



## **Središnja medicinska knjižnica**

**Mareković, Ivana (2008) *Značenje molekularnih metoda u dijagnostici izvanbolničkih pneumonija uzrokovanih bakterijama*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/539>

University of Zagreb Medical School Repository

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

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivana Mareković**

**Značenje molekularnih metoda u  
dijagnostici izvanbolničkih pneumonija  
uzrokovanih bakterijama**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2008.**

Disertacija je izrađena u Klinici za plućne bolesti "Jordanovac" i Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditelj rada: doc. dr. sc. Vanda Plečko

*Zahvaljujem doc. dr. sc. Vandi Plečko na podršci koju mi je pružila kao mentor, prof. dr. sc. Smilji Kalenić, predstojniku Zavoda za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC Zagreb na mogućnosti da se provede ovo istraživanje, te kolegicama dr. sc. Ani Budimir i dr. Zrinki Bošnjak na pomoći i podršci pri izradi rada.*

*Posebno zahvaljujem liječnicima i medicinskim sestrama Klinike za plućne bolesti "Jordanovac" koji su mi pomogli da prikupim uzorke na kojima je istraživanje napravljeno.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1. IZVANBOLNIČKE PNEUMONIJE – DEFINICIJA I ETIOLOGIJA</b>	<b>1</b>
<b>1.2. MIKROBIOLOŠKE DIJAGNOSTIČKE METODE</b>	<b>3</b>
1.2.1. Konvencionalne mikrobiološke metode	3
1.2.1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	3
1.2.1.2. <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	5
1.2.1.3. <i>Legionella species</i>	6
1.2.1.4. <i>Chlamydophila pneumoniae</i>	7
1.2.1.5. Opravdanost primjene konvencionalnih mikrobioloških metoda kod bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom	8
1.2.2. Molekularne mikrobiološke metode	9
1.2.2.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	14
1.2.2.2. <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	17
1.2.2.3. <i>Legionella species</i>	18
1.2.2.4. <i>Chlamydophila pneumoniae</i>	19
1.2.2.5. Ostali bakterijski uzročnici	21
<b>1.3. EMPIRIJSKO ANTIMIKROBNO LIJEČENJE IZVANBOLNIČKIH PNEUMONIJA</b>	<b>22</b>
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b>	<b>23</b>
2.1. PRIKAZ PROBLEMA	23
2.2. HIPOTEZA	25
2.3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	26

<b>3. ISPITANICI I METODE</b>	26
<b>3.1 ISPITANICI</b>	26
<b>3.2 ISTRAŽIVAČKE METODE</b>	29
3.2.1. Uzorci	29
3.2.2. Konvencionalne mikrobiološke metode	30
3.2.3. Molekularne mikrobiološke metode	35
3.2.3.1. Obrada kliničkih uzoraka za molekularne metode	35
3.2.3.2. Izolacija DNA	36
3.2.3.3. PCR metoda za <i>Streptococcus pneumoniae</i>	37
3.2.3.4. PCR metoda za <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	39
3.2.3.5. PCR metoda za <i>Legionella species</i>	41
3.2.3.6. PCR metoda za <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	42
<b>3.3. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA</b>	45
<b>4. REZULTATI</b>	51
<b>4.1. DEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA S     IZVANBOLNIČKOM PNEUMONIJOM</b>	51
<b>4.2. ETIOLOGIJA I UČESTALOST POJEDINIH BAKTERIJSKIH UZROČNIKA</b>	54
<b>4.3. REZULTATI KONVENCIONALNIH I MOLEKULARNIH MIKROBIOLOŠKIH     METODA</b>	57
4.3.1. Uzorci	57
4.3.2. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	58
4.3.3. <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	63
4.3.4. <i>Legionella species</i>	67
4.3.5. <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	69
4.3.6. Ostali bakterijski uzročnici	73
<b>4.4. USPOREDBA REZULTATA MIKROBIOLOŠKIH METODA KOD     BOLESNIKA S RAZLIČITOM TEŽINOM PNEUMONIJE</b>	74

