

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA KOTNIK

**DOKAZOVANJE VIRUSNIH OKUŽB Z METODO VERIŽNE REAKCIJE S  
POLIMERAZO PRI STAROSTNIKIH Z OKUŽBO DIHAL**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA KOTNIK

**DETECTION OF RESPIRATORY VIRUSES BY POLYMERASE CHAIN  
REACTION IN ELDERLY WITH RESPIRATORY INFECTION**

Ljubljana, 2015

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

---

Magistrsko nalogo sem opravljala na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo pod mentorstvomizr. prof. dr. Matjaža Jerasa in somentorstvomizr. prof. dr. Miroslava Petrovca.

### **Zahvala**

Vsaka pot do cilja je lažja v dobri družbi. Hvala vsem, ki ste mi jo pomagali prehoditi do konca. Posebna zahvala dr. Tini Uršič za nasvete in pomoč v laboratoriju.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvomizr. prof. dr. Matjaža Jerasa in somentorstvomizr. prof. dr. Miroslava Petrovca.

Študentov lastoročni podpis

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

---

## Kazalo

<b>KAZALO SLIK</b> .....	<b>IV</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b> .....	<b>IV</b>
<b>POVZETEK</b> .....	<b>V</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>VI</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Respiratorni virusi .....	1
1.2. Respiratorni virusi pri starejših.....	5
1.2. Zaščita proti okužbam z respiratornimi virusi in okužbe zdravstvenih delavcev .....	10
1.3. Laboratorijska diagnostika virusnih povzročiteljev bolezni dihal .....	12
<b>2. NAMEN DELA</b> .....	<b>15</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>17</b>
3.1. Preiskovanci in vzorci .....	17
3.2. Metode dela.....	17
3.2.1. Osamitev nukleinskih kislin .....	18
3.2.2. Pomnoževanje virusnih nukleinskih kislin z metodo RT-PCR v realnem času .....	19
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>30</b>
4.1. Število opravljenih analiz v zadnjih petih letih .....	30
4.2. Lastnosti izbranih vzorcev .....	31
4.2.1. Porazdelitev bolnikov glede na spol in povprečno starost .....	31
4.2.2. Pošiljatelji vzorcev .....	32
4.2.3. Kužnine .....	33
4.3. Pozitivni vzorci .....	33

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

---

4.4.	Metode za analiziranje izbranih vzorcev.....	34
4.5.	Sezonska porazdelitev virusov po mesecih.....	36
4.6.	Sočasne virusne okužbe .....	37
<b>5.</b>	<b>RAZPRAVA.....</b>	<b>39</b>
5.1.	Naraščanje števila molekularnih analiz za dokazovanje virusnih povzročiteljev okužb dihal pri starejših.....	39
5.2.	Lastnosti izbranih vzorcev .....	39
5.3.	Respiratorni virusi pri starejših osebah .....	41
5.4.	Prisotnost respiratornih virusov pri osebah s sumom na gripo.....	42
5.5.	Sezonska porazdelitev virusov po mesecih.....	43
5.6.	Sočasne virusne okužbe .....	44
5.7.	Stik med dvema generacijama.....	44
5.8.	Pomanjkljivosti naše raziskave .....	45
<b>6.</b>	<b>SKLEP .....</b>	<b>46</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>47</b>

## Kazalo slik

<b>SLIKA 1:</b> PRIKAZ ŠTEVILA VZORCEV IN ŠTEVILA BOLNIKOV (PRIMARNA OS) IN PRIKAZ ODSOTKA BOLNIKOV, KI SO BILI TESTIRANI VEČKRAT (SEKUNDARNA OS) V OBDOBJU OD LETA 2009-2014.	30
<b>SLIKA 2:</b> PORAZDELITEV VZORCEV GLEDE NA SPOL.	31
<b>SLIKA 3:</b> PORAZDELITEV ANALIZIRANIH VZORCEV GLEDE NA POŠILJATELJA.	32
<b>SLIKA 4:</b> PORAZDELITEV ANALIZIRANIH VZORCEV GLEDE NA VRSTO KUŽNINE.	33
<b>SLIKA 5:</b> ŠTEVILO POZITIVNIH VZORCEV ZA POSAMEZNI VIRUS V % GLEDE NA VSE POZITIVNE VIRUSE (PRIMARNA OS) IN ABSOLUTNO ŠTEVILO POZITIVNIH VZORCEV ZA POSAMEZEN VIRUS (SEKUNDARNA OS).	34
<b>SLIKA 6:</b> PRIKAZ POZITIVNIH VZORCEV ZA POSAMEZNO PREISKAVO V % GLEDE NA VSE TESTIRANE VZORCE S POSAMEZNO PREISKAVO.	36
<b>SLIKA 7:</b> PRIKAZ POZITIVNIH VZORCEV ZA VIRUSE INFLUENZA A, RESPIRATORNI SINCICIJSKI VIRUS IN ČLOVEŠKI METAPNEVMOVIRUS V POSAMEZNEM MESECU.	37

## Kazalo preglednic

<b>PREGLEDNICA I:</b> PRIKAZ ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV IN OLIGONUKLEOTIDNIH SOND, KI SO BILI UPORABLJENI PRI RT-PCR V REALNEM ČASU ZA DOKAZ RESPIRATORNIH VIRUSOV. F: POZITIVNO USMERJENI OLIGONUKLEOTIDNI ZAČETNIK (ANGL. <i>FORWARD PRIMER</i> ), R: NEGATIVNO USMERJENI OLIGONUKLEOTIDNI ZAČETNIK (ANGL. <i>REVERSE PRIMER</i> ), P: OLIGONUKLEOTIDNA SONDA (ANGL. <i>PROBE</i> ).	22
<b>PREGLEDNICA II:</b> REAGENTI ZA REAKCIJSKE MEŠANICE.	25
<b>PREGLEDNICA III:</b> PRIKAZ STOPENJ REAKCIJE RT-PCR V REALNEM ČASU ZA DOKAZ RESPIRATORNIH VIRUSOV.	29
<b>PREGLEDNICA IV:</b> PRISOTNOST RESPIRATORNIH VIRUSOV PRI BOLNIKI, STAREJŠIH OD 65 LET.	34
<b>PREGLEDNICA V:</b> PRISOTNOST RESPIRATORNIH VIRUSOV GLEDE NA TO, ALI SO BILI VZORCI POSLANI NA CELOTNI PANEL RESPIRATORNIH VIRUSOV (PANEL RV) OZ. SO BILI POSLANI ZARADI SUMA NA OKUŽBO Z VIRUSI INFLUENCE (INF).	35
<b>PREGLEDNICA VI:</b> ŠTEVILO SOČASNIH OKUŽB PRI VZORCIH, ANALIZIRANIH S PANELOM RV.	38
<b>PREGLEDNICA VII:</b> ŠTEVILO SOČASNIH OKUŽB PRI VZORCIH, POSLANIH ZARADI SUMA NA OKUŽBO Z VIRUSI INF A IN B.	38
<b>PREGLEDNICA VIII:</b> POVPREČNE VREDNOSTI CT ZA POSAMEZEN VIRUS.	38

## **Povzetek**

Z razvojem molekularnih metod so ugotovili, da lahko poleg virusov influence tudi drugi respiratorni virusi povzročajo resna in življenjsko ogrožajoča stanja pri starostnikih. V okviru magistrskega dela smo izbrali vzorce oseb, starejših od 65 let, ki so bili testirani na analizo prisotnosti nukleinskih kislin respiratornih virusov v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij (Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Fakulteta za medicino, Univeza v Ljubljani), med oktobrom 2013 in marcem 2014. Del vzorcev so že predhodno testirali na prisotnost nukleinskih kislin celotnega panela respiratornih virusov, pri določenih bolnikih pa so zdravniki na podlagi kliničnih znakov sumili na gripo, zato so v laboratoriju preverili le prisotnost nukleinskih kislin virusov influence. Z molekularno metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času smo preverili prisotnost respiratornih virusov, ki predhodno niso bili testirani – respiratorni sincicijski virus, človeški metapnevmovirus, človeški rinovirusi, človeški koronavirusi, virusi parainfluence 1-3, človeški bokavirus, adenovirusi in enterovirusi. Ugotovili smo, da se pri starostnikih, ki so bili sprejeti v bolnišnico, najpogosteje pojavljajo virusi influence A (54,89%), sledijo respiratorni sincicijski virus (14,43%), človeški metapnevmovirus (8,62%), človeški rinovirusi (7,3%), človeški koronavirusi (5,30%), virusi parainfluence 1-3 (3,81%), enterovirusi (2,49%), človeški bokavirus (2,32%) in adenovirusi (0,33%). Adenovirusi, človeški bokavirus in enterovirusi so pri starostnikih večinoma prisotni skupaj z drugimi virusi, redko pa povzročajo samostojno okužbo. Skoraj vsak peti vzorec, poslan na analizo zaradi suma na gripo, je bil pozitiven na enega izmed drugih testiranih respiratornih virusov. Sklepamo, da so pri starostnikih klinični znaki neznačilni, zato sum, da gre za okužbo z virusi influence, pogosto ni potrjen. Okužbe, ki jih povzročajo virusi influence, respiratorni sincicijski virus in človeški metapnevmovirus, imajo podoben potek bolezni in podobne klinične znake, epidemije pa potekajo sočasno. Laboratorijska testiranja omogočajo pravilno diagnozo, ki pripomore k ustreznemu zdravljenju, prepreči prenos virusov na ostale bolnike in zdravstveno osebje ter nepotrebno zdravljenje z antibiotiki.

Ključne besede: Respiratorni virusi, starejši, RT-PCR v realnem času, laboratorijska diagnostika.

## Summary

The development of molecular methods has demonstrated that both influenza viruses and other respiratory viruses contracted by elderly people can lead to serious and life-threatening conditions. As part of this master's thesis we collected samples from persons aged over 65 which were sent to the Laboratory for Diagnostics of Viral Infections (Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana) between October 2013 and March 2014 for analyses of nucleic acids of respiratory viruses. Some of the samples had been tested in advance to confirm the presence of nucleic acids of the entire respiratory virus panel. In some cases the clinical signs seemed to be consistent with the flu and the laboratory only tested the samples for the presence of nucleic acids of influenza viruses. The polymerase chain reaction in real time was used to determine the presence of other respiratory viruses that have not been tested before – the respiratory syncytial virus, human rhinoviruses, human coronaviruses, human metapneumovirus, human bocavirus, human parainfluenza viruses 1-3, adenoviruses and enteroviruses. We determined that the most common viruses found in hospitalized elderly people are influenza A viruses (54,89%), followed by respiratory syncytial virus (14,43%), human metapneumovirus (8,62%), human rhinoviruses (7,3%), human coronaviruses (5,30%), human parainfluenza viruses 1-3 (3,81%), enteroviruses (2,49%), human bocavirus (2,32%) and adenoviruses (0,33%). Adenoviruses, human bocavirus and enteroviruses in elderly people are mostly present as coinfections and rarely cause primary infections. Almost every fifth sample to be analysed on suspicion of the flu proved positive to one of the remaining respiratory viruses. Infections caused by the presence of influenza viruses, respiratory syncytial virus and human metapneumovirus have similar clinical signs and their epidemics occur at the same time. Laboratory diagnostics enable accurate diagnosis which allows adequate treatment, prevents virus transmission to other patients and medical staff and helps avoid unnecessary antibiotic treatment.

Key words: Respiratory viruses, elderly, real-time RT-PCR, laboratory diagnostics.



Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

## Seznam okrajšav

AdV	Adenovirusi
BAL	Bronhoalveolarna lavaža
Ct	Prag fluorescence (angl. <i>threshold cycle</i> )
ddH <sub>2</sub> O	Deionizirana voda
DNA	Deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DSO	Dom starejših občanov
EV	Enterovirusi
F	Pozivno usmerjeni oligonukleotidni začetnik (angl. <i>forward primer</i> )
HA	Hemaglutinin
HBoV	Človeški bokavirus
hCoV	Človeški koronavirusi
hMPV	Človeški metapnevmovirus
hRV	Človeški rinovirusi
Inf A in B	Virusi influence tipa A in B
KOPB	Kronična obstruktivna pljučna bolezen (angl. <i>COPD – chronic obstructive pulmonary disease</i> )
NA	Nevraminidaza
P	Oligonukleotidna sonda (angl. <i>probe</i> )
PCR	Verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PIV	Virusi parainfluence
R	Negativno usmerjeni oligonukleotidni začetnik (angl. <i>reverse primer</i> )
RNA	Ribonukleinska kislina (angl. <i>ribonucleic acid</i> )
RSV	Respiratorni sincicijski virus
RT-PCR	Verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (angl. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> )
RV	Respiratorni virus
SARS	Sindrom akutne respiratorne stiske (angl. <i>severe acute respiratory syndrome</i> )

## 1. Uvod

Okužbe dihal so ene izmed najpogostejših boleznih pri ljudeh vseh starosti. Pljučnica, gripa in gripi podobne bolezni (angl. *ILI – Influenza like illnesses*) so šesti najpogostejši vzrok smrti v Združenih državah Amerike, letno pa naj bi za posledicami teh boleznih umrlo več kot 45.000 ljudi. Pri otrocih, mlajših od pet let, so okužbe dihal drugi najpogostejši vzrok smrti (1). Okužbe dihal povzročajo širok spekter mikroorganizmov, najpogosteje virusi. Med najpogostejše respiratorne viruse prištevamo viruse influence A in B (v nadaljevanju Inf A in B), respiratorni sincicijski virus (RSV), človeški metapneumovirus (hMPV), človeške koronavirus (hCoV), človeške rinoviruse (hRV), viruse parainfluence (PIV), človeški bokavirus (HBoV), adenoviruse (AdV) in enteroviruse (EV). V zadnjih letih so z razvojem molekularnih metod odkrili nove viruse, med drugim tudi človeški metapneumovirus, bokavirus in koronavirus (SARS, NL63, HKU1) (2).

### 1.1. Respiratorni virusi

Respiratorni virusi najpogosteje povzročajo blažje okužbe zgornjih dihal, simptomi in znaki okužbe pa so kašelj, boleče žrelo, izcedek iz nosu, povišana telesna temperatura, glavobol in bolečine v mišicah. Pri ogroženih skupinah, kamor uvrščamo novorojenčke, otroke, nosečnice, odrasle s srčnimi in pljučnimi boleznimi ter starostnike, lahko povzročajo resne težave, ki pogosto potrebujejo bolnišnično zdravljenje, lahko pa so tudi smrtno nevarne. Na severni polobli so virusne okužbe dihal pogostejše med novembrom in marcem (3). Epidemije, ki jih povzročajo respiratorni virusi, so odvisne od temperatur in relativne vlažnosti zraka. Več raziskav je povežalo padec temperatur in zvišano relativno vlažnost s povečanim pojavljanjem virusnih okužb dihal (4, 5).

**Virusi influence (Inf A in B)** spadajo v družino ortomiksovirusov in imajo segmentiran enovijačni genom RNA negativne polarosti. Med človeške viruse influence prištevamo viruse influence A, B in C. Virusi influence A se delijo v podskupine glede na sestavo površinskih glikoproteinov nevraminidaze (NA) in hemaglutinina (HA). Virusi influence A redno povzročajo večje epidemije, saj so genetsko nestabilni, v njih prihaja do mutacij in prerazporeditve genskih zaporedij v genomu. S spremembo v HA in NA nastajajo vedno

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

---

novi, antigensko različni virusi, ki se uspešno izogibajo imunskemu odzivu gostitelja. Virusi influence B povzročajo epidemije manjših razsežnosti, virusi influence tipa C pa redko povzročajo blažje okužbe zgornjih dihal, zato niso vključeni v rutinsko laboratorijsko diagnostiko (3, 6). V zadnjih stotih letih so bili pri človeku v večjem obsegu prisotni trije podtipi: H1N1, H2N2 in H3N2. Nova oblika H1N1, prenešena iz svinje na človeka, pa je povzročila pandemijo gripe v letu 2009 (7).

Med splošne sistemske simptome in znake gripe prištevamo povišano telesno temperaturo, utrujenost, glavobol, bolečine v mišicah in pomanjkanje teka. Znaki okužbe dihal so kašelj, boleče žrelo, izcedek iz nosu in hripavost. Eden izmed zapletov okužbe z virusi influence je pljučnica, ki se pogosteje razvije pri starejših in imunsko oslabljenih posameznikih, vodi pa v življenjsko ogrožujoča stanja, kot so hipoksija, težko dihanje in cianoza. Pljučnica je pogost vzrok obolevnosti in smrtnosti pri starejših (3, 8, 9).

**Respiratorni sincicijski virus (RSV)** sodi v družino paramiksovirusov. Ima veliko ikozaedrično kapsido in genom RNA negativne polarnosti (6). Obstajata dva tipa virusa, in sicer tip A in tip B. Običajno prevladuje tip A, ki naj bi po nekaterih raziskavah povzročal resnejše simptome kot tip B, vendar zadnje ugotovitve na tem področju tega niso potrdile (10). RSV povzroča okužbe dihal s težjo klinično sliko poteka bolezni pri bronhiolitisu ali pljučnici. Znana so predvsem obolenja na pediatričnih oddelkih, težak potek bolezni pa pogosteje prizadane prezgodaj rojene otroke in otroke s srčnimi in pljučnimi osnovnimi boleznimi. Virus se prenaša kapljično, s telesnim stikom in predvsem s kontaminiranimi predmeti, zato so bolnišnične epidemije pogoste (3, 11).

