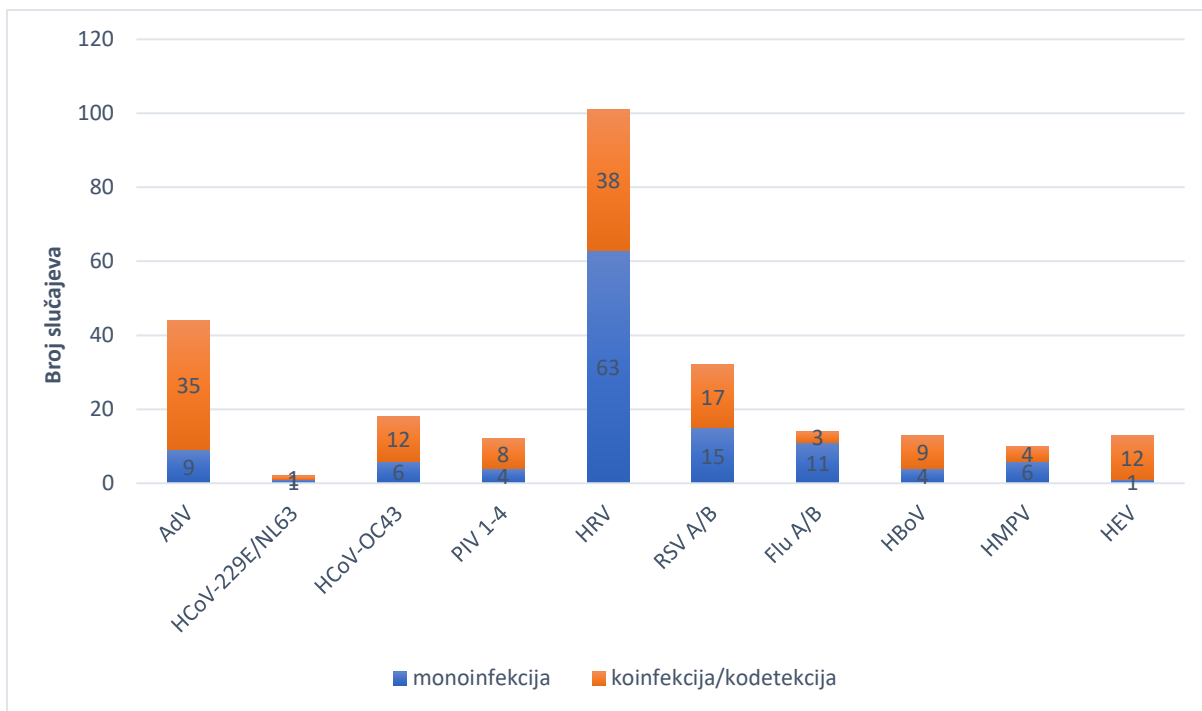
U slučajevima koinfekcije/kodetekcije s četiri virusa najčešće su detektirani HRV i PIV 1-4 (75%) (3/4).

U jednom slučaju koinfekcije/kodetekcije s pet virusa detektirani su AdV, HCoV-OC43, HRV, HBoV i HEV.



Slika 23. Raspodjela detektiranih respiratornih virusa prema sudjelovanju u koinfekciji/kodetekciji

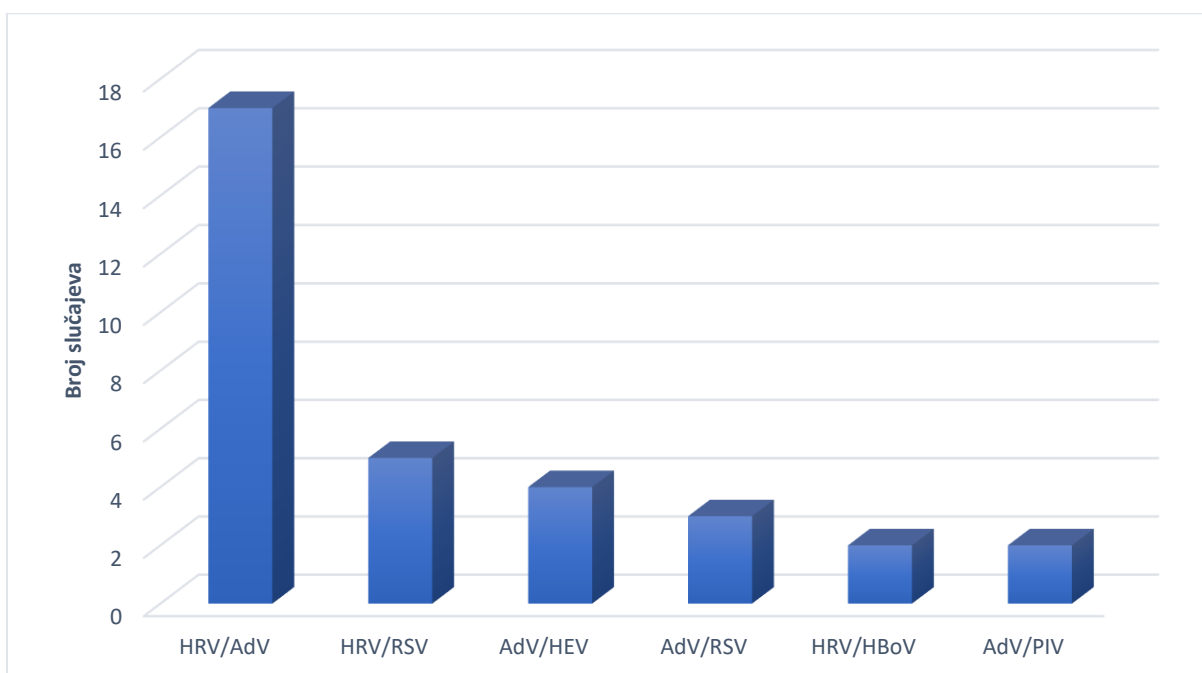
S obzirom na detekciju pojedinog virusa kao jedinog uzročnika ili zajedno s jednim ili više virusa prisutnih u uzorku, u koinfekciji/kodetekciji su statistički značajno češće nađeni AdV ($P < 0.001$), HCoV-OC43 ($P = 0.0042$), PIV 1-4 ($P = 0.0170$), RSV A/B ($P = 0.0269$), HBoV ($P = 0.0078$) i HEV ($P < 0.001$).



Slika 24. Detekcija virusnih uzročnika u monoinfekciji, odnosno koinfekciji/kodetekciji

U slučajevima koinfekcije/kodetekcije s dva virusa najčešće detektirana kombinacija virusa bila je HRV/AdV (37.7%) (17/45), zatim HRV/RSV (11.1%) (5/45), AdV/HEV (8.8%) (4/45) i AdV/RSV (6.7%) (3/45).

U slučaju koinfekcije/kodetekcije s tri virusa, jednom se ponovila kombinacija HRV/HCoV-OC43/HBoV.



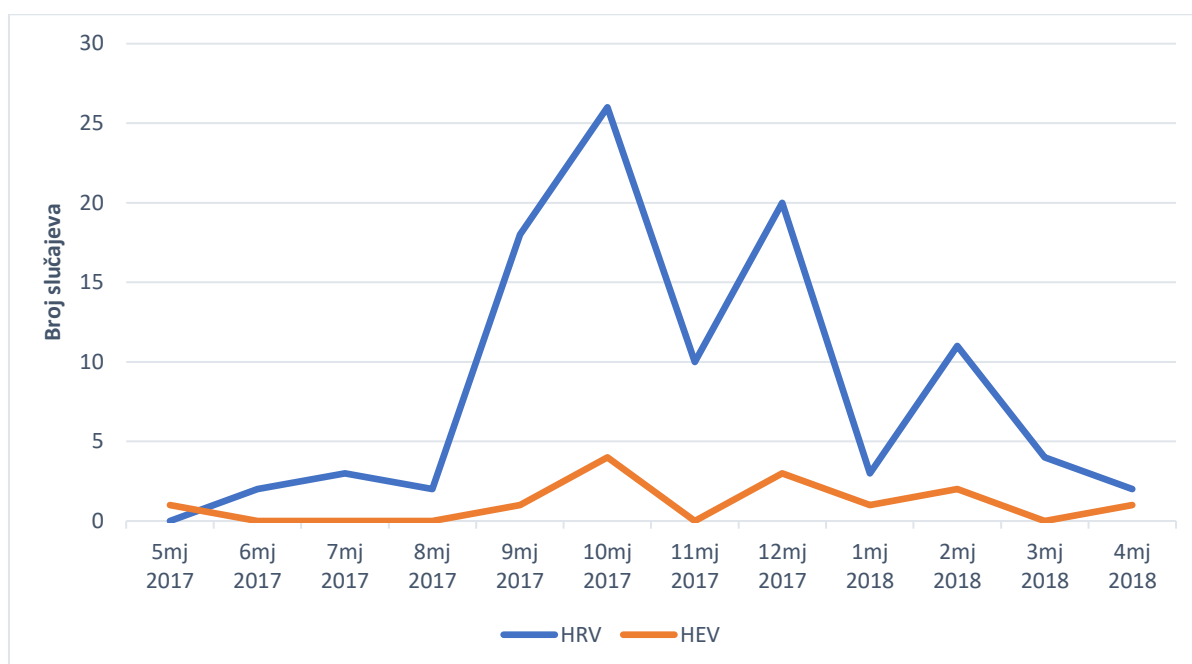
Slika 25. Najčešće detektirane kombinacije respiratornih virusa u koinfekciji/kodetekciji dvama virusima

Sezonska pojavnost respiratornih virusa

Istraživanje je provedeno u razdoblju od 5. mjeseca 2017. godine do 4. mjeseca 2018. godine.

HRV je najčešće detektiran od 9. - 12. mjeseca 2017. te u 2. mjesecu 2018., s pojavom sporadičnih slučajeva kroz cijelo ispitivano razdoblje.

HEV se najčešće pojavljuju u jesenskim i zimskim mjesecima s maksimumom detekcije u 10. mjesecu 2017., a nisu detektirani kroz tri ljetna mjeseca.