V družino paramiksovirusov, za katero je značilna negativno polarna molekula RNA, uvrščamo tudi druge pomembne virusne povzročitelje okužb dihal - viruse parainfluence in človeški metapnevmovirus.

**Človeški metapnevmovirus (hMPV)** so odkrili leta 2001. Kljub poznemu odkritju so prisotnost specifičnih protiteles retrogradno odkrili v vzorcih seruma, odvzetega že leta 1958 (12). Dobro desetletje po njihovem odkritju potekajo obsežne raziskave, ki naj bi osvetlile patogenezo tovrstnih okužb. Znano je, da epidemije, ki jih povzroča hMPV, navadno sledijo tistim, ki jih povzroča RSV. Okužijo se lahko ljudje vseh starosti,

najpogosteje otroci med 6. in 12. mesecem starosti (13). Virus je prisoten po vsem svetu. Poznana sta dva genotipa, A in B. Klinični znaki se ne razlikujejo od okužb, ki jih povzročajo ostali respiratorni virusi. HMPV povzroča okužbe zgornjih dihal, okužba spodnjih dihal pa se najpogosteje izraža kot bronhiolitis ali pljučnica (14). Raziskava na Nizozemskem je pokazala, da se otroci do petega leta starosti vsaj enkrat okužijo s človeškim metapneumovirusom, možne so ponovne okužbe, ki so pogostejše pri osebah z osnovnimi (nevrološkimi, srčnimi in pljučnimi) ter drugimi boleznimi, ki zmanjšajo imunsko odpornost bolnika (12, 13, 15).

**Virusi parainfluence (PIV)** vključujejo tipe od 1 do 4. PIV-1 in PIV-2 naj bi najpogosteje povzročala laringotraheobronhitis oziroma krup (dušenje zaradi vnetja sluznice, sapnika in sapnic) pri otrocih ter okužbe zgornjih dihal pri vseh starostnih skupinah. PIV-3 naj bi povzročal resnejša obolenja spodnjih dihal pri otrocih (2). PIV-4 pa je na področju Evrope redkeje dokazan, njegova epidemiologija ostaja v veliki meri neznana in ni vključen v rutinsko laboratorijsko diagnostiko (3). Virusi parainfluence naj bi po nekaterih podatkih najpogosteje krožili pozno pomladi, kasneje kot hMPV in RSV (2).

**Enterovirusi (EV)** sodijo v družino pikornavirusov, kamor uvrščamo majhne viruse brez ovojnice, njihov genom je pozitivno polarna enovijačna molekula RNA. Enterovirusi se razmnožujejo v dihalih in prebavilih. Ena od kliničnih oblik je blaga okužba dihal. Poleg prehladnih obolenj lahko povzročajo tudi nespecifična vročinska stanja, konjunktivitis, paralize ali celo kronična obolenja, kot sta dermatomiozitis in sladkorna bolezen. Tudi pri okužbah z enterovirusi so najbolj ogroženi majhni otroci in imunsko oslabljeni posamezniki, potek bolezni pa je pri teh osebah resnejši. Pomembno je, da enterovirusov ne zamenjujemo z enteritičnimi virusi (rotavirusi, norovirusi), ki praviloma povzročajo le okužbe prebavil (3).

V družino pikornavirusov poleg enterovirusov uvrščamo še človeške rinoviruse (hRV) in parehoviruse. Mednarodna komisija za taksonomijo virusov je hRV uvrstila v rod enterovirusov (2).

**Človeške rinoviruse (hRV)** delimo v tri vrste, in sicer A, B in C. Rinovirusi so najpogostejši povzročitelji prehladnih obolenj pri osebah vseh starosti. Skoraj tretjina

okužb poteka brez simptomov, ogrožena skupina pa so otroci. Okužbe se pojavljajo skozi vse leto, na območju zmernega klimatskega pasu opazamo povečano število obolelih zgodaj jeseni in spomladi. Okužbe s hRV se kažejo kot prehlad s kihanjem, zamašenim nosom, prisotnostjo izcedka iz nosu ter kašlja in glavobola (3). Čeprav hRV redko povzročajo resnejša obolenja, pa so znane okužbe spodnjih dihal, poslabšanje osnovnih bolezni, predvsem kronične obstruktivne pljučne bolezni (KOPB) in astme (2). Po nekaterih raziskavah naj bi bili hRV pogosto prisotni tudi pri posameznikih brez simptomov, kar pripisujejo njihovemu počasnejšemu zmanjševanju pomnoževanja RNA v primerjavi z ostalimi virusi (16).

**Človeški koronavirusi (hCoV)** so razširjeni po vsem svetu. V prvi vrsti povzročajo prehlade v zimskih in pomladnih mesecih (17). So veliki virusi z nesegmentirano pozitivno polarno molekulo RNA (6). Do leta 2003 je veljalo prepričanje, da koronavirusi povzročajo le nenevarne prehlade. Nato pa je v tem letu prišlo do epidemije SARSa, v naslednjih dveh letih pa so odkrili še dva nova koronavirusa – NL63 in HKU1 (17, 18, 19). Leta 2012 so identificirali tudi koronavirus MERS, ki je zaenkrat povzročal okužbe predvsem na arabskem polotoku (20). Danes je znano, da koronavirusi povzročajo tako blažja kot težja obolenja dihal ljudi in živali. Enako kot pri drugih povzročiteljih prehlada je klinična slika lahko zelo raznolika - nahod, vnetje žrela, kašelj, povišana telesna temperatura in glavobol. Lahko pa okužba napreduje v bronhiolitis in virusno pljučnico. Višje koncentracije virusa naj bi imeli mlajši otroci (21). Koronavirusi lahko povzročijo bolnišnične epidemije, znane pa so tudi epidemije pri vojaških novincih, oskrbovancih v domovih starejših občanov (DSO) in hospitaliziranih odraslih s kroničnimi obolenji (17).

**Človeški bokavirus (HBoV)** so odkrili leta 2005. Uvrščamo ga v družino parvovirusov, ki so majhni goli virusi z enovijačno molekulo DNA (6). Človeški bokavirus povzroča okužbe zgornjih in spodnjih dihal ter okužbe prebavil, najpogosteje pri majhnih otrocih. Glede na izsledke je HBoV tretji najpogostejši povzročitelj okužb dihal pri majhnih otrocih v Sloveniji, takoj za hRV in RSV. Prenaša se kapljično, z rokami, preko površin, možen pa je tudi fekalno-oralni prenos. Najpogostejši znaki okužbe so kašelj, zvišana telesna temperatura in izcedek iz nosu, med resnejše znake pa uvrščamo dispnejo in hipoksijo. Virus se pogosto pojavlja sočasno z drugimi respiratornimi virusi. Veliko število okužb in

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

---

pogostost sočasnih okužb pri otrocih kaže na virusno vztrajanje (perzistenco), kljub temu pa HBoV redko dokažemo pri starejših osebah (14, 22, 23).

**Adenovirusi (AdV)** poleg okužb dihal povzročajo tudi okužbe prebavil, sečil in oči. Imajo veliki dvovijačni linearni nesegmentirani genom DNA. So goli virusi s kapsido z ikozaedrično simetrijo (6). V rodu Mastadenovirus imamo več kot 50 vrst, od katerih jih vsaj devet okuži človeka, označujemo pa jih s črkami od A do F (2). Adenovirusi najpogosteje povzročajo okužbe dihal pri majhnih otrocih, ogrožene skupine pa so tudi imunsko oslabljeni bolniki in vojaški novinci. Razlog za okužbe vojaških novincev naj bi bila velika kontaminiranost okolja v vojašnicah, saj so adenovirusi zaradi svoje oblike zelo odporni na okoljske dejavnike. Večinoma je klinična slika blaga, medicinska pomoč pa ni potrebna. Redko lahko pride do vročinske bolezni, krupa ali pljučnice. Pri imunsko oslabljenih osebah lahko adenovirusi povzročajo diseminirane okužbe, ki so lahko smrtno nevarne (3). Za razliko od večine drugih respiratornih virusov se pojavljajo skozi vse leto (2).

## 1.2. Respiratorni virusi pri starejših

Pričakovana življenjska doba se je v zadnjih dveh stoletjih podaljšala za skoraj 30 let, v zadnjih petdesetih letih pa skoraj za 20 let. Naraščajoče število starostnikov pomeni večjo obremenitev za zdravstveni sistem, saj postane s starostjo imunski sistem manj učinkovit, posameznik pa bolj dovzeten za bolezni. To s tujko imenujemo imunosenescenca. Gre za kompleksno, še ne povsem pojasnjeno dogajanje, ki vpliva na hematopoezo, razvoj in diferenciacijo imunskih celic in celično funkcijo. Visoka starost, kronične bolezni in zmanjšana imunost velikokrat spremenijo odziv bolnika na virusno okužbo. Netipični znaki otežujejo pravilno diagnostiko, zato je ustrezno zdravljenje velikokrat oteženo ali prepozno, možnost prenosa virusov na okolico pa velika (24).

Virusi so po podatkih v literaturi udeleženi pri 13 do 31% obolenj spodnjih dihal pri starejših. Starejši velikokrat nimajo značilnih simptomov virusne okužbe, ki so pogosti pri otrocih in zdravih odraslih. Simptomi se tako pri njih kažejo kot poslabšanje kroničnih bolezni, pojavljajo se lahko zmedenost, anoreksija in vrtoglavica. Neznačilni znaki pri starejših so najverjetneje posledica dejstva, da so se z virusom okužili že v preteklosti, so

nanj delno imuni in so podvrženi ponovnim okužbam. Zaradi predhodno obstoječih protiteles je lahko količina virusa pri starejših nižja, diagnostika pa zahtevnejša. Ustrezna diagnoza je v tej starostni skupini pomembna iz več razlogov. Prvič, pravilna diagnoza omogoči ustrezno izolacijo okuženih bolnikov in preprečitev prenosa virusa na druge bolnike, zdravstvene delavce in ljudi v neposredni bližini. Drugič, pravilna diagnoza vpliva na potek zdravljenja in lahko prepreči nepotrebno uporabo antibiotikov (25).

Zadnjih nekaj let vzporedno z razvojem molekularnih tehnik ugotavljajo, da lahko poleg virusov influence tudi drugi respiratorni virusi povzročajo resna, življenjsko ogrožajoča stanja pri starejših. Virusne okužbe dihal so razlog za veliko število sprejemov v bolnišnico in precejšnjo umrljivost, kljub temu pa so podatki o številu in poteku okužb z respiratornimi virusi pri starejših skopi. V Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij (Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani) so v zimski sezoni 2012/2013 začeli opazovati, da je pri slovenskih bolnikih, starejših od 60 let, kot povzročitelj okužbe dihal pogosto dokazan RSV. Začeli so namreč uporabljati nov test, ki omogoča sočasno dokazovanje virusov influence tipov A in B ter RSV. Slednjega so dokazali skoraj pri vsakem četrtem bolniku, ki je bil v laboratorij poslan zaradi suma na prisotnost virusov influence (26).

Večina raziskav se osredotoča na pojav epidemij z respiratornimi virusi v domovih starejših občanov (DSO) (27-30). Dejavniki tveganja za okužbe v DSO so zmanjšana imunost, zmanjšane opravilne funkcije (inkontinenca), zmanjšana kognitivna sposobnost in uporaba invazivnih sredstev (npr. urinski katetri). Sobe z večimi osebami in skupinske aktivnosti lahko še pospešijo prenos patogenov (27, 28, 31). V DSO naj bi se v zadnjih dveh desetletjih število okužb dihal in drugih obolenj povečalo predvsem na račun skrajšanega bivanja v bolnišnicah (28). Cotter in sodelavci so spremljali domove za ostarele na Irskem v letu 2011 in ugotovili, da je bila kar tretjina prebivalcev starejša od 85 let, več kot polovica pa je imela težave pri gibanju. Pri več kot 60% se je pojavljala inkontinenca, skoraj 6% starostnikov pa je imelo nameščen urinski kateter. Med najpogostejšimi zdravstvenimi težavami so poleg okužb sečil in kože ugotovili tudi okužbe dihal (30).

Objavljeni so tudi rezultati, v katerih so v starejši populaciji dokazovali prisotnost večih respiratornih virusov hkrati (2, 14, 16, 21, 25, 27, 28, 30, 32-41). Najpogosteje so kot metodo uporabljali RT-PCR v realnem času, ki omogoča sočasno pomnoževanje nukleinskih kislin. V nekaterih raziskavah so hkrati uporabljali tudi metodo osamitve virusa v celični kulturi ali serološke metode in ugotavljali, katera metoda je ustrežnejša. Najpogosteje je panel vključeval viruse Inf A in B, RSV, hMPV, hRV in PIV 1-3, občasno pa tudi AdV. Pierangeli in sodelavci so z metodo RT-PCR v realnem času testirali bolnike, ki so februarja in marca 2009 in 2010 prišli na urgentno enoto in kazali klinične znake okužbe z respiratornimi virusi. Ugotovili so, da so bili na viruse pozitivni bolniki občutno starejši od tistih, ki niso bili okuženi, prav tako so bili pogosteje sprejeti v bolnišnico. Pri starejših od 65 let, ki so imeli znake okužb dihal, so viruse Inf A zaznali v 24% vzorcev bolnikov, medtem ko virusov Inf B niso našli. HRV so v letu 2009 zaznali v 16% primerov, v letu 2010 pa v 8%. Pri mlajših, okuženih s hRV, ta virus v večini primerov ni bil vzrok primarne bolezni, njihova začetna diagnoza pa velikokrat sploh ni vključevala težav z dihalni. Pri starejših od 65 let je bila ravno okužba s hRV poglavitni vzrok resnih težav z dihalni in sprejema v bolnišnico. RSV so v dveh sezonah zasledili pri manj kot 2% testiranih, prav tako hMPV, virusov PIV 1-3 niso zasledili, ostalih pa niso testirali (32).

Boivin in sodelavci so v letu 2006 izvedli raziskavo, v katero so vključili starejše iz DSO, ki so v januarju in februarju 2006 kazali znake okužbe dihal. Uporabili so brise in aspirate nosnega dela žrela in jih testirali na prisotnost nukleinskih kislin virusov Inf A in B, RSV in hMPV z metodo RT-PCR v realnem času. Izvedli so tudi osamitev virusov na celičnih kulturah, testirali so jih na prisotnost virusov Inf A in B, PIV 1-4, RSV, hMPV in AdV. Najprej so dokazali 5 okužb, ki jih je povzročil hMPV, in sicer na oddelkih A in B, ter eno okužbo, ki jo je povzročil RSV. Le teden dni kasneje so potrdili 6 novih okužb, ki jih je povzročil hMPV, in sicer na treh različnih oddelkih (A, B in D). V obdobju šestih tednov aktivnega spremljanja širjenja virusa so ugotovili, da je imela četrtnina oskrbovancev DSO znake okužbe s hMPV na sedmih od devetih oddelkov. Na določenih oddelkih se je okužilo celo do 72% starejših. Ker niso testirali popolnoma vseh oskrbovancev, so preiskovance razdelili na tiste, ki so imeli klinične znake bolezni in tiste, ki so bili tudi laboratorijsko testirani. Med laboratorijsko potrjenimi okuženimi s hMPV je bila umrljivost 50%, medtem ko je bila med preiskovanci, ki niso imeli laboratorijsko potrjene



Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

---

okužbe s hMPV, a so kazali znake okužbe, smrtnost 10%. Ugotovili so tudi, da je metoda RT-PCR v realnem času mnogo bolj občutljiva kot osamitev virusa na celični kulturi (15).

Najpogosteje v raziskovalnih člankih zasledimo spremljanje okužb dihal, ki jih povzročajo virusi Inf A in B ter RSV, saj so to najpogosteje dokazani respiratorni virusi pri starejših osebah in pri njih povzročajo največjo stopnjo umrljivosti. Viruse Inf A in B ter RSV so Utsomi in sodelavci uvrstili v skupino virusov z veliko možnostjo okužbe in visoko stopnjo umrljivosti (28).

Okužbe, ki jih povzroča RSV, so pri starejših pogoste, po nekaterih podatkih naj bi kar 5-10% okužb dihal povzročil prav ta virus (29). Poleg starejših se z RSV pogosto okužijo tudi bolniki po presaditvah tkiv ali organov, pri katerih je smrtnost 20-100% (11). Okužba z RSV povzroči težave z dihanjem, podaljšano bolnišnično zdravljenje in umrljivost, podobno kot tista z virusi influence (33, 34). Okužbe, ki jih povzročajo RSV in virusi influence, imajo podoben potek bolezni, podobne klinične znake, epidemije pa pogosto nastopajo sočasno. Okužbe z RSV zato pogosto težko razločimo od tistih, ki jih povzročijo virusi influence. Zhou in sodelavci so v ameriški raziskavi, ki je potekala med leti 1993 in 2008, preverjali podatke o pogostosti sprejema v bolnišnico ob okužbi z virusi influence in RSV. Zaključili so, da je število sprejemov zaradi okužb z virusom influence večje v primerjavi s številom sprejemov zaradi okužb z RSV (35). V raziskavi, ki jo je vodila Falsey, pa so pokazali, da je pogostost sprejema v bolnišnico podobna, a so imeli na razpolago manjše število bolnikov. Ti so imeli resne srčne in pljučne zaplete, stopnja precepljenosti proti virusom influence pa je bila visoka (29). Sundaram in sodelavci so pokazali, da je potek bolezni lažji v primeru okužbe z RSV v primerjavi s potekom bolezni, ki jo povzročijo virusi Inf A in B. Rezultati raziskave kažejo, da okuženi z RSV kasneje poiščejo zdravniško pomoč, sprejemi v bolnišnico so redkejši, prav tako pa imajo ti bolniki manj KOPB kot tisti, okuženi z virusi Inf A in B (36). Hongkongški raziskovalci so ugotovili, da imajo bolniki, okuženi z RSV, pogosteje težje kronične okužbe dihal, znaki okužbe pa se pri njih pojavijo kasneje kot v primeru okužbe z virusi Inf A in B (34). Ellis in sodelavci so v triletni raziskavi, ki so jo izvedli v 308 DSO v Tennesseeju, preverjali pogostost okužb, ki so jih povzročili virusi Inf A in B ter RSV. Dokazali so, da tako virusi Inf A in B kot tudi RSV povzročajo povečano število hospitalizacij, povečano uporabo

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

---

antibiotikov in zvišano stopnjo smrtnosti. Ugotovili so, da je zaradi okužbe z RSV umrlo od 2 do 20% oseb, okužbe z virusi Inf A in B pa so povzročile do 55% smrtnih primerov (9). Pogostejši zapleti ob okužbi z respiratornimi virusi se pojavljajo pri osebah z osnovnimi in kroničnimi boleznimi (37).

Človeški metapnevmovirus (hMPV) se pojavlja v vseh starostnih skupinah, a je odstotek hospitalizacij zaradi okužb, ki jih povzroči, pri starejših še neraziskan (38). Klinična slika okužbe s hMPV je zelo podobna tisti, ki jo povzročijo drugi respiratorni virusi, zato je laboratorijska diagnostika nujna. Widmer in sodelavci so preverjali število sprejemov v bolnišnico zaradi okužb, ki jih povzročajo virusi Inf A in B, RSV ali hMPV. Ugotovili so, da so bili bolniki, okuženi z RSV, v primerjavi s tistimi, okuženimi z virusi Inf A in B, pogosteje starejši od 65 let in so sodili v skupino bolnikov s pridruženimi kroničnimi boleznimi. Bolniki, okuženi s hMPV, so bili starejši od tistih, okuženih z virusi Inf A in B, imeli so več srčno-žilnih obolenj in so redkeje poročali o povišani telesni temperaturi. Spol, rasa in življenjski pogoji (živijo sami ali z družino) pa niso vplivali na virusna obolenja. Pri bolnikih, okuženih z RSV, je bila inkubacijska doba 6,5 dni, medtem ko je bila pri okuženih z virusi Inf A in B ter hMPV 5 dni. Pri bolnikih, okuženih z virusi Inf A in B, RSV ali hMPV, se dolžina bolnišničnega zdravljenja, potreba po zdravljenju s kisikom in stopnja umrljivosti niso bistveno razlikovale (38).

Povzamemo lahko, da so raziskovalci v različnih neodvisnih raziskavah prišli do določenih nasprotujočih si rezultatov. Kljub temu velja, da so najpogostejši povzročitelji virusnih okužb dihal pri starejših virusi Inf A in B ter RSV, sledi pa jim hMPV. Okužbe z njimi imajo lahko resne zdravstvene posledice. Potrebne bodo nadaljne raziskave za izboljšanje razumevanja poteka bolezni, možnosti zdravljenja in preprečevanja prenosa virusov.

Virusi, za katere so verjeli, da povzročajo le lažje okužbe zgornjih dihal, kot so naprimer hRV in hCoV, danes povezujejo tudi z resnimi okužbami spodnjih dihal. Vse težje je zgolj s kliničnimi znaki prepoznati, za kateri virus gre, saj so klinični znaki zelo podobni, možne pa so tudi sočasne okužbe z več virusi. HRV in hCoV naj bi bili prisotni pri približno 10% testiranih bolnikov, starejših od 65 let (39, 40). V raziskavah, kjer so odkrili precej nižje odstotke okužb s človeškimi rinovirusi in koronavirusi, je razlog za to najverjetneje v tem, da so uporabljali bodisi metodo osamitve virusa na celičnih kulturah ali pa serološke

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

---

metode. Danes je znano, da lahko približno 60% človeških rinovirusov in 70% človeških koronavirusov odkrijemo le z metodo RT-PCR (2).

V DSO v Avstraliji so v obdobju med avgustom in septembrom 2002 zaznali tri izbruhe okužb dihal, ki so bile klinično podobne tistim, ki jih povzročajo virusi influence. Z laboratorijsko diagnostiko so pokazali, da so bile osebe okužene s hCoV-OC43. Stopnja obolelosti med oskrbovanci in osebjem DSO je bila 43%. Med 27 odvzetimi vzorci jih je bilo kar 16 pozitivnih (59%), trije med njimi pa so bili vzorci osebja DSO. Drugi virusi niso bili prisotni. Najpogostejši klinični znaki so bili kašelj, izcedek iz nosu in boleče žrelo. V enakem obdobju so v lokalnih bolnišnicah in klinikah zaznali 5,7% okužb s hCoV-OC43 v avgustu 2002, v septembru 2002 pa je bil odstotek tovrstnih pozitivnih vzorcev 12,5% (17).

Človeški bokavirus, adenovirusi in enterovirusi se pri starejših pojavljajo redkeje, ponavadi skupaj z drugimi respiratornimi virusi. Sočasne okužbe naj bi se po nekaterih podatkih pojavljale v 10% vzorcev, višje odstotke pa zaznavajo pri otrocih, imunsko oslabeledih in zelo starih bolnikih (2). Koinfekcije naj bi bile po podatkih nekaterih raziskav povezane z resnejšimi kliničnimi simptomi, vendar jasnih zaključkov še ni (2, 41). Potrebne so nadaljne raziskave, ki bodo osvetlile pomembnost sočasnih okužb v klinični praksi, tako pri otrocih kot pri starejših.

## **1.2. Zaščita proti okužbam z respiratornimi virusi in okužbe zdravstvenih delavcev**

Z ustreznim razkuževanjem in higieno rok, zaščitno opremo za zdravstvene delavce (rokavice, maska), omejevanjem obiskov in prostorskim ločevanjem bolnikov z okužbami lahko uspešno omejimo okužbe in hkrati preprečimo bolnišnične okužbe (11, 42). Še posebej pomembno je dosledno upoštevanje ukrepov za omejitev širjenja virusov na pediatričnih in intenzivnih oddelkih ter oddelkih za presaditve, kjer so bolniki najbolj imunsko oslabljeni in zato bolj dovzetni za okužbe, poleg tega pa je večja tudi umrljivost (3, 11).

Edini respiratorni virusi, ki povzročajo okužbe dihal in proti katerim se lahko v Sloveniji zaščitimo s cepljenjem, so virusi influence. Cepivo proti njim ne spada med najbolj

učinkovita cepiva, a je izredno varno in ima malo neželenih učinkov. Učinkovitost cepiva je odvisna od starosti in imunskega stanja prejemnika. Pri majhnih otrocih in starejših je cepljenje manj učinkovito, a kljub temu priporočljivo, saj zmanjša zaplete po okužbi z virusi. Ker imajo virusi influence veliko različnih tipov, je učinkovitost cepiva odvisna tudi od tega, ali so v njem prisotni tipi virusov, ki krožijo v času epidemije. Cepljenje priporočajo predvsem vsem ogroženim skupinam, kamor sodijo otroci, nosečnice, starostniki, imunsko oslabljeni posamezniki s kroničnimi in malignimi boleznimi ter transplantiranci, pa tudi zdravstveni delavci (42, 43, 44).

Za preprečevanje okužb dihal, ki jih povzročajo ostali znani virusi, cepiva ni. Edino specifično zdravilo za zdravljenje okužb spodnjih dihal je sintetični analog gvanozina, ribavirin. Ker ima veliko neželenih učinkov, nizko učinkovitost in visoko ceno, pa ga le redko uporabljamo. Najpogosteje se ribavirin uporablja pri imunsko oslabljenih bolnikih, kjer so dokazali pozitivne učinke (3, 45). Prezgodaj rojene otroke in otroke s prirojenimi boleznimi srca in pljuč pred zimsko sezono zaščitijo pred okužbo z RSV z monoklonskimi protitelesi palivizumab (Synagis®). V fazi kliničnih preizkušanj je tudi izboljšano monoklonsko protitelo motavizumab. Za zdravljenje okužb z drugimi respiratornimi virusi se trenutno uporablja le podporno zdravljenje za lajšanje simptomov, kot je zniževanje telesne temperature in zdravljenje s kisikom. Raziskave na področju odkrivanja protivirusnih zdravil in cepiv so obsežne, a zaenkrat še niso prinesle večjih uspehov (3).

V različnih raziskavah so preučevali prevalenco okuženosti z respiratornimi virusi med zdravstvenim osebjem in ugotavljali, kakšne so posledice za bolnike. Med epidemijami RSV naj bi se več kot 50% zdravstvenih delavcev okužilo z virusom, kar pa zaradi lažjih simptomov prebolijo na delovnih mestih. Veliko število okužb je najverjetneje posledica tega, da je RSV zelo virulenten in se lahko širi na različne načine, in sicer preko površin, aerosolov in zdravstvenih delavcev na bolnike (11). Wendelboe in sodelavci so dokazali, da lahko okužba zdravstvenega delavca, ki se kaže kot prehlad, ob prenosu na bolnika za slednjega pomeni smrtno nevarno okužbo. Ugotovili so tudi, da ustrezno cepljenje medicinskega osebja v DSO proti virusom influence zmanjša število okužb in umrljivost med oskrbovanci. Kljub temu pa ostaja število cepljenih delavcev v zdravstvu v Združenih državah Amerike manj kot 50% (46). V Sloveniji so ocenjevali število okužb bolnikov in

zdravstvenega osebja z respiratornimi virusi na intenzivnem oddelku in dokazali, da je ob ustrezni higieni možnost prenosa okužb med bolniki in zdravstvenim osebjem majhna. Možnost za okužbo z respiratornimi virusi je večja izven bolnišničnega okolja (47). V Sloveniji se je v sezoni 2012/2013 cepilo le 11% zdravstvenih delavcev. Odstotek cepljenih zdravstvenih delavcev pa po letu 2009, ko se je pojavila aviarna influenza pri ljudeh, vsako leto upada (48). Z zvišanjem odstotka precepljenosti med zdravstvenimi delavci bi lahko nedvomno precej zmanjšali število okužb z virusi influence v DSO in bolnišnicah (44, 48, 49).

Cepljenje zdravstvenega osebja in osebja, ki prihaja v stik z bolniki, ter skrb za preventivo bi morala biti ena izmed osrednjih nalog in ciljev vodstva vsake zdravstvene ustanove. Z ustrezno preventivo se namreč lahko izognemo večini bolnišničnih okužb, poskrbimo za uspešnejše zdravljenje bolnikov, prav tako pa preprečimo primanjkljaj delavcev v času največjih respiratornih epidemij.

### **1.3. Laboratorijska diagnostika virusnih povzročiteljev bolezni dihal**

Laboratorijska diagnostika je pomembna z vidika izolacije bolnika za preprečitev nadaljnega širjenja virusa, pri izbiri ustreznega podpornega zdravljenja, boljše napovedi poteka bolezni in v izogib nepotrebnemu zdravljenju z antibiotiki, ki lahko vodi do razvoja rezistence nanje (18).

Respiratorne viruse so, z izjemo virusov influence, le redko povezovali z resnimi zapleti, ki lahko vodijo v bolnišnično zdravljenje in stanja, ki se končajo s smrtnim izidom. Razlog za to je verjetno tudi slabša možnost za dokazovanje virusov s klasičnimi metodami – osamitev virusa na celični kulturi, dokazovanje virusnih antigenov in protiteles z imunofluorescenčnimi in encimsko-imunskimi metodami. Odkritje in razvoj verižne reakcije s polimerazo (PCR) in izpeljanke te metode so izpodrinile klasične teste. Metoda neposredne imunofluorescence (DIF) se v nekaterih laboratorijih še vedno uporablja zaradi svoje specifičnosti, hitrosti in nizke cene, a jo zaradi veliko manjše občutljivosti vedno bolj izpodrivajo nove tehnike, ki temeljijo na PCR. Osamitev virusa na celični kulturi ostaja pomembna metoda v primerih, ko imamo opravka z neznanim virusnim povzročiteljem.

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

---

Včasih je veljal PCR za drago metodo v primerjavi s klasičnimi, a se danes cena znižuje, saj lahko testiramo več virusov hkrati, uporabljamo manjše reakcijske volumne in povečujemo stopnjo avtomatizacije. Vse to prispeva k temu, da je danes PCR postal glavno orodje za analizo virusnih povzročiteljev bolezni (25).

Reakcija s polimerazo je metoda izbire za testiranje prisotnosti respiratornih virusov pri starejših, kjer je koncentracija virusa ponavadi nižja, saj je najobčutljivejša in z njo lahko testiramo vse znane respiratorne viruse (18, 25, 38, 50). Metoda PCR je razmeroma poceni, hitra, občutljiva in primerna za analizo 15 ali več virusov hkrati, kar je predvsem v primeru respiratornih virusov ključnega pomena. Klinični znaki so pri okužbah dihal podobni, ne glede na vrsto virusa, ki je okužbo povzročil, zato je brez laboratorijske diagnostike nemogoče razločiti med povzročitelji. Pogoste so tudi sočasne okužbe, kjer se več različnih virusov hkrati razmnožuje v sluznici dihal, to pa prispeva k najrazličnejšim simptomom in znakom. Z metodo PCR v realnem času lahko hkrati analiziramo več virusov, v primeru sočasnih okužb pa lahko s primerjavo praznih vrednosti (Ct) poskusimo predvideti, kateri med njimi je primarni povzročitelj (2, 25).

Poznamo več različic metode PCR. Večina laboratorijev trenutno uporablja PCR v realnem času, saj lahko na ta način hkrati v enem vzorcu analiziramo več virusov. Metoda je visoko specifična, možnost kontaminacij je nizka in je razmeroma cenovno ugodna. Novejše metode, kot so naprimer tehnike izotermalnega pomnoževanja (NASBA – angl. *nucleic acid sequence based amplification*), določanje nukleotidnega zaporedja nove generacije, masna spektrometrija MALDI-TOF in druge pa so zaenkrat še v razvoju in večinoma niso del rutinske diagnostike. Večina panelov PCR omogoča analizo sledečih virusov: Inf A in B, RSV, hMPV, hRV, hCoV, PIV 1-3 in AdV. Določeni paneli vključujejo tudi HBoV, EV in parehoviruse. Veliko sistemov omogoča tudi analizo podtipov koronavirusov, in sicer NL63, HKU1, 229E in OC43. V določene detekcijske sisteme so vključene tudi bakterijske tarče, najpogosteje *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* in *Bordetella pertussis*. Vključevanje bakterijskih tarč je po mnenju Brittain-Longa in sodelavcev dobro, saj se lahko zdravniki v primeru odkritja virusnega povzročitelja izognejo nepotrebnim uporabi antibiotikov (51). Zadnji podatki kažejo, da naj bi panel PCR za dokazovanje 15

respiratornih povzročiteljev zmanjšal uporabo antibiotikov, vendar zaenkrat zanesljivih potrditev tega še ni (2).

Najustreznejši vzorec pri starejših je najverjetneje bris nosnega dela žrela in bris žrela. Aspirati, ki se najpogosteje uporabljajo pri otrocih, pa so s strani starejših slabo sprejeti, še posebej v primeru dementnih bolnikov. Bris žrela je sicer najenostavnejši način odvzema vzorca, ki predstavlja tudi najmanj nelagodja za bolnika, vendar pa lahko z brisom nosnega dela žrela pridobimo večjo količino virusov. Talbot in sodelavci so dokazali, da je pri bolnikih najboljše in najlažje odvzeti bris žrela in bris nosu in ju nato združiti v transportnem mediju (25).