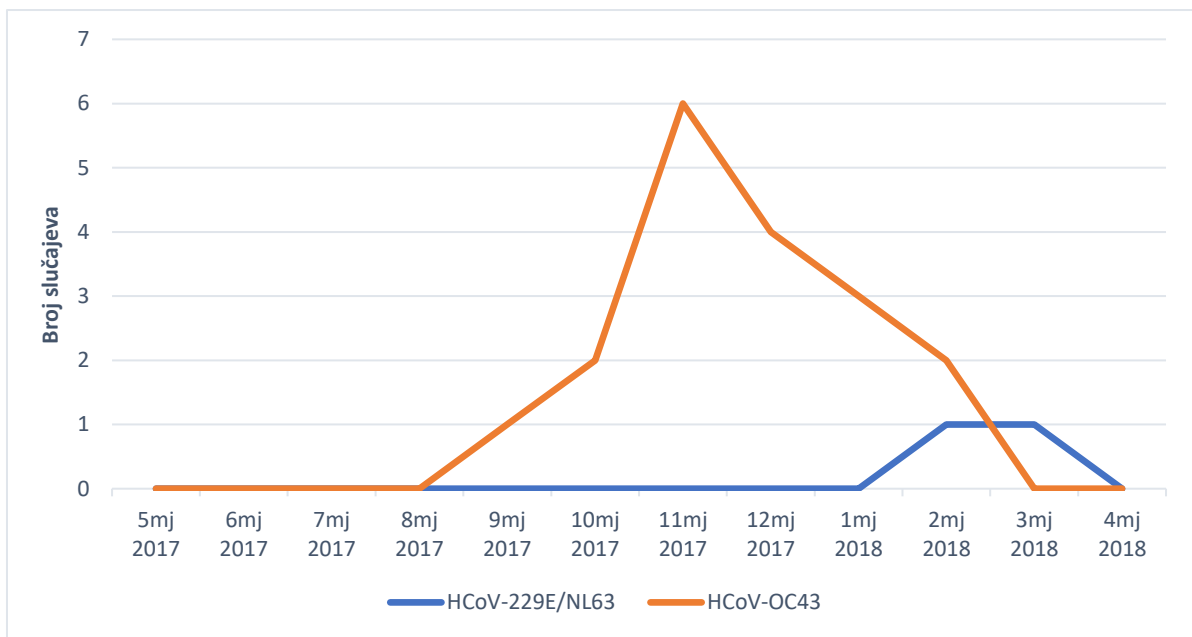


Slika 26. Raspodjela humanog rinovirusa i humanih enterovirusa po mjesecima

HCoV-OC43 pojavljuje se u jesenskim i zimskim mjesecima, od 9 mjeseca 2017. do 2. mjeseca 2018. s maksimumom detekcije u 11. mjesecu 2017.

Po jedan slučaj HCoV-229E/NL63 detektiran je u drugom, odnosno trećem mjesecu 2018.

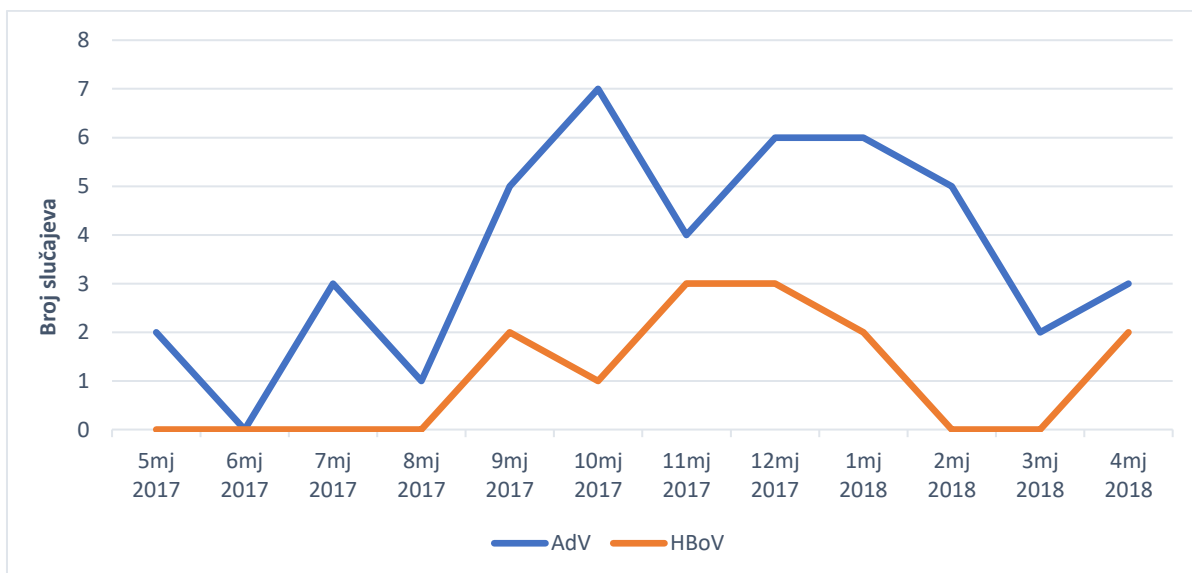
PIV 1-4 pojavljuju se sporadično skroz sva godišnja doba, s detekcijom najvećeg broja slučajeva u drugom mjesecu 2018.



Slika 27. Raspodjela humanih koronavirusa OC43 i 229/NL63 po mjesecima

AdV se pojavljuju kroz cijelo ispitivano razdoblje s najvećom učestalošću u jesenskim i zimskim mjesecima i maksimumom detekcije u 10. mjesecu 2017.

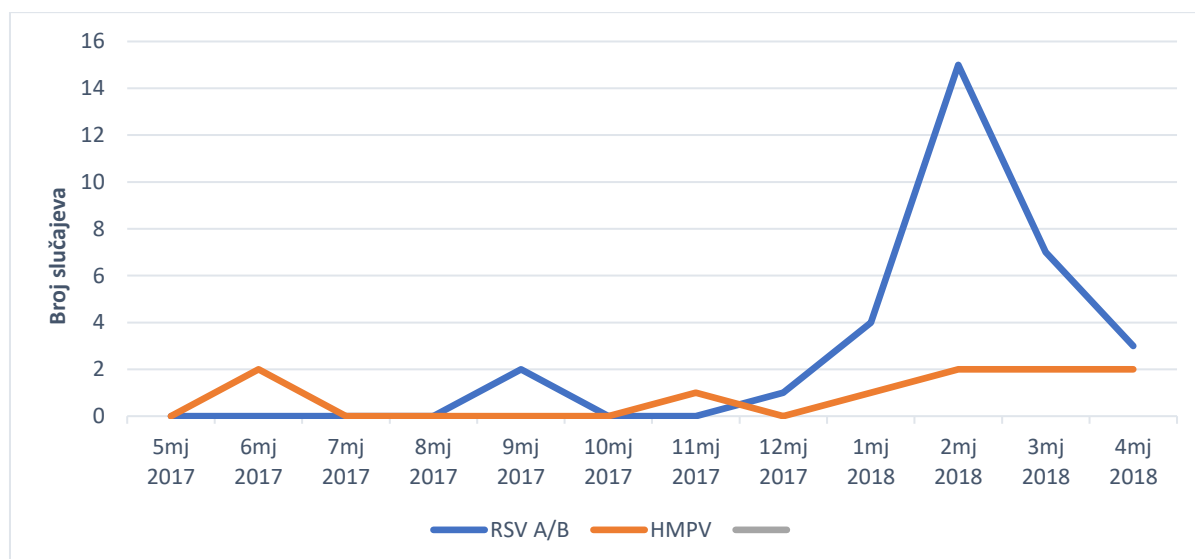
HBoV detektiran je u jesen i zimu 2017., te u 1. i 4. mjesecu 2018.



Slika 28. Raspodjela adenovirusa i humanog bokavirusa po mjesecima

RSV A/B detektiran je u 9. i 12. mjesecu 2017., te od 1. - 4. mjeseca 2018. s najvećom učestalošću u 2. mjesecu 2018.

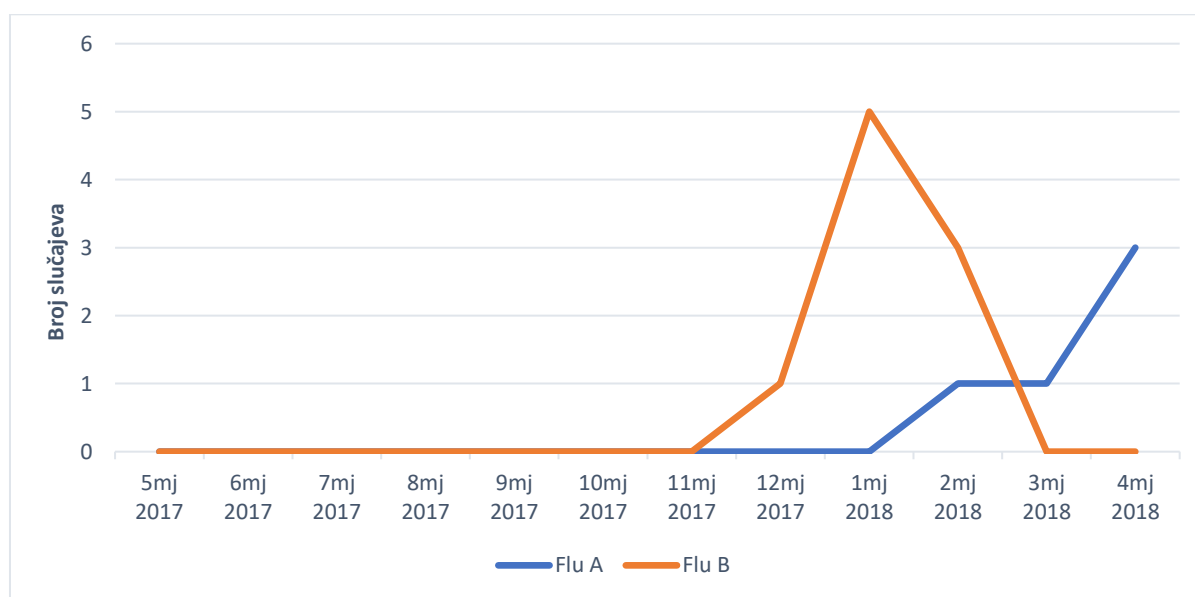
HMPV je detektiran u 6. i 11. mjesecu 2017., te također od 1. - 4. mjeseca 2018. s podjednakom učestalošću po mjesecima.



Slika 29. Raspodjela respiratornog sincicijskog virusa A/B i humanog metapneumovirusa po mjesecima

Flu A pojavljuje se od drugog do četvrtog mjeseca 2018., u kojem je detektiran i najveći broj slučajeva.

Flu B pojavljuje se isključivo u zimu, od dvanaestog mjeseca 2017. do drugog mjeseca 2018., s detekcijom najvećeg broja slučajeva u prvom mjesecu 2018.



Slika 30. Raspodjela virusa influence A i B po mjesecima

6. RASPRAVA

U istraživanju koje je obuhvatilo 239 djece te je provedeno od 5. mjeseca 2017. do 4. mjeseca 2018. godine, prisutnost jednog ili više respiratornih virusa dokazana je u uzorku 75.3% pacijenata. U studijama diljem svijeta, virusna etiologija ustanovljena je rasponu od 32.5% (Panda i sur. 2017) (155) do 91.6 % (Eifan i sur. 2017) (156). U jedinom sličnom istraživanju u Hrvatskoj (Ljubin Sternak i sur. 2016) (157) prisutnost jednog ili više respiratornih virusa dokazana je u uzorku 81.3% pacijenata. To istraživanje provedeno je isključivo tijekom zimskih mjeseci (od siječnja do ožujka) 2010. i 2015. godine i na gotovo dvostruko manjem uzorku od 134 djece hospitalizirane u Klinici za dječje bolesti Zagreb. Obrisci nazofarinksa i ždrijela također su testirani multiplex PCR metodom na 12 (2010.), odnosno 15 respiratornih virusa (2015.).

Koinfekcija/kodetekcija s dva ili više virusa dokazana je u našem istraživanju u 32.8 % pacijenata, a u radu Ljubin Sternak i sur. u čak 40.4% pacijenata. Ovako visoke razine koinfekcije/kodetekcije nađene su još u Saudijskoj Arabiji (42.7%) (Eifan i sur. 2017) (156), te u Libanonu (37%) (Finianos i sur. 2016) (158) i istočnoj Kini, (35.1%) (Ge i sur. 2018) (159), dok su u ostalim studijama razine značajno manje, od svega 1.2% kako navode Stralioetto i sur. (160) do najviše 20.6% u istraživanju Bicer i sur. (161).