Trajanje kliničnih simptomov in znakov ob odvzemu vzorca seveda vpliva na dokaz povzročitelja z metodo RT-PCR v realnem času. Trajanje simptomov bi zato morali upoštevati pri interpretaciji laboratorijskih rezultatov in izbiri zdravljenja. Vzorci morajo biti odvzeti čim prej po pojavu simptomov, saj količina virusa s trajanjem okužbe hitro upada. Tudi če so pri bolniku klinični simptomi in znaki še prisotni, je mogoče, da virusa z laboratorijskimi tehnikami ne bomo več zaznali. To so dokazali v raziskavi, ki jo je vodil Brittain-Long. S panelom PCR so analizirali 13 virusov in dve bakteriji, kot vzorce pa so uporabljali brise nosnega dela žrela odraslih z okužbo dihal. Dokazali so večje število virusov pri osebah, pri katerih so vzorec odvzeli prvih 6 dni po pojavu kliničnih znakov. Pri okužbah, ki jih povzročajo hRV in EV, pa so okužbo zaznali še tudi 4-5 tednov po pojavu kliničnih znakov, saj se v tem primeru pomnoževanje virusa zmanjšuje počasneje (16).

Z novimi tehnikami lahko zaznajo tudi do 50% več virusnih povzročiteljev kot s klasičnimi metodami. S klasičnimi testi niso mogli zaznati okužb s hMPV, hRV in hCoV (16). Vselej moramo torej upoštevati dejstvo, da visoko občutljive biološko-molekularne tehnike lahko zaznajo tudi viruse, ki niso vzročno povezani z boleznijo. Tako imajo npr. človeški rinovirusi dolgo izločanje tudi po koncu simptomov, pa tudi potek bolezni je lahko popolnoma asimptomatski, človeški bokavirus pa se izloča tudi nekaj mesecev po okužbi (2).

## 2. Namen dela

V preteklosti so se raziskave osredotočale predvsem na okužbe otrok z respiratornimi virusi, danes pa se jih vse več ukvarja tudi s problematiko okužb z respiratornimi virusi pri starejših osebah. V Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij (Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani) so že v sezoni 2012/2013, ko so začeli testirati respiratorne viruse z novo metodo PCR, ugotovili, da je vsak četrti vzorec, poslan na analizo prisotnosti nukleinskih kislin virusov Inf A in B, pozitiven na RSV (26). V Sloveniji zaenkrat še ni bilo narejene raziskave, ki bi v celoti testirala prisotnost respiratornih virusov pri starejših v zimski sezoni okužb dihal. Vsi naštetih razlogi so prispevali k odločitvi, da bo prav to tema magistrske naloge.

V okviru magistrske naloge želimo ugotoviti, v kolikšni meri so posamezni respiratorni virusi prisotni v populaciji oseb, starejših od 65 let. Analizirali bomo vse vzorce bolnikov, starejših od 65 let, ki so bili med 1. oktobrom 2013 in 31. marcem 2014 že testirani na možne virusne povzročitelje okužbe dihal v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij (Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani). Večina testiranih vzorcev pripada bolnikom Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, manjši del vzorcev pa je bil poslan iz drugih splošnih bolnišnic v Sloveniji.

Z metodo RT-PCR v realnem času bomo ugotavljali, ali so v vzorcih prisotni tudi virusni povzročitelji, ki predhodno niso bili testirani. Iz vseh vzorcev, iz katerih osamitev nukleinskih kislin predhodno še ni bila opravljena, jih bomo izolirali z aparatom MagNA Pure Compact (Roche, Mannheim, Nemčija). Rezultate bomo interpretirali s pomočjo računalniškega programa StepOne Software 2.1. Po končanem delu v laboratoriju bomo rezultate statistično obdelali. Celotno laboratorijsko delo bomo opravili v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij (Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani). Pri tem bomo uporabljali dve aparaturi, in sicer prej omenjeni aparat za osamitev nukleinskih kislin in aparat za pomnoževanje nukleinskih kislin Step One Plus (Applied Biosystems, by Life technologies, CA, ZDA).



Namen magistrske naloge bo ugotoviti, v kolikšni meri se respiratorni virusi pojavljajo v populaciji starejših oseb v Sloveniji. Naše izsledke bomo primerjali z rezultati iz literature. Ugotavljali bomo, koliko vzorcev, poslanih zaradi suma na okužbo z virusi influence, je bilo pozitivnih na enega od ostalih respiratornih virusov. Ugotavljali bomo tudi, ali se kateri izmed respiratornih virusov pri starejših bolnikih pojavljajo redko in kateri virusi se pogosto pojavljajo sočasno z drugimi virusi. Na podlagi naših rezultatov bomo poskusili sklepati, ali je obstoječa laboratorijska diagnostika res najbolj optimalna za to, da zagotovi kliniku vse potrebne informacije.

### **3. Materiali in metode**

#### **3.1. Preiskovanci in vzorci**

V raziskavo o pojavnosti virusnih okužb dihal pri starejših smo zajeli populacijo starejših oseb, starih 65 let in več. Izbrali smo vzorce, ki so jih med 1. oktobrom 2013 in 31. marcem 2014 analizirali na možne virusne povzročitelje okužbe dihal v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij (Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani). Starostno mejo smo izbrali na osnovi že objavljenih raziskav, časovni okvir pa na podlagi dejstva, da so epidemije respiratornih virusov na severni polobli pogostejše v jesenskem in zimskem obdobju (3, 26, 29, 32, 35, 51, 52). Večina testiranih vzorcev je pripadala bolnikom Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, manjši del pa tistim iz drugih splošnih bolnišnic v Sloveniji.

Izbranim kriterijem je ustrezalo 1292 vzorcev. Del teh (988) so predhodno že pregledali na celotni panel virusov, ki je vključeval dokazovanje prisotnosti nukleinskih kislin Inf A in B, RSV, hMPV, hRV, hCoV, PIV 1-3, HBoV, AdV in EV. Preiskave smo opravili z metodo RT-PCR v realnem času. Del vzorcev (304), ki so jih poslali na analizo zaradi suma na okužbo z virusi influence, smo testirali z metodama Simplexa ali RT-PCR v realnem času. Del teh vzorcev (80) so predhodno testirali s komercialnim kitom Simplexa Direct (Focus Diagnostics, Cypress, CA, ZDA), s katerim dokazujemo prisotnost virusov Inf A in B ter RSV. Preostali vzorci (224) so bili predhodno testirani le na prisotnost nukleinskih kislin virusov Inf A in B. Preiskave tega dela vzorcev so opravili z metodo RT-PCR v realnem času, ki je del panela respiratornih virusov, ki je v laboratoriju v rutinski uporabi.

#### **3.2. Metode dela**

Kot smo omenili, so bili vsi vzorci predhodno že analizirani v Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij (Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani). Testirali smo 304 vzorce, ki so jih poslali zaradi suma na prisotnost okužbe z virusi influence. Z metodo RT-PCR v realnem času smo preverjali prisotnost ostalih respiratornih virusov, in sicer RSV, hMPV, hRV, hCoV, PIV 1-3, HBoV, AdV in EV. Rezultate analize vzorcev, pri katerih so že predhodno opravili celoten panel raziskav,

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

---

pa smo le vključili v skupno statistično analizo. Pri večini vzorcev je bila osamitev nukleinskih kislin opravljena že predhodno, iz manjšega dela pa smo nukleinske kisline osamili z avtomatsko metodo z aparatom MagNA Pure Compact (Roche, Mannheim, Nemčija). Vse vzorce smo hranili pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.1. Osamitev nukleinskih kislin

Osamitev nukleinskih kislin smo izvedli s komercialno dostopnim kompletom MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche, Mannheim, Nemčija) z aparatom MagNA Pure Compact (Roche, Mannheim, Nemčija). Avtomatska osamitev tarčnih nukleinskih kislin temelji na tehnologiji »High Pure«. S pomočjo proteinaze K in lizirajočega pufra najprej liziramo celice, sledi inaktivacija celičnih nukleaz in vezava nukleinske kisline na steklene kroglice z vezanimi magnetki. S pufri za spiranje odstranimo inhibitorje PCR in primesi, ki vplivajo na encimske reakcije, nato pa z elucijskim pufrom eluiramo vezano nukleinsko kislino, ki jo lahko uporabimo takoj ali pa jo do uporabe shranimo pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I vsebuje:

- kartuše z reagenti (proteinaza K, lizirajoči pufer, pufri za spiranje, elucijski pufer, magnetni delci);
- nastavke za pipete;
- epruvete za vzorce;
- elucijske epruvete;
- pokrovčke za elucijske epruvete.

Za osamitev nukleinskih kislin smo uporabili po  $190\ \mu\text{L}$  ustreznega vzorca,  $5\ \mu\text{L}$  interne kontrole RNA (EAV, angl. *equine arteritis virus*) in  $5\ \mu\text{L}$  interne kontrole DNA (EHV, angl. *equine herpesvirus type 1*). Interni kontroli uporabljamo za preverjanje uspešnosti osamitve nukleinskih kislin in uspešnosti reakcije PCR. Skupni volumen vzorca je bil tako  $200\ \mu\text{L}$ , končni elucijski volumen pa  $100\ \mu\text{L}$ . Vzorce smo ustrezno označili in do analize shranili pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

---

### 3.2.2. Pomnoževanje virusnih nukleinskih kislin z metodo RT-PCR v realnem času

#### a) Verižna reakcija s polimerazo v realnem času s predhodno transkripcijo

V reakcijski zmesi PCR so:

- Vzorec DNA, ki služi kot matrica. Ker lahko s PCR pomnožujemo le DNA, moramo v primeru, ko naš vzorec vsebuje RNA, le to najprej prepisati v komplementarno cDNA, in sicer na osnovi enoverižne matrice RNA z reverzno transkripcijo. V tem primeru govorimo o metodi RT-PCR.
- Dva oligonukleotidna začetnika, s katerima omejimo željeni odsek pomnoževanja.
- Deoksinukleozid-trifosfati (dNTP), ki so gradniki za izgradnjo nove verige DNA.
- Termostabilna polimeraza DNA (najpogosteje polimeraza Taq DNA), ki omogoča podaljševanje verige.
- Ioni magnezija ( $Mg^{2+}$ ), ki nastopajo kot kofaktorji polimeraze DNA.
- Reakcijski pufer za uravnavanje pH, ki vpliva na aktivnost in točnost delovanja polimeraze DNA (19, 53).

Reakcija PCR poteka v treh stopnjah, ki so:

- 1) Denaturacija, kjer se pri temperaturi  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  verigi DNA razkleneta, pri čemer iz dvoverižne dobimo enoverižno DNA.
- 2) Komplementarno prileganje oligonukleotidnih začetnikov na matrico DNA, ki poteka ob znižanju temperature na  $40\text{-}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; temperatura vezave je odvisna od dolžine in sestave začetnih oligonukleotidov (delež parov G-C).
- 3) Podaljševanje verige, ki poteka pri  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; ta temperatura je optimalna za delovanje polimeraze DNA (19, 53).

Reakcija poteka ciklično, in sicer ponavadi izvedemo 20-40 ciklov, teoretično pa se število kopij DNA z vsakim ciklom podvoji. Pred prvim ciklom moramo izvesti reverzno transkripcijo in začetno denaturacijo, po zadnjem ciklu pa sledi še zaključno podaljševanje (53).

Ena izmed nadgradenj metode PCR je PCR v realnem času (angl. *real-time PCR*), kjer sta pomnoževanje in detekcija pridelkov PCR združeni. Omogočeno je merjenje količine

pridelka PCR v vsakem ciklu v eksponentni fazi, in sicer z merjenjem fluorescence. V našem primeru smo uporabljali specifičen način detekcije, kjer pridelkom PCR sledimo s sondami TaqMan, ki so označene z različnimi fluorofori. Sonde se komplementarno vežejo na tarčni odsek nukleinske kisline. Na njihovem 5' koncu je vezan poročevalec, na 3' koncu pa dušilec. Ko je sonda intaktna, dušilec prestreže emitirano svetlobo poročevalca. V stopnji podaljševanja 5'-eksonukleazna aktivnost polimeraze DNA cepi sondo, tako da dušilec ne more prestreči fluorescence poročevalca, zato fluorescenca naraste in je sorazmerna količini pridelka PCR. Za vsak vzorec določimo cikel, v katerem fluorescenca preseže fluorescenco ozadja in ga označimo z vrednostjo Ct (angl. *threshold cycle*). Vrednosti Ct so obratnosorazmerne začetnim številom kopij matrice. Pri večjem številu kopij matrice signal prej preseže prag, zato določimo nižjo vrednost Ct (53).

Prednosti PCR v realnem času so lažja kvantifikacija nukleinskih kislin, manjša možnost kontaminacije, saj gre za zaprti sistem, in hitrejša analiza. Tako lahko v kratkem času z visoko občutljivostjo in specifičnostjo določimo prisotnost nukleinskih kislin v najrazličnejših kužninah (2, 3).

Z metodo RT-PCR v realnem času so bili predhodno analizirani vsi vzorci, ki so jih poslali na celoten panel preiskav. Mi pa smo s to metodo analizirali tudi tiste vzorce, ki so jih poslali zaradi suma na okužbo z virusi influence.

#### b) Test Simplexa Direct

Del vzorcev, poslanih na testiranje zaradi suma na okužbo z virusi influence, smo analizirali s testom Simplexa, kjer smo semikvantitativno dokazovali prisotnost nukleinskih kislin virusov Inf A in B ter RSV. Simplexa direct (Focus Diagnostics, Cypress, CA, ZDA) je ena izmed novejših metod za hitro molekularno dokazovanje virusnih povzročiteljev. Njena glavna prednost je, da ni potrebna predhodna osamitev nukleinskih kislin. V aparatu 3M Integrated Cyler (Focus Diagnostics, Cypress, CA, ZDA) poteka avtomatska osamitev nukleinskih kislin iz intaktnega vzorca in nato še analiza RT-PCR v realnem času. Ker gre za popolnoma zaprti sistem, je možnost kontaminacije minimalna. Metoda je primerna tudi za urgentne vzorce, saj analiza traja le 64 minut. Pri tem se uporabljajo reagenti Simplexa Flu A/B in RSV Direct Reaction Mix

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

---

(Focus Diagnostics, Cypress, CA, ZDA). Sistem je interno nadzorovan, saj se za vsak vzorec hkrati analizira tudi interna kontrola, ki nam podaja informacijo o kvaliteti osamitve in pomnoževanja nukleinskih kislin (54).

c) Potek dela

Analizirali smo 304 vzorce bolnikov, ki so jih zaradi suma na okužbo z virusi influence poslali na laboratorijsko diagnostiko. V njih smo z metodo RT-PCR v realnem času dokazovali prisotnost ostalih respiratornih virusov, in sicer respiratornega sincicijskega virusa, človeškega metapneumovirusa, človeških rinovirusov in koronavirusov, virusov parainfluence 1-3, človeškega bokavirusa, adenovirusov ter enterovirusov.

Posamezne reakcijske mešanice so vsebovale komercialno pripravljeno mešanico reagentov TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied biosystems, Life technologies, Foster City, CA, ZDA), ki vsebuje ustrezen RT-PCR pufer, encima reverzno transkriptazo in Taq DNA polimerazo, magnezijeve ione in barvilo ROX. Dodali smo ji še specifične oligonukleotidne začetnike in sonde, ki so navedeni v Preglednici I. Reakcijski reagenti ter njihove količine in končne koncentracije so navedeni v Preglednici II. Končni volumen vsake reakcijske mešanice PCR je vseboval 15  $\mu$ L reakcijske mešanice in 5  $\mu$ L nukleinske kisline. V vsako reakcijo smo vključili tudi pozitivno in negativno kontrolo.

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

**Preglednica I:** Začetni oligonukleotidi in oligonukleotidne sonde, ki smo jih uporabili v testu RT-PCR v realnem času za dokaz respiratornih virusov. F: pozitivno usmerjeni oligonukleotidni začetnik (angl. *forward primer*), R: negativno usmerjeni oligonukleotidni začetnik (angl. *reverse primer*), P: oligonukleotidna sonda (angl. *probe*).

Virus	Oznaka začetnega nukleotida	Oligonukleotidno zaporedje	Tarčni gen	Dolžina tarčnega gena (bp)	Vir
Inf A	Flu A1	F: 5'- tcatggagtggctaaagacaagac-3'	Del gena M1 in M2, beljakovine matriksa	93	Kuypers et al. J Clin Microbiol 2006; 44(7): 2383-88.
	Flu A2	R1: 3'- tcatggaatggctaaagacaagac-5'			
	Flu	R2: 3'-ggcacggtgagcgtgaa-5'			
	Flu (FAM)	P: FAM-tcacctctgactaaggg			
Inf B	INF B	F: 5'-gaattgcaaaggatgtaatggaa- 3'	Del gena M1 in M2, beljakovine matriksa	114	Daum LT et al. Influenza Other Respi Viruses 2007; 1: 167-75.
	INF B	R: 3'- agaacaaattgaaagaatctgaaatggt- 5'			
	INF B (VIC)	P: VIC-atgggaaattcagctct			
RSV	RSV	F: 5'- aatacagccaaatctaaccaactttaca-3'	RNA polimeraza, L gen	183	Kuypers et al. J Clin Virol 2004 .
	RSV	R: 3'-gccaaggaagcatgcaataaa- 5'			
	RSV-A (FAM)	P1: FAM-tgctattgtgcactaaag			
	RSV-B (VIC)	P2: VIC-cactattccttactaaagatgctc			

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

Virus	Oznaka začetnega nukleotida	Oligonukleotidno zaporedje	Tarčni gen	Dolžina tarčnega gena (bp)	Vir
hMPV	NLN	F: 5'-catataagcatgctatattaaaagagtctc-3'	Del gena za nukleoprotein N	196	Maertzdorf et al. J Clin Microbiol 2004; 981-86.
	NLN	R: 3'-cctatttctgcagcatattgtaacag-5'			
	NLN (FAM)	P: FAM-tgyaatgatgaggggtgtcactgcggttg			
	EAV	F: 5'-ggc gac agc cta caa getaca-3'	Beljakovine E	54	
	EAV	R: 3'-ttg ygc ggg cgg ttt g-5'			
	EAV (VIC)	P: VIC-acc cgc atc tga cca aac			
hRV	HRV-1s	F1: 5'-gacarggtgtgaagagcc-3'	5' NCR	142	Scheltinga et al. J Clin Virol 2005; 33: 306-31.
	HRV-2s	F2: 5'-gacatggtgtgaagacyc-3'			
	HRV-as	R: 3'-caaagtagtyggtcccatcc-5'			
	HRV (FAM)	P: FAM-tcctccggcccctgaatgyggctaa			
	EHV	F: 5'-catgtcaacgcactccca-3'	Del gena, ki kodira glikoprotein B	63	
	EHV	R: 3'-gggtcgggcgtttctgt-5'			
	EHV1 (VIC)	P: VIC-ccctacgtgctcc			
hCoV	Co	F1: 5'-tggtggctgggacgatatgt-3'	Del gena za polimerazo B1	85-100	Kuypers et al. Pediatrics 2007; 119(1): 70-76.
	Co	F2: 5'-ttatggtggttgaataatattgtg-3'			
	Co	F3: 5'-tggcgggtgggataatattgt-3'			
	Co	R1: 3'-ggcatagcacgatcacacttagg-5'			
	Co	R2: 3'-ggcaaagctctatcacatttgg-5'			
	Co	R3: 3'-gagggcatagctctatcacacttagg-5'			
	Co (FAM)	P1: FAM-ataatcccaacccatrag			
	Co (FAM)	P2: FAM-atagtcccatccatcaa			



Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

Virus	Oznaka začetnega nukleotida	Oligonukleotidno zaporedje	Tarčni gen	Dolžina tarčnega gena (bp)	Vir
PIV	PIV	F1: 5'-acagatgaaattttcaagtgctactttagt-3'	Gen, ki kodira polimerazo	84	Kuypers et al. J Clin Microbiol 2006; 44(7): 2383-88.
	PIV	R1: 3'-gcctctttaatgccatattatcattaga-5'			
	PIV (FAM)	P1: FAM-atggaataaatcgactcgca			
	PIV	F2: 5'-tgcatgtttataactactgatcttgctaa-3'	Gen, ki kodira polimerazo	78	
	PIV	R2: 3'-gttcgagcaaaatggattazgg-5'			
	PIV (FAM)	P2: FAM-actgtctcaatggagatat			
	PIV	F3: 5'-tgctgttcgatgccaaca-3'	Matriks	66	
	PIV	R3: 3'-atztatgctcctatctagtgaagaca-5'			
	PIV (FAM)	P3: FAM-ttgctcttgctcctca			
HBoV	BOCANS 1	F: 5'-tgcagacaacgcytagttgtt-3'	Del gena, ki kodira NS1	88	Lu et al. J Clin Microbiol 2006; 3231-35.
	BOCANS 1	R: 3'-ctgtcccgcccaagataca-5'			
	BOCANS 1 (FAM)	P: FAM-ccaggattgggtggaacctgcaaa			
AdV	AdV	F: 5'-gccacggtggggttctaaact-3'	Gen, ki kodira hekson	132	De Vos et al. Eur J Microbiol Infect Dis 2009; 28(11): 1305-10.
	AdV	R: 3'-gccccagtggtcttacatgcacatc-5'			
	AdV (VIC-tamra)	P: VIC-tamra-tgcaccagaccggctcagggtactcega			

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

Virus	Oznaka začetnega nukleotida	Oligonukleotidno zaporedje	Tarčni gen	Dolžina tarčnega gena (bp)	Vir
EV	EV	F: 5'-tcctccggcccctga-3'	5' UTR	120	Nijhuis et al. J Clin Microbiol 2002; 40(9): 3666.
	EV	R1: 3'-aattgcaccataagcagcca-5'			
	EV	R2: 3'-gattgcaccataagcagcca-5'			
	EV (FAM)	P1: FAM-cggaaccgactactttgggtgtccgt			
	EV (FAM)	P2: FAM-cggaaccgactactttgggtgaccgt			

**Preglednica II:** Reagenti v reakcijskih mešanica.

Virus	Reagenti	Količina (mL)	Končna koncentracija (nM)
Inf A in B	Flu-F A1 (25 µM)	0,32	400
	Flu-F A2 (25 µM)	0,32	400
	Flu-R (25 µM)	0,32	400
	INF-B-F (25 µM)	0,72	900
	INF-B-R (25 µM)	0,72	900
	FluA-P-FAM (25 µM)	0,16	200
	INF-B-P-VIC (10 µM)	0,6	300
	TaqMan MMX 4x	5	
	ddH <sub>2</sub> O	6,84	
RSV	RSV-F (10 µM)	0,7	350
	RSV-R (10 µM)	0,7	350
	RSV-A-P (10 µM)	0,2	100
	RSV-B-P (10 µM)	0,2	100
	TaqMan MMX 4x	5	
	ddH <sub>2</sub> O	8,2	

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

Virus	Reagenti	Količina (mL)	Končna koncentracija (nM)
hMPV	NLN-F (50 µM)	0,36	900
	NLN-R (50 µM)	0,36	900
	NLN-P (25 µM)	0,24	300
	EAV-F (50 µM)	0,16	400
	EAV-R (50 µM)	0,16	400
	EAV-P (20 µM)	0,15	150
	TaqMan MMX 4x	5	
	ddH <sub>2</sub> O	8,57	
hRV	235 hRV 1s (50 µM)	0,16	400
	235 hRV 2s (50 µM)	0,16	400
	236 hRV as (50 µM)	0,16	400
	522 hRV-FAM (50 µM)	0,136	340
	EHV-F (50 µM)	0,24	600
	EHV-R (50 µM)	0,24	600
	EHV-P (20 µM)	0,25	200
	TaqMan MMX 4x	5	
	ddH <sub>2</sub> O	8,654	

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

Virus	Reagenti	Količina (mL)	Končna koncentracija (nM)
hCoV	F1 (20 $\mu$ M)	0,5	500
	F2 (20 $\mu$ M)	0,25	250
	F3 (20 $\mu$ M)	0,25	250
	R1 (20 $\mu$ M)	0,25	250
	R2 (20 $\mu$ M)	0,25	250
	R3 (20 $\mu$ M)	0,25	250
	P1 (10 $\mu$ M)	0,4	200
	P2 (10 $\mu$ M)	0,4	200
	TaqMan MMX 4x	5	
	ddH <sub>2</sub> O	7,45	
HBoV in AdV	BOCANS1-F (50 $\mu$ M)	0,36	900
	BOCANS1-R (50 $\mu$ M)	0,36	900
	BOCANS1-P-FAM (20 $\mu$ M)	0,3	300
	AdV-F (50 $\mu$ M)	0,16	400
	AdV-R (50 $\mu$ M)	0,16	400
	AdV-P-VIC (20 $\mu$ M)	0,2	200
	TaqMan MMX 4x	5	
	ddH <sub>2</sub> O	8,46	

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

Virus	Reagenti	Količina (mL)	Končna koncentracija (nM)
PIV	PIV type 1 F (50 µM)	0,1	250
	PIV type 1 R (50 µM)	0,1	250
	PIV type 2 F (50 µM)	0,1	250
	PIV type 2 R (50 µM)	0,1	250
	PIV type 3 F (50 µM)	0,1	250
	PIV type 3 R (50 µM)	0,1	250
	PIV type 1 P (10 µM)	0,4	200
	PIV type 2 P (10 µM)	0,4	200
	PIV type 3 P (10 µM)	0,4	200
	TaqMan MMX 4x	5	
	ddH <sub>2</sub> O	8,2	
EV	EV-F (50 µM)	0,24	600
	EV-R (50 µM)	0,24	600
	EV-R1 (50 µM)	0,24	600
	EV-P (20 µM)	0,2	200
	EV-P1 (20 µM)	0,2	200
	TaqMan MMX 4x	5	
	ddH <sub>2</sub> O	8,88	

Pomnoževanje DNA smo izvedli v aparatu za pomnoževanje nukleinskih kislin Step One Plus (Applied Biosystems, by Life technologies, Kalifornija, ZDA) po navodilih proizvajalca. Reakcijski pogoji so navedeni v Preglednici III. Po končani reakciji smo s pomočjo računalniškega programa StepOne Software 2.1 odčitali rezultate. Krivulje vzorcev smo primerjali s krivuljo pozitivne kontrole in odčitali vrednosti Ct. Vzorce smo označili kot pozitivne, če se je specifični del nukleinske kisline virusa pomnoževal v reakciji PCR, če je bila prikazana Ct vrednost in pravilna krivulja, pri tem pa sta bili pozitivna in negativna kontrola ustrezni. V primeru neustrezne pozitivne ali negativne kontrole smo analizo ponovili.

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

---

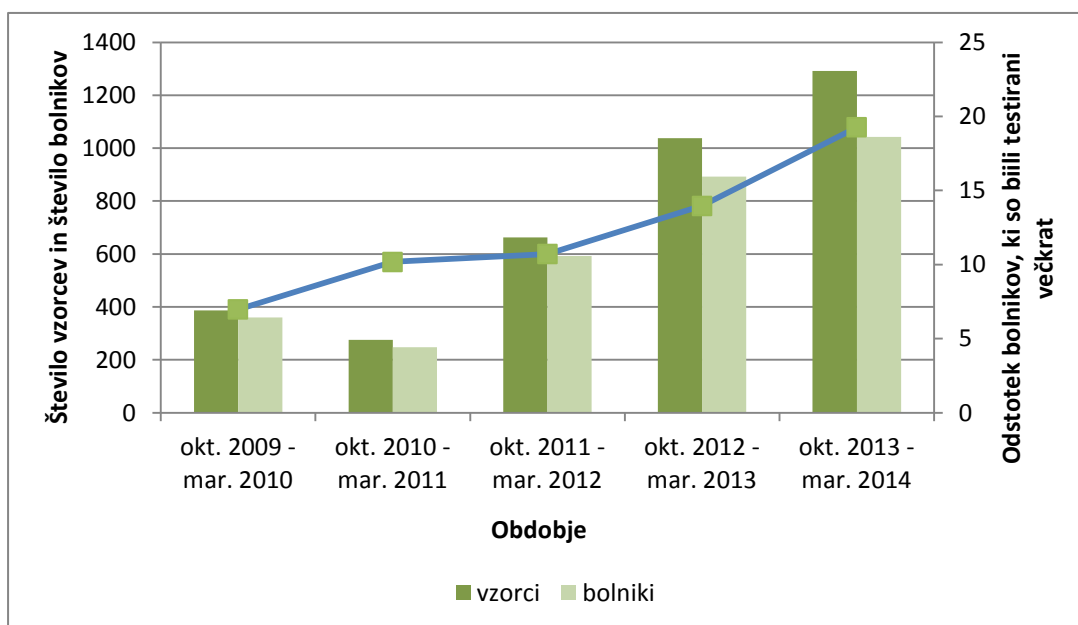
**Preglednica III:** Prikaz stopenj reakcije RT-PCR v realnem času za dokaz respiratornih virusov.

Proces	Čas	Temperatura	Število ciklov
Reverzna transkripcija	5 minut	50 °C	1
Inaktivacija reverzne transkripcije in začetna denaturacija	20 sekund	95 °C	1
Prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje verige	3 sekunde	95 °C	41
	30 sekund	60 °C	

## 4. Rezultati

### 4.1. Število opravljenih analiz v zadnjih petih letih

Slika 1 prikazuje podatke o številu analiz, ki jih je Laboratorij za diagnostiko virusnih infekcij (Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani) opravil v zadnjih petih letih. Podatki vključujejo vzorce vseh oseb, starejših od 65 let, ki so jih pregledali na prisotnost respiratornih virusov. Graf prikazuje število poslanih vzorcev in število bolnikov, prav tako pa tudi odstotke bolnikov, ki so bili testirani večkrat. Eno leto je v tem primeru opredeljeno kot sezona med 1. oktobrom in 31. marcem.



**Slika 1:** Prikaz števila vzorcev in števila bolnikov (primarna os - y) in odstotkov bolnikov, ki so bili testirani večkrat (sekundarna os - y), v obdobju 2009-2014.

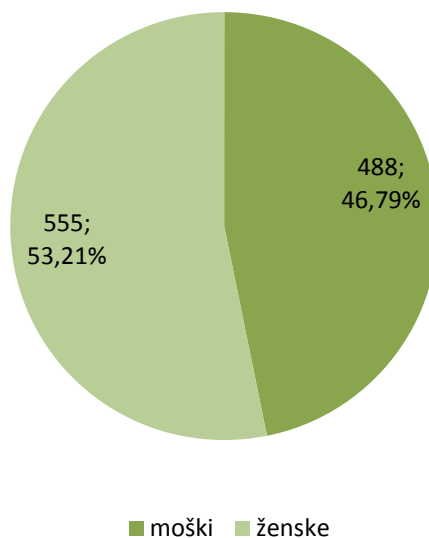
## 4.2. Lastnosti izbranih vzorcev

Za našo raziskavo smo izbrali vzorce bolnikov, ki so jih v obdobju med oktobrom 2013 in marcem 2014 poslali na analizo prisotnosti respiratornih virusov, pri čemer so bili vsi starejši od 65 let. V izbranem časovnem okviru je bilo poslanih 1292 vzorcev, 1043 različnih oseb. Kar 19,27% od teh je pripadalo bolnikom, ki so bili že testirani na respiratorne viruse. V izogib napačni interpretaciji rezultatov smo pri bolnikih, ki so imeli v več vzorcih prisoten enak virus, upoštevali le enega.

Pri statistični analizi primerjanih testnih metod pa smo upoštevali vse vzorce, torej vseh 1292. Na podlagi teh rezultatov smo izračunali povprečne vrednosti Ct, pregledali poslane vrste kužnin, sočasne okužbe in razporejenost virusov med meseci.

### 4.2.1. Porazdelitev bolnikov glede na spol in povprečno starost

Med bolniki je bilo 555 žensk in 488 moških, kar je statistično prikazano na Sliki 2. Povprečna starost testiranih preiskovancev je bila 78 let.

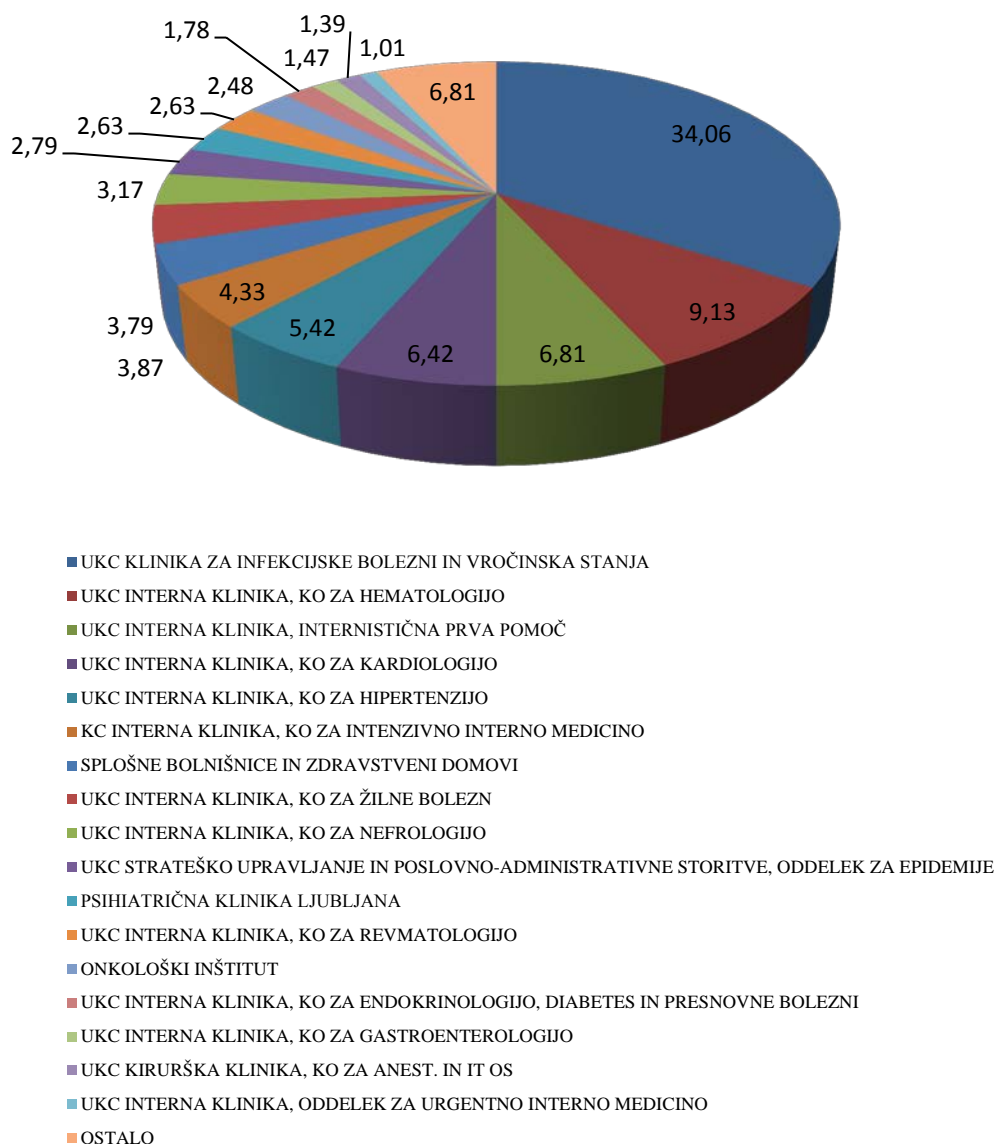


**Slika 2:** Porazdelitev preiskovancev glede na spol.



#### 4.2.2. Pošiljatelji vzorcev

Vzorci so v večini primerov poslali iz različnih oddelkov Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, najpogosteje s Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja (34,06%), Kliničnega oddelka za hematologijo (9,13%), Internistične prve pomoči (6,81%), Kliničnega oddelka za kardiologijo (6,42%) in Kliničnega oddelka za hipertenzijo (5,42%), kar je prikazano na Sliki 3. Pošiljatelje, ki so poslali manj kot 1% vseh vzorcev, smo združili v skupino »ostalo«.