Pojam koinfekcije teško je odvojiti od pojma kodetekcije budući da ne znamo jesu li svi pronađeni patogeni stvarni uzročnici bolesti, ili je koji od patogena samo nus nalaz - zaostao titar od prethodne infekcije, asimptomatska infekcija itd. Zato danas govorimo o koinfekciji/kodetekciji. Nekoliko je studija pokazalo da su simptomatske infekcije povezane s višim virusnim titrom (162, 163). Iako je metoda korištena u našem radu kvalitativni PCR, postojala je razlika u intenzitetu za virus specifičnih crta u prikazu virtualnog gela (eng. *bands*), odnosno visini vrška (eng. *peak*) u elektroferogramu u nekim koinfekcijama, što upućuje na to da je virus s manje intenzivnim bandom/nnižim vrškom prisutan u manjoj količini u uzorku. Kvantifikacija virusa u uzorku kvantitativnim metodama molekularne dijagnostike mogla bi pomoći u interpretaciji značaja koinfekcije/kodetekcije respiratornim virusima.

U našem istraživanju, u koinfekciji/kodetekciji najčešće detektiran virus bio je HRV (64.4%), zatim AdV (59.3%), RSV A/B (28.8%) i HCoV-OC43 (20.3%), a u istraživanju Ljubin Sternak i sur. RSV A/B (54.5%), HRV (40.9%), PIV-3 (31.8%) i AdV (22.7%). HRV, RSV i AdV su među najčešće nađenim virusima u koinfekciji/kodetekciji i u istraživanjima koje su objavili Kurskaya i sur. 2018. godine (164), odnosno Eifan i sur. 2017. godine (156). Najčešća kombinacija virusa u koinfekciji/kodetekciji dvama virusima bila je HRV/AdV (37.7%), zatim HRV/RSV (11.1%) i AdV/HEV (8.8%). Kombinacija virusa HRV/AdV je među najčešće detektiranim i u svijetu. Tako Ambrosioni i sur. navode da je učestalost detekcije HRV/AdV u koinfekciji/kodetekciji 15.4%

(165), a Bicer i sur. 19% (161). Nije nađena statistički značajna razlika između infekcije jednim virusom i ukupne koinfekcije/kodetekcije u odnosu na dob i spol ispitanika te na lokalizaciju infekcije. Nedavno objavljene meta-analize pokazuju da virusna koinfekcija ne pogoršava težinu ni ishod bolesti mjereno parametrima kao što su potreba za hospitalizacijom, liječenjem u jedinicama za intenzivnu skrb, potreba za nadoknadom kisika i primjenom mehaničke ventilacije (166).

Akutne respiratorne infekcije, kako je opsežno dokumentirano u studijama diljem svijeta (167), općenito su češće u dječaka, te su u našem istraživanju, ali i u istraživanju Ljubin Sternak i sur., dječaci su bili oko 1.6 puta češći pacijenti od djevojčica. Među pacijentima s dokazanom virusnom etiologijom ARI također su oko 1.6 puta bili češći dječaci. Međutim, kako zaključuju i Kurskaya i sur. (164), nije dokazana statistički značajna razlika između djevojčica i dječaka u učestalosti najčešće detektiranih virusa kao ni u lokalizaciji infekcije.

Poznato je da se virusne infekcije dišnog sustava češće i s težom kliničkom slikom pojavljuju u dojenčadi i male djece (168), zbog nezrelosti imunskog sustava, ali i zbog toga što se primoinfekcija virusom uglavnom odvija u toj dobi. I u našem istraživanju respiratorne infekcije su bile najučestalije u skupini djece do jedne godine (32.8%) te djece od 1-3 godine (28.3%), odnosno bile su 1.5 puta češće u mlađim (61.1%), nego dobnim skupinama iznad 3 godine (38.9%) i dvostruko su češće zahvaćale donje dišne putove u mlađim (69%) nego u starijim dobnim skupinama (31%). Udio respiratornih infekcija u pacijenata mlađih od tri godine može iznositi čak do 92.8% (Wang i sur. 2016) (169), a udio respiratornih infekcija dojenčadi može biti i do 48.9% (Ge i sur. 2018) (159).

U našem istraživanju najčešće detektiran virus, u preko polovice pacijenata bio je HRV (56.1%), na drugom mjestu AdV (24.4%), te na trećem RSV (17.7%), a u istraživanju Ljubin Sternak i sur. najčešće detektiran virus bio je RSV (28.6%), zatim PIV 1-4 (18.4%) i na trećem mjestu HRV (14.3%).

HRV i RSV smjenjuju se na mjestu najčešće detektiranog uzročnika i u recentnim studijama etiologije virusnih infekcija dišnog sustava u djece diljem svijeta. Tako je RSV najčešće detektiran virus u studijama provedenim u Saudijskoj Arabiji, grad Najran (170), istočnoj Kini, grad Wuxi (159), Brazilu, grad Porto Alegre (160), Turskoj, grad Istanbul (161), Rusiji, grad Novosibirsk (164) i Italiji, grad Rim (171), a HRV u studijama provedenim u Saudijskoj Arabiji, grad Riyadh (156), zapadnoj Kini, grad Chengdu (172), Libanonu, grad Beirut (158), istočnoj Indiji, grad Bhubaneswar (155), Vijetnamu, grad Ho Chi Minh City (173) i Švicarskoj, grad Ženeva (165).

Ove razlike mogle bi proizlaziti iz same epidemiološke pojavnosti ovih dvaju virusa, odnosno ovisno o periodu godine koji je obuhvaćen istraživanjem (cijela godina ili samo zimska sezona) i dijelu svijeta u kojem je istraživanje provedeno. Naime, za HRV je već prije istraživanjima

utvrđeno da se pojavljuje širom svijeta tijekom cijele godine, a u umjerenom klimatskom pojasu učestalije u jesen i rano proljeće (174), što je potvrđeno i u našem istraživanju. RSV je kao uzročnik teških infekcija donjih dišnih putova intenzivno istraživano u Hrvatskoj i potvrđeno je da se epidemije odvijaju u dvogodišnjim ciklusima kao i u ostalim zemljama srednje Europe (27). Nakon veće (rane) zimske RSV epidemije slijedi manja (kasna) proljetna nakon 14 mjeseci, a potom za 8 mjeseci opet veća epidemija. Za razliku od srednje Europe, u nekim drugim zemljama umjerenog pojasa RSV epidemije imaju drukčiji obrazac, tako npr. u Velikoj Britaniji imaju monofazni epidemijski ciklus - pojavljuju se svake godine u isto vrijeme (175), u tropskim područjima javljaju se za vrijeme kišnog razdoblja, u Aziji u monsunskom razdoblju, a u južnoj Africi od svibnja do srpnja (176). Epidemijski val RSV-a u Hrvatskoj obično počinje u studenom i traje do kraja svibnja, s vrhuncem velike epidemije u prosincu/siječnju. No, pravilnost dvogodišnjeg ciklusa RSV-a pokazuje manje varijacije početka i vrhunca sezone, tako Mlinarić Galinović i sur. navode da je mala proljetna epidemija u sezoni 2009./10. godine počela ranije s vrhuncem u mjesecu veljači (177), što zajedno s velikom epidemijom u zimu 2015. godine govori u prilog detekciji RSV kao najčešćeg uzročnika u istraživanju Ljubin Sternak i sur. Tabain i sur. navode da je i mala RSV epidemija u sezoni 2013./14. počela ranije, tj. u prosincu te je svoj vrhunac dosegla već u veljači (27). Na temelju tih saznanja i podataka iz našeg istraživanja zaključujemo da je mala epidemija koja se, slijedeći dvogodišnji ciklus, očekivala u proljeće 2018. godine, također počela ranije, u prosincu, s vrhuncem također u mjesecu veljači. Dodatno, i u našem se istraživanju potvrdilo da RSV A i RSV B cirkuliraju istovremeno tijekom epidemije, a u jednom su uzorku zajedno i detektirani.

Druga mogućnost za razliku u detekciji HRV i RSV u različitim istraživanjima jest interferencija između ovih virusa, odnosno pojava da prisutnost jednog virusa u stanici smanjuje mogućnost zaraze drugim, bilo da različitim mehanizmima sprječava njegov ulazak u stanicu ili njegovu replikaciju. Achten i sur. su interferenciju HRV i RSV dokazali većom učestalošću HRV infekcija u djece koja su primila specifičnu RSV profilaksu, u odnosu na onu koja su primila placebo (178).

Dugo vremena je poznato da je HRV najznačajniji uzročnik blagih infekcija gornjeg dijela dišnog sustava, osobito obične prehlade, međutim sve se češće otkriva i njegova prisutnost u donjem dišnom sustavu, te kao uzročnika infekcija donjih dišnih putova (179). Ovaj svjetski trend je potvrđen i u našem istraživanju, budući da je HRV najčešće detektiran virus i u infekcijama isključivo gornjih dišnih putova (46.8%) kao i infekcijama koje zahvaćaju donje dišne putove (66.7%), kako u koinfekciji/kodetekciji, tako i u monoinfekciji (u 32.2% isključivo IGDP i 38% IDDP). Iako je ukupno najčešće detektiran virus u koinfekciji/kodetekciji, ipak je češće detektiran kao jedini virus u uzorku, što je podatak različit od istraživanja Ljubin Sternak

i sur. Time se samo potvrđuje potreba da se respiratorni virusi prate kroz dulje vremensko razdoblje, osobito oni s cjelogodišnjim pojavljivanjem.

RSV je i u našem istraživanju dokazan kao važan uzročnik teških infekcija donjih dišnih putova, osobito u najmlađih pacijenata. Ukupno, u infekcijama koje zahvaćaju donje dišne putove detektiran je tri puta češće nego u infekcijama isključivo gornjih dišnih putova (27.3% naprama 9.3%), međutim kao jedini uzročnik gotovo podjednako uzrokuje infekcije gornjih i donjih dišnih putova (7.3% naprama 9.5%), što bi moglo ukazivati na ulogu koinfekcije u kliničkoj prezentaciji RSV infekcija.

Adenovirusi i virusi parainfluence su, uz HRV i RSV, značajni uzročnici respiratornih infekcija diljem svijeta (155, 156, 159, 160). Adenovirusi su detektirani u 24.4% uzoraka, a javljali su se tijekom cijele godine, s povećanom učestalošću u jesenskim i zimskim mjesecima. Njihovo kroz radove već dobro poznato cjelogodišnje pojavljivanje (23), možebitan je razlog njihovoj nešto rjeđoj detekciji (7.1%) u radu Ljubin Sternak i sur. kada je istraživana samo zimska sezona. S druge strane, u radu Mlinarić Galinović i sur. (180) koji je istraživao epidemiologiju AdV i PIV infekcija u hospitalizirane djece u razdoblju od 14. studenog 2008. do 14. studenog 2010. godine, učestalost AdV iznosila je 18.6%. Kao i u našem istraživanju, pojavnost je bila najveća u skupini djece 1-3 godine, i smanjivala se prema starijim dobnim skupinama. Međutim, Mlinarić Galinović i sur. navode da je AdV u 90% slučajeva uzrokovao infekcije gornjih dišnih putova, dok je u našem istraživanju podjednako nađen u infekcijama samo gornjih dišnih putova kao i u infekcijama koje su zahvaćale donje dišne putove (23.9% naprama 25%), kako u monoinfekciji (5.2% naprama 4.8%), tako i u koinfekciji/kodetekciji kojoj je AdV osobito sklon. U istom radu učestalost PIV infekcija bila je 3.3%, a u našem istraživanju 6.6%. Najčešće je detektiran PIV-1, dok PIV-2 nije nađen, moguće zbog interferencije s PIV-1 (18). Manja učestalost detekcije PIV 1-4 u odnosu na istraživanje Ljubin Sternak i sur. (18.4%) moguća je i zbog interferencije s HRV i RSV, koja je, između ostalih, pokazana i za viruse parainfluence (181, 182).