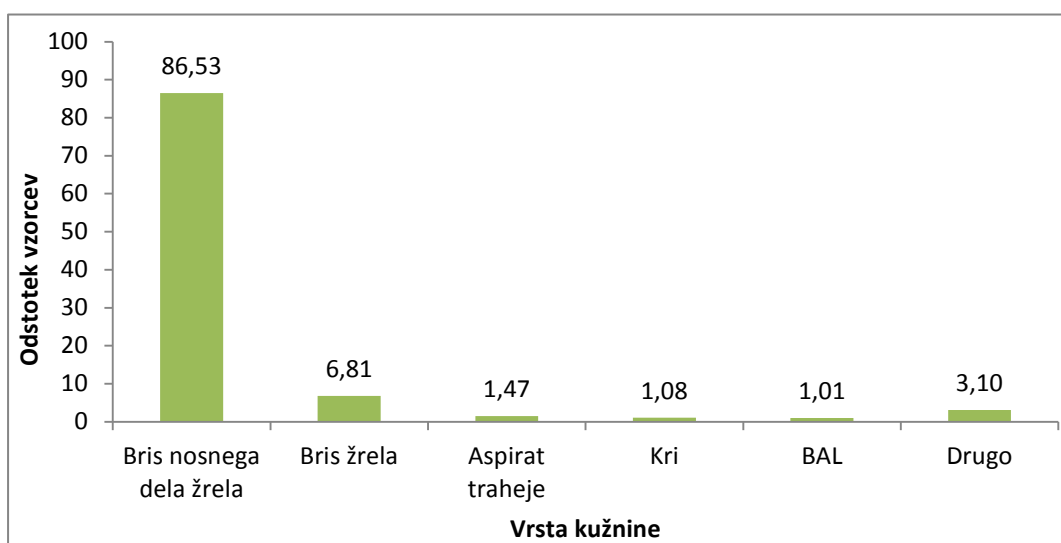


**Slika 3:** Porazdelitev analiziranih vzorcev glede na njihovega pošiljatelja.

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

### 4.2.3. Kužnine

Med poslanimi vzorci so prevladovali kužnine v obliki brisov nosnega dela žrela (86,53%), kar predstavlja Slika 4. Bris žrela, aspirat traheje, kri in bronhoalveolarna lavaža (BAL) so predstavljali več kot 1% vseh vzorcev. Ostale oblike kužnin (likvor, sputum, bris nosu, izpirek bronha, bris grla, košček pljuč ...) pa so bile poslani v manj kot 1%, zato smo jih združili v kategoriji »drugo«.



Slika 4: Deleži (%) analiziranih vzorcev glede na vrsto kužnine.

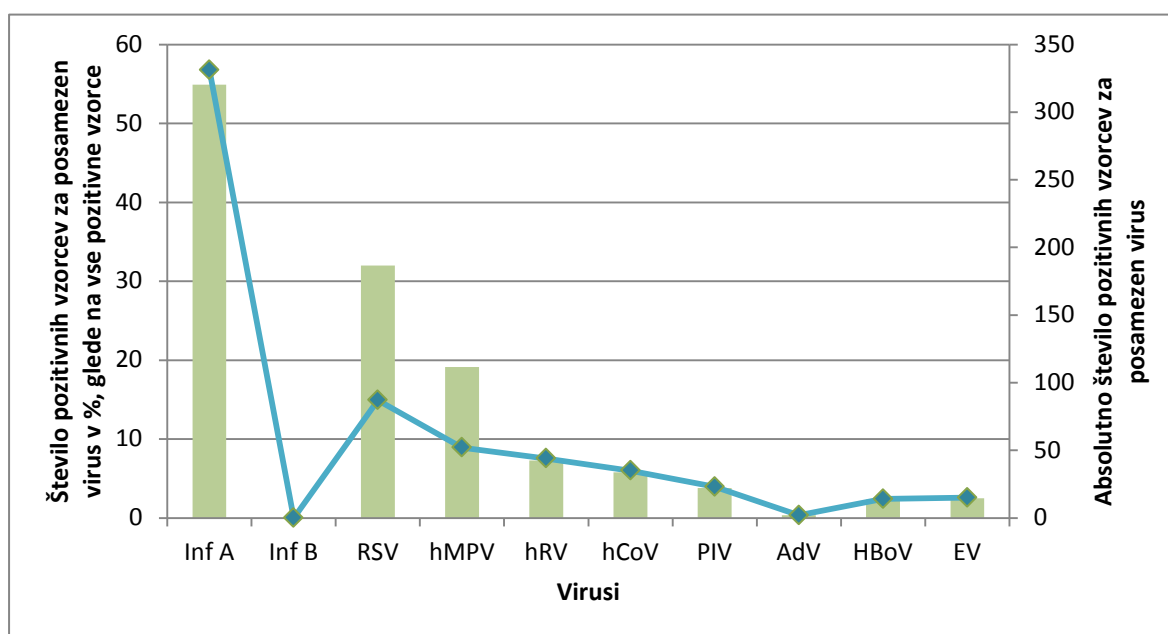
### 4.3. Pozitivni vzorci

Pri seštevku pozitivnih vzorcev znotraj izbranega časovnega okvira smo pri bolnikih, ki so imeli v več vzorcih prisoten enak virus, upoštevali le en vzorec. Povprečna starost bolnikov, ki so bili okuženi z vsaj enim respiratornim virusom, je bila 79 let. Med tistimi, okuženimi z vsaj enim respiratornim virusom, je bilo 256 moških in 289 žensk. Najpogosteje so se pri starejših pojavljali virusi Inf A, sledijo pa jim RSV, hMPV, hRV in hCoV. Ugotovitve prikazujeta Preglednica IV in Slika 5. Ostali virusi so se pojavljali pri manj kot 5% bolnikov. Virusov Inf B v naši raziskavi nismo zasledili.

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

**Preglednica IV:** Prisotnost respiratornih virusov pri bolnikih, starejših od 65 let.

	<b>Inf A</b>	<b>Inf B</b>	<b>RSV</b>	<b>hMPV</b>	<b>hRV</b>	<b>hCoV</b>	<b>PIV</b>	<b>HBoV</b>	<b>AdV</b>	<b>EV</b>
POZITIVNO	331	0	87	52	44	35	23	14	2	15
NEGATIVNO	712	1043	956	991	999	1008	1020	1029	1041	1028
Število pozitivnih vzorcev za posamezni virus v %, glede na vse pozitivne vzorce	54,89	0,00	14,43	8,62	7,30	5,80	3,81	2,32	0,33	2,49



**Slika 5:** Število pozitivnih vzorcev za posamezen virus v %, glede na vse pozitivne viruse (primarna os - y) in absolutno število pozitivnih vzorcev za posamezen virus (sekundarna os -y).

#### 4.4. Metode za analiziranje izbranih vzorcev

Na raziskavo celotnega panela respiratornih virusov (Panel RV) z metodo RT-PCR v realnem času je bilo poslanih 988 vzorcev. Zaradi suma na okužbo z virusi influence so poslali 304 vzorce. Od tega smo jih 80 testirali z metodo Simplexa, s katero dokazujemo prisotnost nukleinskih kislin virusov Inf A in B in RSV, 224 vzorcev pa smo analizirali na prisotnost nukleinskih kislin virusov Inf A in B z metodo RT-PCR v realnem času. V

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

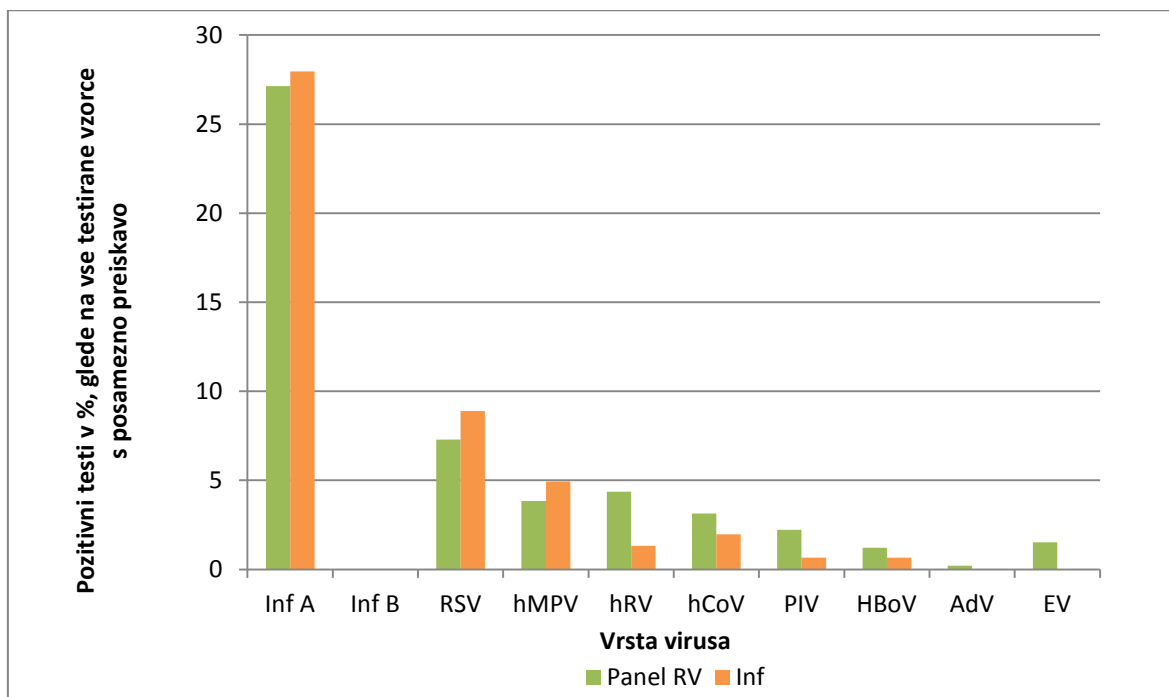
vzorcih, ki so jih poslali v analizo zaradi suma na okužbo z virusi gripe, smo z metodo RT-PCR v realnem času dokazovali prisotnost respiratornih virusov, ki predhodno še niso bili analizirani, in sicer RSV, hMPV, hRV, hCoV, PIV 1-3, HBoV, AdV in EV.

Med 1292 analiziranimi vzorci jih je bilo 698 (54%) negativnih na vse testirane viruse, 594 (46%) pa pozitivnih na vsaj enega od testiranih virusov. V 18,42% vzorcev (56 od 304), ki so jih poslali na analizo zaradi suma na okužbo z virusi influence, smo našli druge vrste respiratornih virusov iz panela PCR. Med temi smo najpogosteje potrdili RSV, sledili pa so jim hMPV, hCoV, hRV, PIV in HBoV. Virusov Inf B, AdV in EV v omenjenih vzorcih nismo odkrili. Rezultati so prikazani v Preglednici V in na Sliki 6.

**Preglednica V:** Vrste respiratornih virusov v vzorcih, poslanih na analizo celotnega panela respiratornih virusov (Panel RV) in tistih s sumom na okužbo z virusi influence (Inf).

		<b>Inf A</b>	<b>Inf B</b>	<b>RSV</b>	<b>hMPV</b>	<b>hRV</b>	<b>hCoV</b>	<b>PIV</b>	<b>HBoV</b>	<b>AdV</b>	<b>EV</b>
<b>Panel RV</b>											
	POZITIVNO	268	0	72	38	43	31	22	12	2	15
	NEGATIVNO	720	988	916	950	945	957	966	976	986	973
	% pozitivnih testov, glede na vse testirane vzorce s posamezno preiskavo	27,13	0,00	7,29	3,85	4,35	3,14	2,23	1,21	0,20	1,52
<b>Inf</b>											
	POZITIVNO	85	0	27	15	4	6	2	2	0	0
	NEGATIVNO	219	304	277	289	300	298	302	302	304	304
	% pozitivnih testov, glede na vse testirane vzorce s posamezno preiskavo	27,96	0,00	8,88	4,93	1,32	1,97	0,66	0,66	0,00	0,00

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

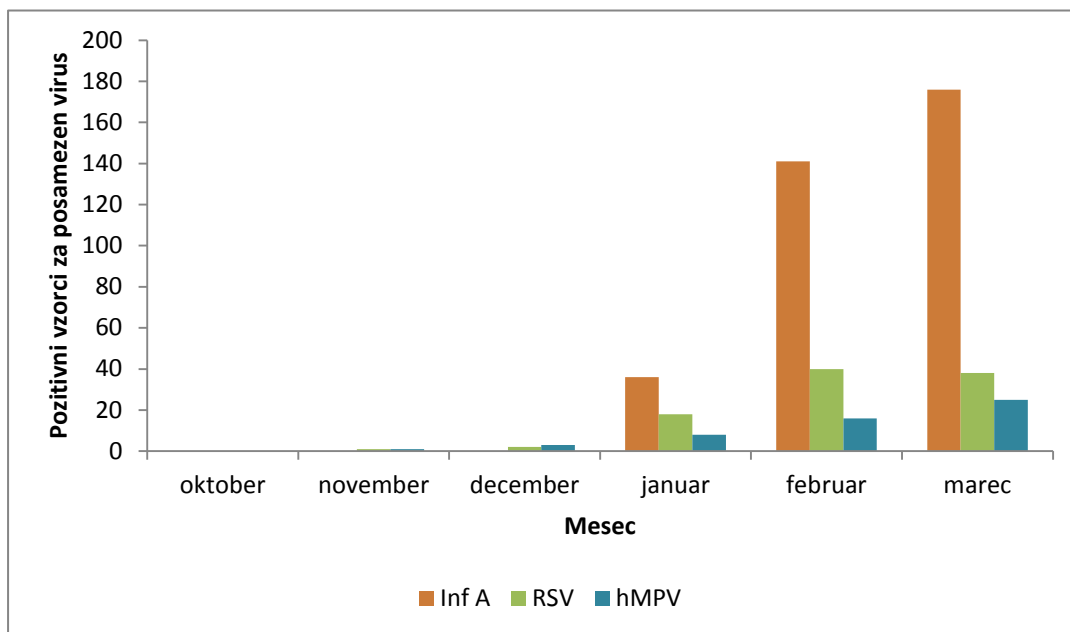


**Slika 6:** Grafični prikaz odstotkov pozitivnih vzorcev, glede na vse testirane vzorce s posamezno preiskavo.

#### 4.5. Sezonska porazdelitev virusov po mesecih

Okužbe dihal, ki jih povzročajo respiratorni virusi, so sezonsko porazdeljene, in sicer z vrhom v zimskem času. V Laboratoriju za diagnostiko virusnih infekcij (Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani) so v izbranem časovnem obdobju v mesecu februarju in marcu izvedli več kot dve tretjini (70,59%) vseh molekularnih analiz prisotnosti respiratornih virusov v vzorcih bolnikov starih nad 65 let. V teh dveh mesecih so odkrili kar 80,74% vseh pozitivnih vzorcev. Rezultati nakazujejo, da dosežejo virusi Inf A vrh okužbe prav v tem obdobju, saj so v februarju in marcu pri kar 89,80% vseh bolnikov dokazali njihovo prisotnost. Tudi drugi virusi so bili večinoma prisotni v tem časovnem okviru. Človeški rinovirusi so bili prisotni skozi celo zimsko sezono, predstavljajo pa najpogosteje dokazane respiratorne viruse v mesecu oktobru (85,71%). Petdeset odstotkov PIV smo odkrili v januarjskih, 60% EV pa smo odkrili v februarjskih vzorcih. Virusni Inf A, RSV in hMPV se pojavljajo v enakem časovnem obdobju, kar prikazuje Slika 7.