U našem istraživanju, prvi uzorak u kojem je dokazan virus influence, i to Flu B uzet je u prvom tjednu prosinca. Od tada pa do kraja drugog mjeseca predominira Flu B, a zatim od prvog tjedna trećeg do kraja četvrtog mjeseca, odnosno zadnjeg mjeseca obuhvaćenog našim istraživanjem predominira Flu A. Najveći broj virusa detektiran je u siječnju 2018. godine. Kako je već pokazano (183), gripa je najčešća u dobnoj skupini iznad 5 godina, odnosno u školske djece, budući da su škole kao veliki kolektivi posebno pogodna mjesta za prijenos i širenje virusa influence.

Podatci iz našeg istraživanja poklapaju se s retrogradno utvrđenom epidemiologijom gripe za sezonu 2017./18.

Prema podacima Nacionalnog referentnog centra za gripu i Europskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti (*European Centre for Disease Prevention and Control - ECDC*), sezona gripe 2017./18. godine počela je krajem studenog 2017. godine i trajala je do sredine svibnja 2018. godine, s vrhuncem u prvom tjednu veljače 2018. godine. Najveći broj detektiranih virusa bio je Flu B, 97% linije Yamagata i 3% linije Victoria. Predominacija Flu B trajala je do kraja veljače, zatim dominira Flu A, a oba podtipa, A(H3N2) i A(H1N1)pdm09 istovremeno su cirkulirala u populaciji. Ukupno je detektirano 38% A(H3N2) i 62% A(H1N1)pdm09 podtipa virusa (184, 185). Gripa u sezoni 2017./18. bila je teža i masovnija u odnosu na pretežno A(H3N2) gripu iz prethodne sezone, budući da soj iz linije Yamagata nije bio uključen u preporučeno trovalentno cjepivo.



4. prosinac 2017.

Real time weekly report - week 48/ 2017

GEOGRAPHIC DISTRIBUTION -> Positive specimens from different parts of Croatia
DOMINANT TYPE - B-INFLUENZA VIRUS

In **typization**: 0% A and 100% B influenza viruses.

In **A** subtypization: 0% A/H1N1/pdm09 and 0% A/H3N2/.

In **B** subtypization: 0% B-Victoria and 100% B-Yamagata.

INTENSITY: HIGH 65% positive specimens.

IMPACT: MODERATE

Best regards,
 V.Drazenovic,MD



6. ožujak 2018.

Real time weekly report - week 9/ 2018

GEOGRAPHIC DISTRIBUTION ->Positive specimens from different parts of Croatia
DOMINANT TYPE - A - INFLUENZA VIRUS
 Detection of **A/H3N2/** and **A/H1N1/** viruses.
 In **typization**: 59% A and 41% B influenza viruses.

In **A** subtypization 77% A/H1N1/pdm09 and 23% A/H3N2/.

In **B** subtypization: 0% B-Victoria and 100% B-Yamagata.

INTENSITY: HIGH 51% positive specimens.

IMPACT: MODERATE

Best regards,
 V.Drazenovic,MD

Slika 31. Podatci Nacionalnog referentnog centra za gripu za prvi tjedan prosinca 2017. godine i prvi tjedan ožujka 2018. godine

(Dostupno na: http://gripa.hr/content/szo/tjedno_izvjesce.aspx)

Kao već poznat uzročnik infekcija gornjeg dišnog sustava, osobito obične prehlade, ali i virus koji može uzrokovati infekcije lokalizirane u donjim dišnim putovima (46), HCoV-OC43 je i u našem istraživanju gotovo dvostruko češće detektiran u pacijenata s isključivo IGDP nego u pacijenata s infekcijama koje su zahvaćale donji dio dišnog sustava (12.5% naprama 7.1%). Kako navode i Zhang i sur. (186), nije bilo razlike u lokalizaciji infekcije HCoV-OC43-om u monoinfekciji, odnosno koinfekciji/kodetekciji. U studijama provedenim diljem svijeta, stopa koinfekcije/kodetekcije kretala se od 30.5% (Dare i sur. 2007) (187) do 70% u istraživanju koje su objavili Jevšnik i sur. 2012. godine u susjednoj Sloveniji (188). Stopa koinfekcije/kodetekcije u našem istraživanju bila je 66.7%, a HCoV-OC43 je detektiran zajedno sa svim respiratornim virusima, najčešće s HRV. HCoV-OC43 je detektiran isključivo u jesenskim i zimskim mjesecima, a kako navode i Jean i sur. u svom jednogodišnjem istraživanju (46), maksimum detekcije bio je u studenom.

HCoV-229E/NL63 nađen je u samo dva uzorka, jednom kao jedini uzročnik infekcije gornjeg dišnog sustava, a drugi put u koinfekciji/kodetekciji s Flu A u djeteta s bronhitisom.

Kako je već poznato, HCoV-229E, a osobito HCoV-OC43 i HCoV-NL63 infekcije pojavljuju se najčešće u vrlo male djece (189, 190), te je tako i u našem istraživanju najviše slučajeva bilo u dojenčadi do godine dana, ali u nešto manjem obimu i u svim ostalim dobnim skupinama.

HBoV i HEV na šestom su mjestu učestalosti s detekcijom od 7.2%. HBoV kao teško kultivabilan virus otkriven u posljednjih desetak godina, u Hrvatskoj je prvi puta detektiran 2015. godine u istraživanju Ljubić Sternak i sur. Iako se povezuje s infekcijama donjih dišnih putova, njegovu pravu važnost kao uzročnika težih infekcija u dišnom sustavu je teško utvrditi zbog visoke stope koinfekcije/kodetekcije koja se kreće u rasponu od 21% (Lasarević i sur. 2017) (191) do 90% (Fry i sur. 2007) (192). U našem istraživanju utvrđena je također visoka stopa koinfekcije/kodetekcije od 69.2%, a u radu Ljubić Sternak i sur. čak 87.5%. Broccolo i sur. su iznijeli hipotezu prema kojoj je visoka stopa koinfekcije/kodetekcije posljedica prolongirane prisutnosti virusa u mukozi respiratornog trakta s detekcijom HBoV DNA i do godinu dana nakon infekcije (49). Kako navode i Ahn i sur. (193), HBoV je najčešće detektiran zajedno s HRV.

U našem istraživanju, HBoV je u gotovo svim slučajevima nađen u pacijenata s infekcijom samo gornjih dišnih putova. Međutim, u jedinom slučaju teže infekcije, bronhopneumonije, u uzorku je dokazan samo HBoV. HBoV se s bronhopneumonijom povezuje i u istraživanju Al-Rousan i sur. (194). Najveći broj slučajeva bio je u dobnoj skupini od 1-3 godine, čak 69.2%, što je u skladu s podacima dvogodišnjeg istraživanja Ahn i sur. (193). U djece iznad 5 godina HBoV nije detektiran. Kako je već pokazano (195), i u našem istraživanju HBoV je bio najčešći u zimskim i proljetnim mjesecima.

HMPV je dokazan u gotovo dvostruko manje uzoraka pozitivnih na respiratorne viruse nego u radu Ljubić Sternak i sur., 5.5% naprama 10.1%, vjerojatno zbog njegove pojavnosti tijekom kasnih zimskih i ranih proljetnih mjeseci, što je pokazano i u ovom istraživanju. U istraživanju epidemiologije HMPV-a koje je provedeno u Hrvatskoj u četverogodišnjem periodu od početka 2009. do kraja 2012. godine, utvrđeno je da se vrhunac pojavnosti HMPV-a izmjenjuje između zimskih i proljetnih mjeseci ovisno o godini, te da alternira s izbijanjem RSV epidemije (10). U istom istraživanju, HMPV je češće nađen u infekcijama donjih dišnih putova nego u infekcijama samo gornjih dišnih putova, kao i u našem istraživanju (7.1% naprama 4.2%), dok u radu Ljubić Sternak i sur. nije bilo razlike u detekciji HMPV-a s obzirom na lokalizaciju infekcije. Stopa koinfekcije/kodetekcije prema studijama kreće se od 26% (García-García i sur. 2006) (198) do 81.8% (Guido i sur. 2011) (199). U našem istraživanju, stopa koinfekcije/kodetekcije bila je 40%, a u jednakom broju uzoraka detektiran je zajedno s HRV, RSV i HCoV-OC43. Svi

slučajevi koinfekcije/kodetekcije odnosili su se na infekcije u donjem dijelu dišnog sustava, dok je u monoinfekciji češće uzrokovao infekcije samo gornjih dišnih putova (4.2% naprama 2.3%).

U našem istraživanju najveći broj virusa detektiran je u mlađim dobnim skupinama do tri godine, a posebno u pacijenata do godine dana. Već je utvrđeno da se primarne HMPV infekcije zbivaju u ranom djetinjstvu te da do pete godine života gotovo sva djeca posjeduju protutijela protiv HMPV-a (200). Studija o seroprevalenciji HMPV-a koja je provedena 2005. godine u Hrvatskoj pokazala je da stopa seropozitivnosti raste od 18.7% u djece u dobi od 6 mjeseci do godinu dana na 45.5% u djece između 1 i 2 godine, odnosno na 88.9% u djece starije od 5 godina. U dobi iznad 20 godina seropozitivnost je iznosila 100% (201).

Metode molekularne dijagnostike osobito su korisne za viruse koji imaju mnogo tipova kao što je HEV. Primijenjeni PCR test, tzv. „panenterovirus - PCR test“ ne razlikuje tipove enterovirusa. Ukupno su HEV dokazani dvostruko češće u infekcijama samo gornjih dišnih putova, nego u infekcijama donjeg dijela dišnog sustava (9.4% naprama 4.7%), ali taj podatak treba razmatrati u svjetlu vrlo visoke razine koinfekcije/kodetekcije od 84.6%, osobito zajedno s AdV. Choi i sur. u svojem trogodišnjem istraživanju objavljenom 2016. godine navode stopu koinfekcije/kodetekcije od 64.9%, a HEV su podjednako nađeni u pacijenata s infekcijom gornjih i donjih dišnih putova (196).

U istraživanju Ljubin Sternak i sur. polovica pacijenata s HEV infekcijom bila je mlađa od godinu dana, a u našem istraživanju 76.9% pacijenata je bilo u mlađoj dobnj skupini do tri godine, što upućuje na to da se primoinfekcija respiratornim tipovima HEV-a zbiva u ranom djetinjstvu. Iako se HEV pojavljuju gotovo kroz cijelu godinu, zanimljivo je da niti jedan slučaj virusa nije dokazan u ljetnim mjesecima (uzorak u kojem je dokazan HEV u 9. mjesecu uzet je u kalendarskoj jeseni), što je uz jesen dokazana enterovirusna sezona (197).

U zaključku, iako su zimski mjeseci tradicionalno predmnijevana glavna sezona respiratornih virusa, česti i značajni uzročnici ARI kao što su HRV i AdV pojavljuju se kroz cijelu godinu, a važni uzročnici sa zimsko-proljetnim sezonstvom RSV i HMPV pokazuju cikličnost u pojavljivanju i ne detektiraju se u istom obimu svake godine. Važno je i da se s epidemiološkim značajkama virusa s potencijalnim cjelogodišnjim pojavljivanjem kao što je HBoV tek upoznajemo. Nadalje, iako su u istraživanju uglavnom potvrđene već postojeće pretpostavke o sezonstvu pojedinih respiratornih virusa, kao što je npr. detekcija Flu zimi, bilo je i podataka koji nisu bili u skladu s očekivanjima, npr. izostanak detekcije HEV u ljetnim mjesecima.

Sve to ukazuje na važnost cjelogodišnje detekcije respiratornih virusa, jer iako su povremena praćenja određenih respiratornih virusa donekle korisna, tek kontinuiranom detekcijom gotovo svih poznatih uzročnika dovodimo epidemiološke podatke u ispravan i primjenjiv kontekst i omogućujemo punu korist od dobivene dijagnoze, vezano uz smanjenje administracije antibiotika, mogućnosti liječenja i osobito prevencije.

7. ZAKLJUČAK

Akutne respiratorne infekcije najčešće su infektivne bolesti, ali i najučestalije bolesti čovjeka uopće, a u velikoj većini slučajeva uzrokovane su respiratornim virusima. Utvrđivanje etiologije ARI samo na temelju simptoma, kliničkih nalaza i medicinsko-biokemijske pretrage krvi, a bez adekvatne laboratorijske detekcije virusa nije moguće zbog odsutnosti patogen-specifičnih simptoma. Metode detekcije zasnovane na amplifikaciji nukleinskih kiselina (NAATs) kao visoko specifične i osjetljive najpogodnije su za laboratorijsku dijagnostiku ARI, a njihovu relativno višu cijenu treba razmatrati u svjetlu ukupnih troškova liječenja pacijenta, što uključuje i troškove drugih dijagnostičkih pretraga i testova zbog nedostatka dijagnoze.

U ovom istraživanju detekcija 15 respiratornih virusa multiplex PCR metodom provedena je u uzorcima 239 djece hospitalizirane u Klinici za dječje bolesti Zagreb tijekom 2017. i 2018. godine. Detekcija HRV kao najučestalijeg uzročnika, ne samo u infekcijama gornjih, nego i u infekcijama donjih dišnih putova, kako u monoinfekciji tako i u koinfekciji/kodetekciji, u korelaciji je s najnovijim svjetskim studijama i daje novi pogled na ovog uzročnika obične prehlade i njegovu ulogu u teškim infekcijama u dišnom sustavu.

Istraživanje je provedeno u sklopu projekta voditeljice Sunčаницe Ljubin Sternak pod naslovom: Novi i zapostavljeni virusni uzročnici infekcija dišnog sustava u vulnerabilnim skupinama bolesnika. Ovo je dosad brojem ispitanika najveće i najobuhvatnije istraživanje etiologije virusnih infekcija dišnog sustava u djece u Hrvatskoj, koje nam osim uvida u učestalost i kliničke karakteristike infekcije pojedinim virusima, te razinu i značajke koinfekcije/kodetekcije, svojim jednogodišnjim trajanjem daje i temeljit uvid u sezonsvo respiratornih virusa kroz sva četiri godišnja doba. S obzirom da se istraživanje nastavilo tijekom 2018. godine te se planira nastaviti najmanje do kraja drugog mjeseca 2021. godine, ovi će epidemiološki podatci biti još potpuniji te doprinijeti glavnom cilju smanjenja nepotrebne administracije antibiotika, a također i omogućiti da najnovija dostignuća u antivirusnoj terapiji i specifičnoj prevenciji budu točno i adekvatno prenesena na populaciju djece u Hrvatskoj.

8. ZAHVALA

Ponajprije, zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Sunčanici Ljubin Sternak na srdačnosti, ljubaznosti i strpljenju, te brojnim vrijednim savjetima i nezamjenjivom stručnom vodstvu pri pisanju ovog diplomskog rada. Hvala Vam što ste me uvjerali da se otisnem u zanimljiv svijet izrade znanstvenih radova.

Također, zahvaljujem svojoj obitelji na podršci tijekom studiranja. Bez vaše ljubavi ništa od ovog ne bi bilo moguće.

Zahvaljujem i zaručniku, prijateljima, kolegama s fakulteta i sa zбора. Bili ste vjetar u leđa uvijek kada je trebalo.

Najveće zahvale mome sinu Stipi. Uvijek si razumio da je, pored tebe, i medicina moja velika ljubav.

Ovaj rad posvećujem svom ocu, pok. dr. med. spec. pulm. Ivanu Kale. Vrlo rano si u meni probudio interes za medicinu i uvijek ga biranim riječima njegovao.

Vjerujem da bi te ovaj moj uspjeh učinio ponosnim.

9. LITERATURA

1. Kuzman I. Osobitosti akutnih respiratornih infekcija u starije djece i adolescenata. *Medicus*, 19(1_Adolescencija_2). 2010:41-50.
2. Mardešić D, i sur. *Pedijatrija*. Zagreb: Školska knjiga; 2016.
3. Hrvatski zavod za javno zdravstvo: Hrvatski zdravstvenostatistički ljetopis za 2008.godinu. Zagreb: HZJZ; 2009.
4. Kuzman M. Javnozdravstveno značenje infekcija dišnog sustava. *Medicus*, 14(1_ARI). 2005:7-18.
5. Fendrick AM, Monto AS, Nightengale B, Sarnes M. The economic burden of non-influenza-related viral respiratory tract infection in the United States. *Arch Intern Med*. 2003;163(4):487-94.
6. Kuzman I. Infekcije dišnog sustava: najčešće bolesti čovjeka. *Medicus*, 14(1_ARI). 2005:19-25.
7. Andrade DC, Borges IC, Bouzas ML, Oliveira JR, Kayhty H, Ruuskanen O, et al. Antibody responses against *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in children with acute respiratory infection with or without nasopharyngeal bacterial carriage. *Infectious diseases (London, England)*. 2018;50(9):705-13.
8. Babic-Erceg A, Vilbic-Cavlek T, Erceg M, Mlinaric-Missoni E, Begovac J. Prevalence of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (2010-2013): the first Croatian report. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2014;61(2):181-8.
9. Ljubin-Sternak S, Santak M, Cepin-Bogovic J, Bace A, Vojnovic G, Mlinaric-Galinovic G, et al. Detection of genetic lineages of human metapneumovirus in Croatia during the winter season 2005/2006. *J Med Virol*. 2008;80(7):1282-7.
10. Ljubin-Sternak S, Mlinaric-Galinovic G, Buntic AM, Tabain I, Vilbic-Cavlek T, Cepin-Bogovic J, et al. Seasonal occurrence of human metapneumovirus infections in Croatia. *The Pediatric infectious disease journal*. 2014;33(2):165-7.
11. Slovic A, Ivancic-Jelecki J, Ljubin-Sternak S, Galinovic GM, Forcic D. A molecular epidemiological study of human respiratory syncytial virus in Croatia, 2011-2014. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2016;44:76-84.
12. Tabain I, Ljubin-Sternak S, Cepin-Bogovic J, Markovinovic L, Knezovic I, Mlinaric-Galinovic G. Adenovirus respiratory infections in hospitalized children: clinical findings in relation to species and serotypes. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(7):680-4.
13. Fairchok MP, Martin ET, Kuypers J, Englund JA. A prospective study of parainfluenza virus type 4 infections in children attending daycare. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(8):714-6.
14. Frost HM, Robinson CC, Dominguez SR. Epidemiology and clinical presentation of parainfluenza type 4 in children: a 3-year comparative study to parainfluenza types 1-3. *J Infect Dis*. 2014;209(5):695-702.
15. Lee WM, Kiesner C, Pappas T, Lee I, Grindle K, Jartti T, et al. A diverse group of previously unrecognized human rhinoviruses are common causes of respiratory illnesses in infants. *PLoS One*. 2007;2(10):e966.
16. Stock I. [Human rhinovirus diseases--epidemiology, treatment and prevention]. *Medizinische Monatsschrift fur Pharmazeuten*. 2014;37(2):44-53.
17. Kalenić S i sur. *Medicinska mikrobiologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
18. Begovac J, Božinović D, Lisić M, Baršić B, Schönwald S. *Infektologija*. Zagreb: Profil International; 2006.
19. Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L, et al. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *BMJ*. 1995;310(6989):1225-9.
20. Bardin PG, Fraenkel DJ, Sanderson G, Lampe F, Holgate ST. Lower airways inflammatory response during rhinovirus colds. *International archives of allergy and immunology*. 1995;107(1-3):127-9.

21. Lynch JP, 3rd, Fishbein M, Echavarria M. Adenovirus. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2011;32(4):494-511.
22. Lion T. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clinical microbiology reviews*. 2014;27(3):441-62.
23. Lynch JP, 3rd, Kajon AE. Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2016;37(4):586-602.
24. Borchers AT, Chang C, Gershwin ME, Gershwin LJ. Respiratory syncytial virus--a comprehensive review. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2013;45(3):331-79.
25. Piedimonte G, Perez MK. Respiratory syncytial virus infection and bronchiolitis. *Pediatrics in review*. 2014;35(12):519-30.
26. Roglić S, Knezović I, Markovinović L, Miše B, Tešović G. Bronhiolitis uzrokovan respiratornim sincicijskim virusom u razdoblju od 2003. do 2009. godine. *Infektološki glasnik*, 29 (3). 2009:101-10.
27. Tabain I, Vilibić-Čavlek T, Jelić V, Mlinarić-Galinović G. EPIDEMIOLOŠKE ZNAČAJKE INFEKCIJA RESPIRATORNIM SINCICIJSKIM VIRUSOM U ZAGREBU TIJEKOM DVIJU UZASTOPNIH ZIMSKIH SEZONA. *Acta medica Croatica*, 71 (2). 2017:115-9.
28. Vainionpaa R, Hyypia T. Biology of parainfluenza viruses. *Clinical microbiology reviews*. 1994;7(2):265-75.
29. Fox TG, Christenson JC. Influenza and parainfluenza viral infections in children. *Pediatrics in review*. 2014;35(6):217-27; quiz 28.
30. Russell E, Ison MG. Parainfluenza Virus in the Hospitalized Adult. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2017;65(9):1570-6.
31. Liu WK, Liu Q, Chen DH, Liang HX, Chen XK, Huang WB, et al. Epidemiology and clinical presentation of the four human parainfluenza virus types. *BMC infectious diseases*. 2013;13:28.
32. Counihan ME, Shay DK, Holman RC, Lowther SA, Anderson LJ. Human parainfluenza virus-associated hospitalizations among children less than five years of age in the United States. *The Pediatric infectious disease journal*. 2001;20(7):646-53.
33. Uyeki TM. Influenza. *Annals of internal medicine*. 2017;167(5):itc33-itc48.
34. Knezović I. Osobitosti influence u djece. *Medicus*, 20 (1_Influenza). 2011:33-8.
35. Peteranderl C, Herold S, Schmoldt C. Human Influenza Virus Infections. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2016;37(4):487-500.
36. Ren RQ, Zhou L, Ni DX. [An overview on the history of global influenza pandemics]. *Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi*. 2018;39(8):1021-7.
37. Kuzman I. Influenza: klinička slika bolesti i komplikacije. *Medicus*, 20 (1_Influenza). 2011:25-32.
38. Vabret A, Dina J, Brison E, Brouard J, Freymuth F. [Human coronaviruses]. *Pathologie-biologie*. 2009;57(2):149-60.
39. Tyrrell DA, Bynoe ML. Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. *Lancet (London, England)*. 1966;1(7428):76-7.
40. Hamre D, Procknow JJ. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)*. 1966;121(1):190-3.
41. van der Hoek L, Pyrc K, Berkhout B. Human coronavirus NL63, a new respiratory virus. *FEMS microbiology reviews*. 2006;30(5):760-73.
42. Chonmaitree T, Revai K, Grady JJ, Clos A, Patel JA, Nair S, et al. Viral upper respiratory tract infection and otitis media complication in young children. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;46(6):815-23.
43. Jevšnik M, Uršič T, Žigon N, Lusa L, Krivec U, Petrovec M. Coronavirus infections in hospitalized pediatric patients with acute respiratory tract disease. *BMC infectious diseases*. 2012;12(1):365.