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.



**Slika 7:** Število pozitivnih vzorcev za viruse influence A, respiratorni sincicijski virus in človeški metapneumovirus v posameznih mesecih.

#### 4.6. Sočasne virusne okužbe

Med preiskovanimi vzorci jih je bilo 8,05% pozitivnih na več virusov hkrati. V večini vzorcev sta bila prisotna dva virusa, dva vzorca pa sta bila pozitivna na tri. Največ sočasnih okužb je bilo pri okužbi s hRV, pri čemer smo v 13 primerih zaznali sočasno prisotnost EV. Ker pa je diagnostika človeških rinovirusov in enterovirusov kompleksna zaradi njihove velike genomske podobnosti in velikega števila serotipov v obeh skupinah, težko določimo, ali gre za sočasne okužbe ali le za enega samega povzročitelja. HBoV je bil sočasno prisoten v 57,14% pozitivnih vzorcih, EV v 86,67%. Okužbo z AdV smo odkrili le pri dveh bolnikih, pri obeh pa je šlo za sočasno okužbo. Število in vrste sočasnih okužb so predstavljene v Preglednicah VI in VII. Visoke vrednosti Ct nakazujejo, da so HboV, AdV in EV tisti, ki se najpogosteje pojavljajo sočasno z drugimi virusi, kar prikazuje Preglednica VIII. Več sočasnih okužb smo odkrili v vzorcih, ki so jih poslali na analizo celotnega panela virusnih povzročiteljev okužb dihal.

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

**Preglednica VI:** Število in vrste sočasnih okužb v vzorcih, analiziranih s panelom RV.

Panel RV	InfA	InfB	RSV	hMPV	hRV	hCoV	PIV	HBoV	AdV	EV
InfA		0	5	3	2	4	0	3	0	0
InfB	0		0	0	0	0	0	0	0	0
RSV	5	0		1	1	5	0	2	1	0
hMPV	3	0	1		0	1	1	0	1	0
hRV	2	0	1	0		0	1	0	0	13
hCoV	4	0	5	1	0		0	0	1	0
PIV	0	0	0	1	1	0		1	0	0
HBoV	3	0	2	0	0	0	1		0	0
AdV	0	0	1	1	0	1	0	0		0
EV	0	0	0	0	13	0	0	0	0	

**Preglednica VII:** Število in vrste sočasnih okužb v vzorcih, poslanih zaradi suma na okužbo z virusi Inf A in B.

Sum na Inf	InfA	InfB	RSV	hMPV	hRV	hCoV	PIV	HBoV	AdV	EV
InfA		0	2	2	0	0	0	0	0	0
InfB	0		0	0	0	0	0	0	0	0
RSV	2	0		0	0	0	0	0	0	0
hMPV	2	0	0		0	0	1	1	0	0
hRV	0	0	0	0		0	0	0	0	0
hCoV	0	0	0	0	0		0	0	0	0
PIV	0	0	0	1	0	0		0	0	0
hBoV	0	0	0	1	0	0	0		0	0
AdV	0	0	0	0	0	0	0	0		0
EV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

**Preglednica VIII:** Povprečne vrednosti Ct, določene za vsak posamezen virus.

Virus	Inf A	Inf B	RSV	hMPV	hRV	hCov	PIV	HBoV	AdV	EV
Vrednost Ct	27,66	/	27,66	27,62	27,6	27,39	27,37	30,23	34,4	30,98

## 5. Razprava

### 5.1. Naraščanje števila molekularnih analiz za dokazovanje virusnih povzročiteljev okužb dihal pri starejših

Rezultati kažejo jasen trend povečevanja števila analiz za dokaz virusnih povzročiteljev okužb dihal pri starejših. Izjema je bilo leto 2011, ko je bilo opravljenih manj raziskav kot v letu 2010, kar pa verjetno lahko pripišemo pandemiji gripe H1N1 v obdobju 2009/10 (7). Prav tako se povečuje tudi delež bolnikov, ki jih v eni sezoni večkrat testirajo na prisotnost respiratornih virusov (Slika 1).

Zdravniki se pri postavitvi diagnoze vse bolj opirajo na laboratorijske rezultate, saj so klinični znaki pri starejših ljudeh lahko slabo izraženi. Molekularne metode so z razvojem biomedicine postale hitrejše, cenejše in zanesljivejše, z njihovo uporabo pa se je zmanjšalo število lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov (2, 25, 53).

### 5.2. Lastnosti izbranih vzorcev

Izbrali smo vzorce bolnikov, starejših od 65 let, ki so jih v obdobju med oktobrom 2013 in marcem 2014 poslali na dokaz prisotnosti virusnih povzročiteljev okužb dihal v Laboratorij za diagnostiko virusnih infekcij (Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani). Povprečna starost bolnikov je bila 78 let, med njimi je bilo 488 moških (46,79%) in 555 žensk (53,21%) - Slika 2. Poleg podatkov o spolu in starosti bolnikov smo imeli na voljo tudi podatke o pošiljatelju, vrsti kužnine in času izvedbe analize. Informacij o kliničnih znakih, številu dni v bolnišnici in možnih smrtnih primerih pa nismo imeli, saj je šlo za retrospektivno raziskavo, s katero smo želeli v prvi vrsti ugotoviti pogostost pojavljanja respiratornih virusov v populaciji oseb, starejših od 65 let.

Vzorci so v večini primerov pripadali bolnikom Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani (Slika 3). Največ jih je prispelo s Klinike za infekcijske bolezni in vročinska stanja (34,06%), Kliničnega oddelka za hematologijo (9,13%), Internistične prve pomoči (6,81%), Kliničnega oddelka za kardiologijo (6,42%) in Kliničnega oddelka za hipertenzijo (5,42%). Znano je, da imajo osebe s pljučnimi in srčnimi zapleti ter imunsko oslABLjeni posamezniki večjo možnost za okužbe, kar kažejo tudi naši rezultati. Pri tem izstopa



Psihiatrična klinika Ljubljana, od koder so v analizo poslali 2,63% oz. 34 vzorcev. Kar 64,71% od teh vzorcev (22) je bilo pozitivnih na viruse influence A, v dveh smo dokazali sočasno okužbo s človeškim metapneumovirusom in človeškimi koronavirusi. Drugih respiratornih virusov nismo potrdili. Rezultati kažejo na epidemijo virusa influence A, ki je izbruhnila v sredini januarja (13/20 pozitivnih vzorcev). V februarskih vzorcih influence A nismo dokazali, v zadnjem tednu marca pa smo odkrili nov izbruh okužb (9/12 pozitivnih vzorcev) v tej ustanovi.

Najpogostejša oblika poslane kužnine je bil bris nosnega dela žrela (86,53% - Slika 4). Podatki iz literature kažejo, da je bris nosnega dela žrela vzorec izbire pri starejših osebah (15, 25, 32). V zadnjih raziskavah na odraslih pa ugotavljajo, da se občutljivost molekularnih metod izredno poveča, če se kot vzorec izbere sputum (55). Aspirate, ki se najpogosteje uporabljajo pri otrocih, starejši slabo tolerirajo, še posebej bolniki z demenco. Tudi bris žrela je ustrezen vzorec, saj povzroči najmanj nelagodja za bolnika, vendar pa je koncentracija virusa v njem nižja kot v brisu nosnega dela žrela (25).

Pri sedmih bolnikih smo hkrati testirali vsaj tri različne tipe kužnin, in sicer bris nosnega dela žrela, vensko kri, odvzeto v EDTA, aspirat traheje ali bronhoalveolarno lavažo (BAL). Pri treh od štirih bolnikov, pri katerih smo hkrati testirali aspirat traheje, vensko kri in bris nosnega dela žrela, smo najvišje koncentracije virusa dokazali v aspiratih traheje, manj v brisih nosnega dela žrela, v krvi pa smo ga lahko dokazali le pri enem bolniku, a je bila njegova koncentracija zelo nizka. V vzorcih, v katerih smo hkrati testirali vse štiri zgoraj naštetih kužnin, smo najvišje koncentracije virusa odkrili v vzorcih aspirat traheje in BAL. Odvzem aspirata traheje in BAL pa sta za bolnike lahko boleča in stresna. Pri šestih od sedmih testiranih bolnikov smo tudi v brisu nosnega dela žrela dokazali prisotnost virusa, a je bila njegova koncentracija nekoliko nižja. V enem primeru smo virus dokazali le v aspiratu traheje, pri tem pa je bila vrednost Ct zelo visoka, in sicer 38,79. To nakazuje, da je bris nosnega dela žrela dejansko najustreznejša kužnina, saj lahko z njo pridobimo zadostno koncentracijo virusa za dokaz njihove prisotnosti, pri tem pa bolniku ne povzročamo dodatnih bolečin in stresa.

### 5.3. Respiratorni virusi pri starejših osebah

Pri starostnikih, ki so bili sprejeti v bolnišnico in pri katerih smo dokazali prisotnost virusa, se glede na naše ugotovitve najpogosteje pojavljajo virusi influence A (54,89%), respiratorni sincicijski virus (14,43%), človeški metapnevmovirus (8,62%), človeški rinovirusi (7,3%), človeški koronavirusi (5,30%), virusi parainfluence 1-3 (3,81%), enterovirusi (2,49%), človeški bokavirus (2,32%) in adenovirusi (0,33%). Virusov influence B v preiskovanem časovnem obdobju pri starostnikih nismo zasledili (Slika 5). Več kot polovica okuženih bolnikov je imela viruse influence A. Veliko število okuženih bolnikov z virusi influence A lahko pripišemo zelo nizki precepljenosti slovenskih starostnikov. V sezoni 2012/13 se jih je cepilo le 16,8%, kar je 4,4% manj kot leto prej (56). Znano je, da so že nizke koncentracije virusov influence A in respiratornega sincicijskega virusa klinično pomembne, saj lahko povzročajo resne zaplete, zato največje število starostnikov, okuženih z virusi influence A ali respiratornim sincicijskim virusom, ki so bili sprejeti v bolnišnico, ni presenetljivo. Človeške rinoviruse smo odkrili pri 7,3% preiskovancev. V literaturi smo v večini primerov zasledili nižje odstotke bolnikov, okuženih z virusi influence A in respiratornim sincicijskim virusom, in večje odstotke tistih, okuženih s človeškimi rinovirusi. Pierangeli in sodelavci so prav tako testirali osebe, starejše od 65 let v mesecih februarju in marcu, in sicer v letih 2009 in 2010. Viruse influence A so zaznali v 24% vzorcev, respiratorni sincicijski virus v manj kot 2%, človeške rinoviruse pa v povprečju v 12% vzorcev (32). Nižje odstotke bolnikov, okuženih z virusi influence A in respiratornim sincicijskim virusom, ki so jih odkrili, lahko pripišemo temu, da so testirali vse osebe z znaki okužb dihal na urgentni enoti, mi pa smo v analizo vključili vse osebe, ki so bile sprejete v bolnišnico, prav tako pa je možno, da so bili njihovi preiskovanci bolj precepljeni proti virusom influence kot naši. Večje število bolnikov, okuženih s človeškimi rinovirusi, lahko pripišemo dejstvu, da ti pogosteje povzročajo prehlade, redkeje pa so razlog za bolnišnično zdravljenje.

Absolutno primerjanje naših rezultatov z izsledki drugih raziskav ni smiselno, saj smo preiskovali starostnike, ki so bili sprejeti v bolnišnico, in za katere sklepamo, da imajo večje število virusnih obolenj kot ostale starejše osebe. V naši raziskavi smo zajeli časovno obdobje med oktobrom in marcem. Ker so človeški rinovirusi prisotni skozi celo leto,

predvidevamo, da bi jih v raziskavi, ki bi zajela vseh dvanajst mesecev, najverjetneje dokazali pri večjem številu bolnikov.

#### 5.4. Prisotnost respiratornih virusov pri osebah s sumom na gripo

V vzorcih dihalnih poti bolnikov, ki so jih poslali v analizo zaradi suma na okužbo z virusi influence, smo prisotnost drugega respiratornega virusa odkrili v 18,42%. V vzorcih bolnikov, ki so jih poslali na testiranje zaradi suma na gripo, prisotnost virusov influence A nismo ugotovili pogosteje kot v vzorcih tistih, ki smo jih analizirali na celotni panel respiratornih virusov (27,96% in 27,13% - Slika 6). Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo, da so pri starostnikih klinični znaki zelo neznačilni in so sumi, da gre za okužbo z virusi influence, pogosto napačni. Okužbe, ki jih povzročajo virusi influence in respiratorni sincicijski virus, imajo namreč podoben potek bolezni, podobne klinične znake, epidemije pa pogosto potekajo sočasno. Epidemijam respiratornega sincicijskega virusa sledijo epidemije človeškega metapneumovirusa, ki se prav tako pogosto pojavljajo pri starejših. Pravilna diagnoza omogoča ustrezno zdravljenje, preprečitev prenosa virusov na ostale bolnike in zdravstveno osebje ter preprečitev nepotrebnega zdravljenja z antibiotiki. Testiranje na celotni panel respiratornih virusov je pomembno s treh vidikov. Prvič, na podlagi simptomov je zelo težko določiti, kateri virus je prisoten. Drugič, za viruse, za katere so predvidevali, da povzročajo le lažja obolenja zgornjih dihal, danes velja, da so lahko povzročitelji težkih okužb dihal. Tretjič, pomen sočasnih okužb z več virusi ostaja neznan, pri čemer je možno poslabšanje simptomov (2).

Za ugotavljanje prisotnosti virusov je trenutno najboljša metoda RT-PCR v realnem času, saj omogoča hitro in zanesljivo analizo, prav tako pa je možna njihova hkratna detekcija. Razvijajo tudi metode PCR nove generacije, ki vključujejo osamitev in pomnoževanje nukleinskih kislin, rezultate pa dobimo že v eni uri. Poleg tega PCR nove generacije omogoča tudi odkrivanje novih virusnih povzročiteljev. Pričakujemo lahko, da bo razvoj teh metod doprinesel k dodatnim izboljšavam v zaznavanju virusov, možno pa bo tudi hkratno testiranje večjega števila vzorcev in večjega števila virusov in celo njihovih podtipov. Kljub temu pa bo RT-PCR v realnem času v svojem trenutnem obsegu še nekaj časa del rutinske laboratorijske prakse (2, 18, 19, 25, 51).

S staranjem prebivalstva se povečuje tudi število okužb z respiratornimi virusi pri starejših. Okužbe dihal pri starostnikih so pogost razlog za sprejem v bolnišnico in obremenjevanje zdravstvene blagajne, zato je dobro poznavanje pogostosti pojavljanja respiratornih virusov nujno potrebno. S pomočjo podatkov o številu sprejemov v bolnišnico in številu okuženih starostnikov z respiratornimi virusi bi lahko spremenili smernice za laboratorijska testiranja, spodbudili razvoj cepiv za preprečevanje okužb in razvoj zdravil za zdravljenje tovrstnih okužb.

### 5.5. Sezonska porazdelitev virusov po mesecih

Večina virusov se je v obdobju 2013/2014 pojavljala v mesecih februarju in marcu, ko smo določili kar 80,74% pozitivnih vzorcev na respiratorne viruse, najmanj pozitivnih vzorcev pa je bilo v mesecu novembru. Rezultati raziskave kažejo na vrh okužb z virusi influence A v mesecu februarju in marcu, saj je bilo takrat kar 89,80% vseh vzorcev pozitivnih na viruse influence A.

Dokazali smo, da epidemije virusov influence, respiratornega sincicijskega virusa in človeškega metapneumovirusa sovpadajo (Slika 7). Če bi želeli podrobneje spremljati, v katerih časovnih obdobjih so epidemije posameznih respiratornih virusov pogostejše, bi morali imeti na voljo podatke za več zaporednih let, prav tako pa bi morali pri interpretaciji rezultatov upoštevati tudi povprečne mesečne temperature, saj so ugotovili, da so tovrstne epidemije močno odvisne od temperatur in relativne vlažnosti zraka (4, 5).

Človeški rinovirusi in adenovirusi se pojavljajo skozi vse leto, v literaturi poročajo tudi o epidemijah človeškega metapneumovirusa v poletnem času, zato je smiselno, da testiranje na celoten panel respiratornih virusov izvajamo skozi celo leto (2, 13).

## 5.6. Sočasne virusne okužbe

Med vsemi preiskovanimi vzorci jih je 8,05% vsebovalo več kot en virus. Tudi v literaturi navajajo, da so sočasne okužbe prisotne v približno 10% vzorcev (2). V večini preiskovanih kužnin sta se hkrati pojavljala dva virusa, le v 2 vzorcih smo našli tri različne viruse. V 13 primerih smo hkrati dokazali človeške rinoviruse in enteroviruse, kar gre pripisati dejstvu, da oba spadata v družino pikornavirusov, imata enako genomsko organizacijo in veliko podobnost v nukleotidnih zaporedjih (6).

Adenoviruse, človeški bokavirus in enteroviruse smo pri starostnikih zasledili le redko. Prvi so bili prisotni pri 0,33% (2/1043), drugi pri 2,32% (14/1043) in tretji pri 2,49% bolnikov (15/1043). Človeški bokavirus se je sočasno pojavljal v 57,14% pozitivnih vzorcev, enterovirusi pa v 86,67%. Adenoviruse smo odkrili le pri 2 bolnikih, pri obeh pa je šlo za sočasno okužbo. Vsi trije omenjeni virusi so imeli tudi visoke vrednosti Ct. Vse to nakazuje, da gre za viruse, ki so ponavadi prisotni sočasno z drugimi virusi. Pri analizi pojavljanja respiratornih virusov na severu Anglije med leti 2007 in 2012 so ugotovili, da so bili bolniki s sočasnimi okužbami večkrat sprejeti v bolnišnico, prav tako pa je bila višja tudi njihova smrtnost. Preiskava je zajela bolnike vseh starosti, sočasne okužbe pa so se večinoma pojavljale pri otrocih, mlajših od 5 let (83,5%) (57). Zaenkrat ostaja še vedno neraziskano, v kolikšni meri sočasne okužbe vplivajo na potek bolezni pri starostnikih. Potrebne bodo dodatne raziskave o tem, kaj pomenijo visoke vrednosti Ct v kliničnem smislu, če sploh kaj.

## 5.7. Stik med dvema generacijama

Postavlja se vprašanje stikov med dvema generacijama – med majhnimi otroci in njihovimi starimi starši. Obe starostni skupini sta bolj dovzetni za virusne okužbe dihal, bližnji stiki med otroci in starimi starši pa omogočajo lažji prenos virusov. Kljub povečanju števila cepljenih starostnikov proti virusom influence po svetu se število okuženih ne zmanjšuje, kar gre pripisati slabi učinkovitosti cepiva pri starejši populaciji. Ker so otroci najverjetneje glavni prenašalci virusov zaradi bližnjih stikov v šoli in vrtcu, so ugotovili, da lahko s cepljenjem otrok v določeni meri preprečimo širjenje virusa. Ker pa so taki programi zelo dragi in slabo sprejeti s strani ljudi, so raziskovalci preizkusili socialno

Kotnik E: Dokazovanje virusnih okužb z metodo verižne reakcije s polimerazo pri starostnikih z okužbo dihal.

---

distanciranje starejših. V prvi vrsti so ugotavljali, kako omejitev stikov med otroci in starimi starši vpliva na prenos virusov influence. Ugotovili so, da je kar 50 % okužb starejših z virusi influence A povzročenih z bližnjimi stiki z okuženimi otroci (58).

Cepljenje ogroženih skupin in zmanjšanje stikov v času epidemij lahko pripomore k zmanjšanju števila okužb, a bodo potrebne še dodatne raziskave na tem področju.

### **5.8. Pomanjkljivosti naše raziskave**

Glavna pomanjkljivost naše raziskave je, da imamo zgolj osnovne podatke o bolniku, in sicer starost, spol, pošiljatelja in vrsto kužnine. Vsi ostali podatki, naprimer klinični znaki, število dni v bolnišnici, možni smrtni primeri in število cepljenih preiskovancev proti virusu gripe niso znani. Te podatke smo iskali v tuji literaturi in zgolj povzeli njihove ugotovitve. Poleg tega smo analizirali le vzorce, prejete med oktobrom in marcem, ostalih 6 mesecev v naši raziskavi nismo zajeli. Z izbiro časovnega okvira smo se osredotočili na mesece, kjer je število okužb z respiratornimi virusi največje, vendar pa nismo upoštevali mesecev, ko se lahko določeni virusi, ki so prisotni skozi celo leto, tudi pojavljajo.

## 6. Sklep

- Število molekularnih analiz povzročiteljev virusnih okužb dihal pri starejših se vsako leto povečuje. Zdravniki se vse bolj opirajo na laboratorijske rezultate, saj klinični znaki okužbe pri starejših niso značilni.
- Pri starostnikih, ki so bili sprejeti v bolnišnico, se najpogosteje pojavljajo virusi influence A, sledijo respiratorni sincicijski virus, človeški metapnevmovirus, človeški rinovirusi, človeški koronavirusi, virusi parainfluence, enterovirusi, človeški bokavirus in adenovirusi. Visoko število okuženih bolnikov z virusi influence A (več kot 50%) lahko pripišemo zelo nizkemu številu cepljenih starostnikov proti virusom influence v Sloveniji.
- Skoraj vsak peti vzorec, poslan na analizo zaradi suma na okužbo z virusi influence, je bil pozitiven na enega izmed ostalih respiratornih virusnih povzročiteljev. Okužbe, ki jih povzročajo virusi influence, respiratorni sincicijski virus in človeški metapnevmovirus, imajo podoben potek bolezni, podobne klinične znake, epidemije pa potekajo sočasno.
- Pravilna diagnoza omogoča ustrezno zdravljenje, preprečitev prenosa virusov na ostale bolnike in zdravstveno osebje ter preprečitev nepotrebnega zdravljenja z antibiotiki. Za testiranje je trenutno najboljša metoda RT-PCR v realnem času, saj omogoča hitro in zanesljivo analizo, prav tako pa je možna hkratna analiza večih različnih virusov.
- Najpogostejša kužnina je bris nosnega dela žrela, poslan je bil v kar 86,53%. Raziskava je pokazala, da je bris nosnega dela žrela vzorec izbire, saj lahko pridobimo zadostno koncentracijo virusa za pravilno analizo, pri tem pa bolniku ne povzročamo dodatnih bolečin in stresa.
- Adenoviruse, človeški bokavirus in enteroviruse smo pri starostnikih zasledili redko, v večini primerov so imeli bolniki poleg naštetih virusov prisotne tudi okužbe z drugimi virusi. Prav tako so imeli našteti virusi visoke vrednosti Ct. Vse naštetje nakazuje, da so AdV, HBoV in EV pri starostnikih večinoma prisotni kot sočasne okužbe, redkeje pa povzročajo primarno okužbo.

## 7. Literatura

1. Kahn JS: Epidemiology of Human Metapneumovirus. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(3): 546-57.
2. Olofsson S, Brittain-Long R, Andersson LM, Westin J, Lindh M: PCR for detection of respiratory viruses: seasonal variations of virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011; 9(8): 615-26.
3. Poljak M, Petrovec M: *Medicinska virologija, Med razgl*, 2011.
4. Mäkinen TM, Juvonen R, Jokelainen J, Harju TH, Peitso A, Bloigu A, Silvennoinen-Kassinen S, Leinonen M, Hassi J: Cold temperature and low humidity are associated with increased occurrence of respiratory tract infections. *Resp Med* 2009; 103(3): 456-62.
5. Lowen AC, Mubareka S, Steel J, Palese J: Influenza Virus Transmission Is Dependent on Relative Humidity and Temperature. *PLOS Pathog* 2007; 3(10): 1470-76.
6. Koren S, Avšič-Županc T, Drinovec B, Marin J, Poljak M: *Splošna medicinska virologija, Med razgl*, 2007.
7. CDC pandemija influence: <http://www.cdc.gov/flu/pastseasons/0910season.htm>
8. Jamshed N, Woods C, Desai S, Dhanani S, Taler G: Pneumonia in the Long-Term Resident. *Clin Geriatr Med* 2011; 27: 117-33.
9. Ellis SE, Coffeey CS, Mitchel EF, Dittus RS, Griffin MR.: Influenza- and Respiratory Syncytial Virus-Associated Morbidity and Mortality in the Nursing Home Population. *JAGS* 2003; 51: 761-67.
10. Martinello RA, Chen MD, Weibel C, Kahn JS: Correlation between respiratory syncytial virus genotype and severity of illness. *J Infect Dis* 2002; 186(6): 839-42.
11. Hall CB: Nosocomial Respiratory Syncytial Virus Infections: The »Cold War« Has Not Ended. *Clin Infect Dis* 2000; 31(2): 590-96.
12. Van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RAM, Osterhaus ADME: A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001; 7: 719-24.



13. Louie JK, Schnurr DP, Pan CY, Kiang D, Carter C, Tougaw S, Ventura J, Norman A, Belmusto V, Rosenberg J, Trochet G: A Summer Outbreak of Human Metapneumovirus Infection in a Long-Term-Care Facility. *J Infect Dis*; 196: 705-8.
14. Uršič T, Jevšnik M, Žigon N, Krivec U, Borinc Beden A, Praprotnik M, Petrovec M: Human Bocavirus and Other Respiratory Viral Infections in a 2-Year Cohort of Hospitalized Children. *J Med Virol* 2012; 84: 99-108.
15. Boivin G, De Serres D, Hamelin ME, Cote S, Argouin M, Tremblay G, Maranda-Aubut R, Sauvageau C, Ouakki M, Boulianne N, Couture C : An Outbreak of Severe Respiratory Tract Infection Due to Human Metapneumovirus in a Long-Term Care Facility. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1052-58.
16. Brittain-Long R, Westin J, Olofsson S, Lindh M, Andersson LM: Prospective evaluation of a novel multiplex real-time PCR assay for detection of fifteen respiratory pathogens – Duration of symptoms significantly affects detection rate. *J Clin Virol* 2010; 47(3): 263-67.
17. Birch CJ, Clothier HJ, Seccull A, Tran T, Catton MC, Lambert SB, Druce JD: Human coronavirus OC43 causes influenza-like illness in residents and staff of aged-care facilities in Melbourne, Australia. *Epidemiol Infect* 2005; 133: 273-77.
18. Jartti L, Langen H, Söderlund-Venermo M, Vuorinen T, Ruuskanen O, Jartti T: New Respiratory Viruses and the Elderly. *Open Respir Med J* 2011; 5: 61-69.
19. Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP: *Brock Biology of Microorganisms*, 13. izdaja, Pearson, 2012.
20. CDC spletna stran MERS: <http://www.cdc.gov/CORONAVIRUS/MERS/>
21. 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: 365.
22. Uršič T, Petrovec M: Človeški bokavirus (HBoV): novi parvovirus. *Zdrav Vestn* 2012; 81: 302-5.
23. Uršič T, Steyer A, Kopriva S, Kalan G, Krivec U, Petrovec M: Human Bocavirus as the Cause of a Life-Threatening Infection. *J Clin Microbiol* 2011; 49(3): 1179-81.

24. Larbi A, Franceschi C, Mazzatti D, Solana R, Wikby A, Pawelec G: Ageing of the Immune System as a Prognostic Factor for Human Longevity. *Physiology* 2008; 23: 64-74.
25. Talbot HK, Falsey AR: The Diagnosis of Viral Respiratory Disease in Older Adults. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 747-51.
26. Petrovec M: Spopad z virusi, ki povzročajo okužbe dihal. Delo 2013.
27. Beck-Sague C, Banerjee S, Jarvis WR: Infectious Diseases and Mortality among US Nursing Home Residents. *Am J Public Health* 1993; 83(12): 1739-42.
28. Utsumi M, Makimoto K, Quroshi N, Ashida N: Types of infectious outbreaks and their impact in elderly care facilities: a review of the literature. *Age ageing* 2010; 39(3): 299-305.
29. Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE: Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med* 2005; 352: 1749-59.
30. Cotter M, Donlon S, Roche F, Byrne H, Fitzparick F: Healthcare-associated infection in Irish long-term care facilities: results from the First National Prevalence Study. *J Hosp Infect* 2012; 80: 212-16.
31. Lejko Zupanc T: Okužbe v domovih za starejše občane. *Med Razgl* 2013; 52: S 6: 67-73.
32. Pierangeli A, Scagnolari C, Selvaggi C, Verzaro S, Spina MT, Bresciani E, Antonelli G, Bertazzoni G: Rhinovirus Frequently Detected in Elderly Adults Attending an Emergency Department. *J Med Virol* 2011; 83: 2043-47.
33. Falsey AR, Walsh EE: Respiratory Syncytial Virus Infection in Adults. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(3): 371-84.
34. Lee N, Lui GC, Wong KT, Li TCM, Tse ECM, Chan JYC, Yu J, Wong SSM, Choi KW, Wong RYK, Ngai KLK, Hui DSC, Chan PKS: High Morbidity and Mortality in Adults Hospitalized for Respiratory Syncytial Virus Infections. *Clin Infect Dis* 2013; 57(8): 1069-77.
35. Zhou H, Thompson WW, Viboud CG, Ringholz CM, Cheng PY, Steiner C, Abedi GR, Anderson LJ, Brammer L, Shay DK: Hospitalizations Associated With Influenza and Respiratory Syncytial Virus in the United States, 1993-2008. *Clin Infect Dis* 2012; 54: 1427-36.

36. Sundaram ME, Meece JK, Sifakis F, Gasser Jr RA, Belongia EA: Medically Attended Respiratory Syncytial Virus Infections in Adults Aged >50 Years: Clinical Characteristics and Outcomes. *Clin Infect Dis* 2014; 58: 342-49.
37. Camargo CA, Ginde AA, Clark S, Cartwright CP, Falsey AR, Niewoehner DE: Viral pathogens in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Intern Emerg Med* 2008; 3: 355-59.
38. Widmer K, Zhu Y, Williams JV, Griffin MR, Edwards KM, Talbot HK: Rates of Hospitalizations for Respiratory Syncytial Virus, Human Metapneumovirus and Influenza Virus in Older Adults. *J Infect Dis* 2012; 206(1): 56-62.
39. Falsey AR, Walsh EE, Hayden FG: Rhinovirus and Coronavirus Infection-Associated Hospitalizations among Older Adults. *J Infect Dis* 2002; 185: 1338-41.
40. El-Sahl HM, Atmar RL, Glezen WP, Greenberg SB. Spectrum of clinical illness in hospitalized patients with "common cold" virus infections. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 96-100.
41. Paranhos-Baccala G, Komurian-Pradel F, Richard N, Vernet G, Lina B, Floret D. Mixed respiratory virus infections. *J Clin Virol* 2008; 43(4): 407-10.
42. Mrvič T, Pečavar B, Petrovec M: Bolnišnične okužbe z virusom gripe. *Med Razgl* 2013; 52: S 6: 287-91.
43. CDC spletna stran Inf: <http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/>
44. Centers for Disease Control and Prevention: Estimates of Deaths Associated with Seasonal Influenza – United States, 1976-2007. *MMWR* 2010; 59(33): 1057-62.
45. Waghmare A, Campbell AP, Xie H, Seo S, Kuypers J, Leisenring W, Jerome KR, Englund JA, Boeckh M: Respiratory Syncytial Virus Lower Respiratory Disease in Hematopoietic Cell Transplant Recipients: Viral RNA Detection in Blood, Antiviral Treatment, and Clinical Outcomes. *Clin Infect Dis* 2013; 57: 1731-41.
46. Wendelboe A, Avery C, Andrade B, Baumbach J, Landen MG: Importance of Employee Vaccination against Influenza in Preventing Cases in Long-Term Care Facilities. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011; 32(11).
47. Stupica D, Lusa L, Petrovec M, Žigon N, Jevšnik M, Bogovič P, Strle F: Respiratory viruses in patients and employees in an intensive care unit. *Infection* 2012; 40: 381-88.

48. Mrvič T, Sočan M: Cepljenje zdravstvenih delavcev proti gripi v Sloveniji. *Med Razgl* 2013; 52: S 6: 293-98.
49. Rao S, Nyquist AC: Respiratory viruses and their impact in healthcare. *Curr Opin Infect Dis* 2014; 27(4): 342-47.
50. Meerhoff TJ, Mosnier A, Paget WJ, the EISS Task Group: Progress in surveillance of Respiratory Syncytial Virus (RSV) in Europe: 2001-2008. *Euro Surveill* 2009; 14(40): pii=19346.
51. Brittain-Long R, Nord S, Olofsson S, Westin J, Anderson LM, Lindh M: Multiplex real-time PCR for detection of respiratory tract infections. *J Clin Virol* 2008; 41(1): 53-56.
52. Simonsen L, Reichert TA, Viboud C, Blackwelder WC, Taylor RJ, Miller MA: Impact of Influenza Vaccination on Seasonal Mortality in the US Elderly Population. *Arch Intern Med* 2005; 165: 265-72.
53. Černe D, Ostanek B: Biomedicinska analitika I, Fakulteta za farmacijo, 2012: 108-147.
54. Focus diagnostics (Simplexa) spletna stran: <http://www.focusdx.com/>
55. Branche AR, Walsh EE, Formica MA, Falsey AR: Detection of respiratory viruses in sputum from adults by use of automated multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2014; 52(10): 3590-96.
56. NLZOH spletna stran: <http://img.ivz.si/janez/357-6832.pdf>
57. Goka EA, Valley PJ, Mutton KJ, Klapper PE: Single, dual and multiple respiratory virus infections and risk of hospitalization and mortality. *Epidemiol Infect* 2015; 143: 37-47.
58. Towers S, Feng Z: Social contact patterns and control strategies for influenza in the elderly. *Math Biosci* 2012; 240(2): 241-49.