44. Zeng ZQ, Chen DH, Tan WP, Qiu SY, Xu D, Liang HX, et al. Epidemiology and clinical characteristics of human coronaviruses OC43, 229E, NL63, and HKU1: a study of hospitalized children with acute respiratory tract infection in Guangzhou, China. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2018;37(2):363-9.
45. van der Hoek L, Sure K, Ihorst G, Stang A, Pyrc K, Jebbink MF, et al. Croup is associated with the novel coronavirus NL63. *PLoS medicine*. 2005;2(8):e240.
46. Jean A, Quach C, Yung A, Semret M. Severity and outcome associated with human coronavirus OC43 infections among children. *The Pediatric infectious disease journal*. 2013;32(4):325-9.
47. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(36):12891-6.
48. Peltola V, Soderlund-Venermo M, Jartti T. Human bocavirus infections. *The Pediatric infectious disease journal*. 2013;32(2):178-9.
49. Broccolo F, Falcone V, Esposito S, Toniolo A. Human bocaviruses: Possible etiologic role in respiratory infection. *Journal of clinical virology* : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2015;72:75-81.
50. Guido M, Tumolo MR, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M, et al. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World journal of gastroenterology*. 2016;22(39):8684-97.
51. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nature medicine*. 2001;7(6):719-24.
52. Cseke G, Maginnis MS, Cox RG, Tollefson SJ, Podsiad AB, Wright DW, et al. Integrin alphavbeta1 promotes infection by human metapneumovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(5):1566-71.
53. Hamelin ME, Abed Y, Boivin G. Human metapneumovirus: a new player among respiratory viruses. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2004;38(7):983-90.
54. Panda S, Mohakud NK, Pena L, Kumar S. Human metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen. *International journal of infectious diseases* : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases. 2014;25:45-52.
55. Caracciolo S, Minini C, Colombrita D, Rossi D, Miglietti N, Vettore E, et al. Human metapneumovirus infection in young children hospitalized with acute respiratory tract disease: virologic and clinical features. *The Pediatric infectious disease journal*. 2008;27(5):406-12.
56. Semple MG, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara PS, Halfhide C, et al. Dual Infection of Infants by Human Metapneumovirus and Human Respiratory Syncytial Virus Is Strongly Associated with Severe Bronchiolitis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2005;191(3):382-6.
57. Lazar I, Weibel C, Dziura J, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. Human metapneumovirus and severity of respiratory syncytial virus disease. *Emerging infectious diseases*. 2004;10(7):1318-20.
58. Kahn JS. Epidemiology of human metapneumovirus. *Clinical microbiology reviews*. 2006;19(3):546-57.
59. Stanway G, Brown F, Christian P, et al. Family Picornaviridae. *Virus taxonomy*. Eight report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier/Academic Press. 2005:757-78.
60. Palacios G, Oberste MS. Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *Journal of Neurovirology*. 2005;11(5):424-33.
61. Dalldorf G, Sickles GM. An Unidentified, Filtrable Agent Isolated From the Feces of Children With Paralysis. *Science (New York, NY)*. 1948;108(2794):61-2.

62. Il'inskii Iu A, Marchenko VI, Popov VN. [Echovirus infections]. *Sovetskaia meditsina*. 1984(8):48-51.
63. Royston L, Tapparel C. Rhinoviruses and Respiratory Enteroviruses: Not as Simple as ABC. *Viruses*. 2016;8(1).
64. Schieble JH, Fox VL, Lennette EH. A probable new human picornavirus associated with respiratory diseases. *Am J Epidemiol*. 1967;85(2):297-310.
65. Khan F. Enterovirus D68: acute respiratory illness and the 2014 outbreak. *Emergency medicine clinics of North America*. 2015;33(2):e19-32.
66. Principi N, Esposito S. Enterovirus D-68: an emerging cause of infection. *Expert review of respiratory medicine*. 2015;9(6):711-9.
67. Hasegawa S, Hirano R, Okamoto-Nakagawa R, Ichiyama T, Shirabe K. Enterovirus 68 infection in children with asthma attacks: virus-induced asthma in Japanese children. *Allergy*. 2011;66(12):1618-20.
68. Dyda A, Stelzer-Braid S, Adam D, Chughtai AA, MacIntyre CR. The association between acute flaccid myelitis (AFM) and Enterovirus D68 (EV-D68) - what is the evidence for causation? *Euro Surveill*. 2018;23(3).
69. Holm-Hansen CC, Midgley SE, Fischer TK. Global emergence of enterovirus D68: a systematic review. *The Lancet Infectious diseases*. 2016;16(5):e64-e75.
70. Shimizu K. [History of influenza epidemics and discovery of influenza virus]. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine*. 1997;55(10):2505-11.
71. Buller RS. Molecular detection of respiratory viruses. *Clinics in laboratory medicine*. 2013;33(3):439-60.
72. Presečki V i sur. *Virologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2002.
73. Jagus P, Chorostowska-Wynimko J, Rozy A. [Diagnostics of selected respiratory virus infections]. *Pneumonologia i alergologia polska*. 2010;78(1):47-53.
74. Hematian A, Sadeghifard N, Mohebi R, Taherikalani M, Nasrolahi A, Amraei M, et al. Traditional and Modern Cell Culture in Virus Diagnosis. *Osong public health and research perspectives*. 2016;7(2):77-82.
75. Dijkman R, Koekkoek SM, Molenkamp R, Schildgen O, van der Hoek L. Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells. *Journal of virology*. 2009;83(15):7739-48.
76. McAdam AJ, Riley AM. Developments in tissue culture detection of respiratory viruses. *Clinics in laboratory medicine*. 2009;29(4):623-34.
77. Sato K, Watanabe O, Ohmiya S, Chiba F, Hayashi M, Suzuki T, et al. Efficient isolation of human parainfluenza viruses 1 and 3 using MNT-1, a human malignant melanoma cell line system that exhibits an apparent cytopathic effect. *Microbiology and immunology*. 2016;60(11):801-5.
78. Ghietto LM, Toigo D'Angelo AP, Viale FA, Adamo MP. Human bocavirus 1 infection of CACO-2 cell line cultures. *Virology*. 2017;510:273-80.
79. Sato K, Watanabe O, Ohmiya S, Chiba F, Suzuki A, Okamoto M, et al. Efficient isolation of human metapneumovirus using MNT-1, a human malignant melanoma cell line with early and distinct cytopathic effects. *Microbiology and immunology*. 2017;61(11):497-506.
80. Hayflick L. CHAPTER 3 - Subculturing Human Diploid Fibroblast Cultures11Supported, in part, by research Grant HD 04004 from the National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland. In: Kruse PF, Patterson MK, editors. *Tissue Culture*: Academic Press; 1973. p. 220-3.
81. Leland DS, Ginocchio CC. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clinical microbiology reviews*. 2007;20(1):49-78.
82. Ison MG, Hayden RT. Adenovirus. *Microbiology spectrum*. 2016;4(4).
83. Jacobs SE, Lamson DM, St George K, Walsh TJ. Human rhinoviruses. *Clinical microbiology reviews*. 2013;26(1):135-62.
84. Dijkman R, Jebbink M, M Koekkoek S, Deijns M, Jonsdottir H, Molenkamp R, et al. Isolation and Characterization of Current Human Coronavirus Strains in Primary Human Epithelial Cell Cultures Reveal Differences in Target Cell Tropism2013.

85. Abiko C, Mizuta K, Itagaki T, Katsushima N, Ito S, Matsuzaki Y, et al. Outbreak of human metapneumovirus detected by use of the Vero E6 cell line in isolates collected in Yamagata, Japan, in 2004 and 2005. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(6):1912-9.
86. Ikeda T, Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Itagaki T, Katsushima F, et al. Acute respiratory infections due to enterovirus 68 in Yamagata, Japan between 2005 and 2010. 2012;56(2):139-43.
87. Henrickson KJ. Parainfluenza viruses. *Clinical microbiology reviews*. 2003;16(2):242-64.
88. Ljubin Sternak S. Suvremena dijagnostika virusnih infekcija dišnog sustava. Dostupno na:http://www.stampar.hr/sites/default/files/Projekti/ljubin_sternak_-_suvremena_dgp.pdf [Internet]. 2016.
89. Andresen DN, Kesson AM. High Sensitivity of a Rapid Immunochromatographic Test for Detection of Influenza A Virus 2009 H1N1 in Nasopharyngeal Aspirates from Young Children. 2010;48(7):2658-9.
90. Aoki V, Sousa JX, Jr., Fukumori LM, Perigo AM, Freitas EL, Oliveira ZN. Direct and indirect immunofluorescence. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2010;85(4):490-500.
91. Porstmann T, Kiessig ST. Enzyme immunoassay techniques. An overview. *Journal of immunological methods*. 1992;150(1-2):5-21.
92. Loeffelholz M, Chonmaitree T. Advances in diagnosis of respiratory virus infections. *International journal of microbiology*. 2010;2010:126049.
93. Sidoti F, Bergallo M, Costa C, Cavallo R. Alternative molecular tests for virological diagnosis. *Molecular biotechnology*. 2013;53(3):352-62.
94. Sinčić N. Medicinska genetika - DNA tehnologija i primjena u modernoj dijagnostici i terapiji. Nastavni tekst za vježbu. 2015.
95. Myers TW, Gelfand DH. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry*. 1991;30(31):7661-6.
96. Ma WP, Kaiser MW, Lyamicheva N, Schaefer JJ, Allawi HT, Takova T, et al. RNA template-dependent 5' nuclease activity of *Thermus aquaticus* and *Thermus thermophilus* DNA polymerases. *J Biol Chem*. 2000;275(32):24693-700.
97. Gharabaghi F, Hawan A, Drews SJ, Richardson SE. Evaluation of multiple commercial molecular and conventional diagnostic assays for the detection of respiratory viruses in children. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2011;17(12):1900-6.
98. Lam WY, Yeung AC, Tang JW, Ip M, Chan EW, Hui M, et al. Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol*. 2007;45(11):3631-40.
99. Mauch H. Diagnosis of acute respiratory tract infections: serology and new methods. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1996;1 Suppl 2:S16-s9.
100. Ginocchio CC, McAdam AJ. Current Best Practices for Respiratory Virus Testing. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(9 Suppl):S44-S8.
101. Suzuta T. [Complement binding reaction]. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine*. 1979;Suppl:1472-7.
102. Horsfall FL. VIRUS-NEUTRALIZATION TESTS: IMPLICATIONS AND INTERPRETATIONS. 1957;69(4):633-43.
103. Delaat AN. Non-specific inhibition of virus hemagglutination: a review. *The American journal of medical technology*. 1966;32(5):303-10.
104. Odjel za virologiju. Dostupno na:<https://www.hzjz.hr/sluzba-mikrobiologija/odjel-za-virologiju/2018>.
105. Kuzman I. Prehlada i influenza: klinička pojavnost i simptomatsko liječenje. *Medicus*, 24(2 ASK niske doze). 2015:147-54.
106. Kirkpatrick GL. The common cold. *Prim Care*. 1996;23(4):657-75.
107. Roggen I, van Berlaer G, Gordts F, Pierard D, Hubloue I. Centor criteria in children in a paediatric emergency department: for what it is worth. 2013;3(4):e002712.

108. Elliott AC, Williamson GR. A Systematic Review and Comprehensive Critical Analysis Examining the Use of Prednisolone for the Treatment of Mild to Moderate Croup. *The open nursing journal*. 2017;11:241-61.
109. Petrocheilou A, Tanou K, Kalampouka E, Malakasioti G, Giannios C, Kaditis AG. Viral croup: diagnosis and a treatment algorithm. *Pediatr Pulmonol*. 2014;49(5):421-9.
110. Ortiz-Alvarez O. Acute management of croup in the emergency department. *Paediatrics & Child Health*. 2017;22(3):166-9.
111. Vishniakova LA, Shkirmatova IV, Zhelenina LA, Bogdanova AV, Rumel NV. [Etiology of acute bronchitis in young children]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 1986(12):34-8.
112. Singh A, Zahn E. Bronchitis, Acute. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2018.
113. Rahbarimanesh AA, Izadi A, Ghajarzadeh M. Viral Aetiology of Bronchiolitis in Hospitalised Children in a Tertiary Center in Tehran. *Mædica*. 2018;13(1):17-20.
114. Mlinarić-Galinović G, Jović, M., Knezović, I., Tešović, G., Čepin-Bogović, J., Ivković-Jureković, I. i Sim, R. Epidemiološke osobine infekcija respiratornim sincicijskim virusom tijekom 2009. i 2010. godine u Zagrebu i Zagrebačkoj županiji. *Medicina Fluminensis*, 48 (1). 2012:79-84.
115. Ralston SL, Lieberthal AS, Meissner HC. Ralston SL, Lieberthal AS, Meissner HC, et al. Clinical Practice Guideline: The Diagnosis, Management, and Prevention of Bronchiolitis. *Pediatrics*. 2014;134(5):e1474-e1502. *Pediatrics*. 2015;136(4):782.
116. Pipavath SJ, Lynch DA, Cool C, Brown KK, Newell JD. Radiologic and pathologic features of bronchiolitis. *AJR American journal of roentgenology*. 2005;185(2):354-63.
117. Beigelman A, Bacharier LB. The role of early life viral bronchiolitis in the inception of asthma. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2013;13(2):211-6.
118. Ahel V, Rožmanić V. Pneumonije u dječjoj dobi. *Medicus*, 14 (1_ARI). 2005:91-8.
119. Kuzman I. Učestalost pneumonija u općoj populaciji. *Pneumonije - uzročnici, dijagnostika, liječenje*. Zagreb: Medicinska naklada; 1999. p. 19-27.
120. van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet (London, England)*. 2009;374(9700):1543-56.
121. Donowitz G, Mandell G. Acute pneumonia. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia: Elsevier, Churchill Livingstone; 2005. p. 819-45.
122. Kuzman I. Pneumonije: uzročnici i dijagnostika. *Medicus*, 14 (1_ARI).71-82.
123. Smith SM, Schroeder K, Fahey T. Over-the-counter (OTC) medications for acute cough in children and adults in community settings. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014(11):Cd001831.
124. Eccles R, Martensson K, Chen SC. Effects of intranasal xylometazoline, alone or in combination with ipratropium, in patients with common cold. *Curr Med Res Opin*. 2010;26(4):889-99.
125. Ralston SL, Lieberthal AS, Meissner HC, Alverson BK, Baley JE, Gadomski AM, et al. Clinical practice guideline: the diagnosis, management, and prevention of bronchiolitis. *Pediatrics*. 2014;134(5):e1474-502.
126. Wong SS, Yuen KY. Antiviral therapy for respiratory tract infections. *Respirology (Carlton, Vic)*. 2008;13(7):950-71.
127. Hayden FG, Andries K, Janssen PA. Safety and efficacy of intranasal pirodavir (R77975) in experimental rhinovirus infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1992;36(4):727-32.
128. Djukanovic R, Harrison T, Johnston SL, Gabbay F, Wark P, Thomson NC, et al. The effect of inhaled IFN-beta on worsening of asthma symptoms caused by viral infections. A randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(2):145-54.
129. Ganapathi L, Arnold A, Jones S, Patterson A, Graham D, Harper M, et al. Use of cidofovir in pediatric patients with adenovirus infection. *F1000Research*. 2016;5:758.
130. Hiwarkar P, Amrolia P, Sivaprakasam P, Lum SH, Doss H, O'Rafferty C, et al. Brincidofovir is highly efficacious in controlling adenoviremia in pediatric recipients of hematopoietic cell transplant. *Blood*. 2017;129(14):2033-7.

131. Ventre K, Randolph AG. Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2007(1):Cd000181.
132. Sparrelid E, Ljungman P, Ekelof-Andstrom E, Aschan J, Ringden O, Winiarski J, et al. Ribavirin therapy in bone marrow transplant recipients with viral respiratory tract infections. *Bone marrow transplantation*. 1997;19(9):905-8.
133. Dhakal B, D'Souza A, Pasquini M, Saber W, Fenske TS, Moss RB, et al. DAS181 Treatment of Severe Parainfluenza Virus 3 Pneumonia in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients Requiring Mechanical Ventilation. *Case reports in medicine*. 2016;2016:8503275.
134. Esposito S, Principi N. Oseltamivir for influenza infection in children: risks and benefits. *Expert review of respiratory medicine*. 2016;10(1):79-87.
135. Waghorn SL, Goa KL. Zanamivir. *Drugs*. 1998;55(5):721-5; discussion 5-7.
136. McLaughlin MM, Skoglund EW, Ison MG. Peramivir: an intravenous neuraminidase inhibitor. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2015;16(12):1889-900.
137. Kikuchi T, Watanabe A. Baloxavir heralds a new era in influenza virus biology. *Respiratory investigation*. 2018.
138. Alves Galvao MG, Rocha Crispino Santos MA, Alves da Cunha AJ. Amantadine and rimantadine for influenza A in children and the elderly. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2014(11):Cd002745.
139. Keyaerts E, Li S, Vijgen L, Rysman E, Verbeeck J, Van Ranst M, et al. Antiviral activity of chloroquine against human coronavirus OC43 infection in newborn mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(8):3416-21.
140. Kono M, Tatsumi K, Imai AM, Saito K, Kuriyama T, Shirasawa H. Inhibition of human coronavirus 229E infection in human epithelial lung cells (L132) by chloroquine: involvement of p38 MAPK and ERK. *Antiviral research*. 2008;77(2):150-2.
141. Agostini ML, Andres EL, Sims AC, Graham RL, Sheahan TP, Lu X, et al. Coronavirus Susceptibility to the Antiviral Remdesivir (GS-5734) Is Mediated by the Viral Polymerase and the Proofreading Exoribonuclease. 2018;9(2).
142. Schildgen O. Human bocavirus: lessons learned to date. *Pathogens (Basel, Switzerland)*. 2013;2(1):1-12.
143. Kitanovski L, Kopriva S, Pokorn M, Dolnicar MB, Rajic V, Stefanovic M, et al. Treatment of Severe Human Metapneumovirus (hMPV) Pneumonia in an Immunocompromised Child With Oral Ribavirin and IVIG. 2013;35(7):e311-e3.
144. Sun L, Meijer A, Froeyen M, Zhang L, Thibaut HJ, Baggen J, et al. Antiviral Activity of Broad-Spectrum and Enterovirus-Specific Inhibitors against Clinical Isolates of Enterovirus D68. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(12):7782-5.
145. Schmidt AC. Progress in respiratory virus vaccine development. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2011;32(4):527-40.
146. Kuschner RA, Russell KL, Abuja M, Bauer KM, Faix DJ, Hait H, et al. A phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of the live, oral adenovirus type 4 and type 7 vaccine, in U.S. military recruits. *Vaccine*. 2013;31(28):2963-71.
147. Sridhar S, Brokstad KA, Cox RJ. Influenza Vaccination Strategies: Comparing Inactivated and Live Attenuated Influenza Vaccines. *Vaccines*. 2015;3(2):373-89.
148. Halsey NA, Talaat KR, Greenbaum A, Mensah E, Dudley MZ, Proveaux T, et al. The safety of influenza vaccines in children: An Institute for Vaccine Safety white paper. *Vaccine*. 2015;33 Suppl 5:F1-f67.
149. Obavijest o početku cijepljenja protiv sezonske gripe. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-zarazne-bolesti/obavijest-o-pocetku-cijepljenja-protiv-sezonske-gripe-2/2018>.
150. Tisa V, Barberis I, Faccio V, Paganino C, Trucchi C, Martini M, et al. Quadrivalent influenza vaccine: a new opportunity to reduce the influenza burden. *Journal of preventive medicine and hygiene*. 2016;57(1):E28-33.

151. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2018-2019 northern hemisphere influenza season. Dostupno na: https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2018_19_north/en/2018.
152. Live attenuated influenza vaccine for children. Drug and therapeutics bulletin. 2017;55(10):114-7.
153. Belongia EA, Skowronski DM, McLean HQ, Chambers C, Sundaram ME, De Serres G. Repeated annual influenza vaccination and vaccine effectiveness: review of evidence. Expert review of vaccines. 2017;16(7):1-14.
154. Resch B. Product review on the monoclonal antibody palivizumab for prevention of respiratory syncytial virus infection. Human vaccines & immunotherapeutics. 2017;13(9):2138-49.
155. Panda S, Mohakud NK, Suar M, Kumar S. Etiology, seasonality, and clinical characteristics of respiratory viruses in children with respiratory tract infections in Eastern India (Bhubaneswar, Odisha). Journal of medical virology. 2017;89(3):553-8.
156. Eifan SA, Hanif A, AlJohani SM, Atif M. Respiratory Tract Viral Infections and Coinfections Identified by Anyplex II RV16 Detection Kit in Pediatric Patients at a Riyadh Tertiary Care Hospital. BioMed research international. 2017;2017:1928795.
157. Ljubin-Sternak S, Marijan T, Ivkovic-Jurekovic I, Cepin-Bogovic J, Gagro A, Vranes J. Etiology and Clinical Characteristics of Single and Multiple Respiratory Virus Infections Diagnosed in Croatian Children in Two Respiratory Seasons. Journal of pathogens. 2016;2016:2168780.
158. Finianos M, Issa R, Curran MD, Afif C, Rajab M, Irani J, et al. Etiology, seasonality, and clinical characterization of viral respiratory infections among hospitalized children in Beirut, Lebanon. Journal of medical virology. 2016;88(11):1874-81.
159. Ge X, Guo Y, Chen J, Hu R, Feng X. Epidemiology and Seasonality of Respiratory Viruses Detected from Children with Respiratory Tract Infections in Wuxi, East China. Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research. 2018;24:1856-62.
160. Stralioatto SM, Siqueira MM, Muller RL, Fischer GB, Cunha ML, Nestor SM. Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2002;35(4):283-91.
161. Bicer S, Giray T, Çöl D, Erdağ GÇ, Vitrinel A, Gürol Y, et al. Virological and clinical characterizations of respiratory infections in hospitalized children. Italian journal of pediatrics. 2013;39:22-.
162. Luchsinger V, Ampuero S, Palomino MA, Chnaiderman J, Levican J, Gaggero A, et al. Comparison of virological profiles of respiratory syncytial virus and rhinovirus in acute lower tract respiratory infections in very young Chilean infants, according to their clinical outcome. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2014;61(1):138-44.
163. Kantola K, Sadeghi M, Antikainen J, Kirveskari J, Delwart E, Hedman K, et al. Real-time quantitative PCR detection of four human bocaviruses. Journal of clinical microbiology. 2010;48(11):4044-50.
164. Kurskaya O, Ryabichenko T, Leonova N, Shi W, Bi H, Sharshov K, et al. Viral etiology of acute respiratory infections in hospitalized children in Novosibirsk City, Russia (2013 – 2017). PLOS ONE. 2018;13(9):e0200117.
165. Ambrosioni J, Bridevaux PO, Wagner G, Mamin A, Kaiser L. Epidemiology of viral respiratory infections in a tertiary care centre in the era of molecular diagnosis, Geneva, Switzerland, 2011-2012. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2014;20(9):O578-84.
166. Scotta MC, Chakr VC, de Moura A, Becker RG, de Souza AP, Jones MH, et al. Respiratory viral coinfection and disease severity in children: A systematic review and meta-analysis. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2016;80:45-56.
167. Falagas ME, Mourtzoukou EG, Vardakas KZ. Sex differences in the incidence and severity of respiratory tract infections. Respiratory medicine. 2007;101(9):1845-63.

168. Tregoning JS, Schwarze J. Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clinical microbiology reviews*. 2010;23(1):74-98.
169. Wang H, Zheng Y, Deng J, Wang W, Liu P, Yang F, et al. Prevalence of respiratory viruses among children hospitalized from respiratory infections in Shenzhen, China. *Virology journal*. 2016;13:39-.
170. Al-Ayed MS, Asaad AM, Qureshi MA, Ameen MS. Viral etiology of respiratory infections in children in southwestern Saudi Arabia using multiplex reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Saudi medical journal*. 2014;35(11):1348-53.
171. Pierangeli A, Gentile M, Di Marco P, Pagnotti P, Scagnolari C, Trombetti S, et al. Detection and typing by molecular techniques of respiratory viruses in children hospitalized for acute respiratory infection in Rome, Italy. *Journal of medical virology*. 2007;79(4):463-8.
172. Chen J, Hu P, Zhou T, Zheng T, Zhou L, Jiang C, et al. Epidemiology and clinical characteristics of acute respiratory tract infections among hospitalized infants and young children in Chengdu, West China, 2009-2014. *BMC pediatrics*. 2018;18(1):216-.
173. Tran DN, Trinh QD, Pham NT, Vu MP, Ha MT, Nguyen TQ, et al. Clinical and epidemiological characteristics of acute respiratory virus infections in Vietnamese children. *Epidemiology and infection*. 2016;144(3):527-36.
174. Tran DN, Trinh QD, Pham NT, Pham TM, Ha MT, Nguyen TQ, et al. Human rhinovirus infections in hospitalized children: clinical, epidemiological and virological features. *Epidemiology and infection*. 2016;144(2):346-54.
175. Goddard NL, Cooke MC, Gupta RK, Nguyen-Van-Tam JS. Timing of monoclonal antibody for seasonal RSV prophylaxis in the United Kingdom. *Epidemiology and infection*. 2007;135(1):159-62.
176. Hall CB, Simoes EA, Anderson LJ. Clinical and epidemiologic features of respiratory syncytial virus. *Current topics in microbiology and immunology*. 2013;372:39-57.
177. Mlinarić-Galinović G, Jović M, Knezović I, Tešović G, Čepin-Bogović J, Ivković-Jureković I i sur. Epidemiološke osobine infekcija respiratornim sincicijskim virusom tijekom 2009. i 2010. godine u Zagrebu i Zagrebačkoj županiji. *Medicina Fluminensis*, 48 (1).79-84.
178. Achten NB, Wu P, Bont L, Blanken MO, Gebretsadik T, Chappell JD, et al. Interference Between Respiratory Syncytial Virus and Human Rhinovirus Infection in Infancy. *The Journal of infectious diseases*. 2017;215(7):1102-6.
179. Royston L, Tapparel C. Rhinoviruses and Respiratory Enteroviruses: Not as Simple as ABC. *Viruses*. 2016;8(1):16.
180. Mlinarić Galinović G, Šulentić Tomić G, Sim R, Markovinović L, Tešović G, Čepin Bogović J. Akutne dišne infekcije u djece uzrokovane adeno i parainfluenca virusima. *Paediatrica Croatica*, Vol 57 No 3. 2013.
181. Anestad G. Surveillance of respiratory viral infections by rapid immunofluorescence diagnosis, with emphasis on virus interference. *Epidemiology and infection*. 1987;99(2):523-31.
182. Greer RM, McErlean P, Arden KE, Faux CE, Nitsche A, Lambert SB, et al. Do rhinoviruses reduce the probability of viral co-detection during acute respiratory tract infections? *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2009;45(1):10-5.
183. Kuzman I. Influenca: klinička slika bolesti i komplikacije. *Medicus*, 20 (1_Influenca). 2011:25-32.
184. Nacionalni referentni centar za gripu. Tjedno izvješće o kretanju influence u Hrvatskoj. Dostupno na: http://gripa.hr/content/szo/tjedno_izvjesce.aspx.
185. European Centre for Disease Prevention and Control. Influenza in Europe, summary of the season 2017–18. Dostupno na: <https://ecdc.europa.eu/en/seasonal-influenza/season-2017-18>.
186. Zhang S-f, Tuo J-l, Huang X-b, Zhu X, Zhang D-m, Zhou K, et al. Epidemiology characteristics of human coronaviruses in patients with respiratory infection symptoms and phylogenetic analysis of HCoV-OC43 during 2010-2015 in Guangzhou. *PLOS ONE*. 2018;13(1):e0191789.

187. Dare RK, Fry AM, Chittaganpitch M, Sawanpanyalert P, Olsen SJ, Erdman DD. Human coronavirus infections in rural Thailand: a comprehensive study using real-time reverse-transcription polymerase chain reaction assays. *J Infect Dis.* 2007;196(9):1321-8.
188. Jevšnik M, Uršič T, Žigon N, Lusa L, Krivec U, Petrovec MJBID. Coronavirus infections in hospitalized pediatric patients with acute respiratory tract disease. *2012;12(1):365.*
189. Principi N, Bosis S, Esposito S. Effects of coronavirus infections in children. *Emerging infectious diseases.* 2010;16(2):183-8.
190. Dijkman R, Jebbink MF, Gaunt E, Rossen JW, Templeton KE, Kuijpers TW, et al. The dominance of human coronavirus OC43 and NL63 infections in infants. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2012;53(2):135-9.
191. Lasare N, Gopalkrishna V. Molecular epidemiology and clinical severity of Human Bocavirus (HBoV) 1-4 in children with acute gastroenteritis from Pune, Western India. *Journal of medical virology.* 2017;89(1):17-23.
192. Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell SF, et al. Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J Infect Dis.* 2007;195(7):1038-45.
193. Ahn JG, Choi SY, Kim DS, Kim KH. Human bocavirus isolated from children with acute respiratory tract infections in Korea, 2010-2011. *Journal of medical virology.* 2014;86(12):2011-8.
194. Al-Rousan HO, Meqdam MM, Alkhateeb A, Al-Shorman A, Qaisy LM, Al-Moqbel MS. Human bocavirus in Jordan: prevalence and clinical symptoms in hospitalised paediatric patients and molecular virus characterisation. *Singapore medical journal.* 2011;52(5):365-9.
195. Chuang CY, Kao CL, Huang LM, Lu CY, Shao PL, Lee PI, et al. Human bocavirus as an important cause of respiratory tract infection in Taiwanese children. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi.* 2011;44(5):323-7.
196. Choi S-H, Hee Shin S, Soo Kim H. Respiratory Enterovirus Infections and Other Respiratory Virus Coinfections in Children 2016.
197. Pons-Salort M, Oberste MS, Pallansch MA, Abedi GR, Takahashi S, Grenfell BT, et al. The seasonality of nonpolio enteroviruses in the United States: Patterns and drivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2018;115(12):3078.
198. García-García ML, Calvo C, Martín F, Pérez-Breña P, Acosta B, Casas I. Human metapneumovirus infections in hospitalised infants in Spain. *Archives of disease in childhood.* 2006;91(4):290-5.
199. Guido M, Quattrocchi M, Campa A, Zizza A, Grima P, Romano A, et al. Human metapneumovirus and human bocavirus associated with respiratory infection in Apulian population. *Virology.* 2011;417(1):64-70.
200. Schildgen V, van den Hoogen B, Fouchier R, Tripp RA, Alvarez R, Manoha C, et al. Human Metapneumovirus: lessons learned over the first decade. *Clinical microbiology reviews.* 2011;24(4):734-54.
201. Ljubin Sternak S, Vilibić Cavlek T, Falsey AR, Walsh EE, Mlinarić Galinović G. Serosurvey of human metapneumovirus infection in Croatia. *Croatian medical journal.* 2006;47(6):878-81.

10. ŽIVOTOPIS

Ivana Kale rođena je 21.6.1985. godine u Šibeniku u kojem pohađa osnovnu i srednju školu. Paralelno sa srednjoškolskim obrazovanjem u Gimnaziji Antuna Vrančića pohađa i Glazbenu školu Ivana Lukačića, smjer solo pjevanje. Od 1999. do 2003. godine članica je i solistica Šibenskog pjevačkog društva „Kolo“. Bavi se skladanjem i pisanjem poezije. 2003. godine objavljuje zbirku poezije „Uvala moga djetinjstva“.

Iste godine upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Od akademske godine 2013./2014. do danas članica je Pjevačkog zbora studenata Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu „Lege artis“. Za sudjelovanje u radu zbora, u ak. god. 2017./2018. dobiva Posebnu dekanovu nagradu za društveno korisni doprinos Medicinskom fakultetu.

Područja interesa u medicini su joj klinička mikrobiologija i infektologija. Aktivno se služi engleskim i njemačkim jezikom. Majka je sina rođenog 2007. godine.