<b>4.5. EVALUACIJA EMPIRIJSKI PRIMJENJENOG ANTIMIKROBNOG LIJEČENJA</b>	<b>77</b>
<b>U ODNOSU NA REZULTATE MIKROBIOLOŠKIH METODA</b>	
<b>5. RASPRAVA</b>	<b>79</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	<b>103</b>
<b>7.SAŽETAK</b>	<b>107</b>
<b>8.SUMMARY</b>	<b>109</b>
<b>9. LITERATURA</b>	<b>111</b>
<b>10.ŽIVOTOPIS</b>	<b>132</b>

## POPIS KRATICA

<b>PCR</b>	lančana reakcija polimerazom (PCR, prema engl. polymerase chain reaction)
<b>ELISA</b>	imunoenzimska metoda (ELISA, prema engl. enzyme-linked immunosorbent assay)
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kiselina (DNA, prema engl. deoxyribonucleic acid)
<b>Tm</b>	<i>melting</i> temperatura (Tm, prema engl. temperature melting)
<b>PSI</b>	indeks težine pneumonije (PSI, prema engl. Pneumonia severity index)
<b>BAL</b>	bronhoalveolarni lavat
<b>JIL</b>	jeidnica intenzivnog liječenja

# 1. UVOD

## 1.1. IZVANBOLNIČKE PNEUMONIJE – DEFINICIJA I ETIOLOGIJA

Izvanbolnička pneumonija je akutna infekcija plućnog parenhima karakterizirana novonastalim infiltratom na radiološkoj snimci prsnog koša ili auskultatornim nalazom koji ukazuje na pneumoniju, kod bolesnika koji unatrag 14 i više dana od pojave simptoma nije bio hospitaliziran, niti je boravio u gerijatrijskoj ili sličnoj ustanovi. Istovremeno su obično prisutna najmanje dva simptoma akutne infekcije donjeg respiratornog sustava uključujući vrućicu ili hipotermiju, tresavicu, znojenje, novonastali kašalj s ili bez iskašljaja, promjenu u boji respiratornog sekreta kod bolesnika s kroničnim kašljem, bol u prsištu ili dispneju<sup>1</sup>.

Etiologija izvanbolničkih pneumonija se uz primjenu konvencionalnih mikrobioloških metoda utvrdi kod 50-75 % bolesnika. Najčešće utvrđeni bakterijski uzročnik je *Streptococcus pneumoniae*<sup>2-6</sup>. U 26 prospektivnih istraživanja provedenih u 10 europskih zemalja koja su uključivala gotovo 6000 odraslih osoba hospitaliziranih zbog izvanbolničke pneumonije pneumokok je bio najčešće utvrđeni bakterijski patogen. Spekter ostalih bakterijskih uzročnika također je sličan u istraživanjima provedenim u različitim europskim zemljama, te obuhvaća *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae* i *Legionella species*. Učestalost *Legionella species* razlikuje se među pojedinim europskim zemljama. Češća je u mediteranskim zemljama poput Španjolske i Francuske u kojima uzrokuje 8-15 % slučajeva izvanbolničkih pneumonija, dok je u sjevernoeuropskim zemljama rijetka. Ostali bakterijski uzročnici su *Staphylococcus aureus*, enterobakterije i *Pseudomonas aeruginosa* (u bolesnika s predisponirajućim čimbenicima kao što su kronična opstruktivna plućna bolest, karcinom, dijabetes, alkoholizam, dugotrajno liječenje kortikosteroidima, prethodno primjenjeni antimikrobni lijekovi), anaerobi (aspiracija, bolesti gingive, poremećaj pokretljivosti jednjaka). Rijetki bakterijski uzročnici su i *Chlamydophila psittaci* i *Coxiella burnetti*. *C. burnetti* vrlo je rijedak uzročnik u većini europskih zemalja (u pojedinim



dijelovima Skandinavije uopće ne postoji), ali je drugi po učestalosti uzročnik u sjeveroistočnim dijelovima Španjolske. Razlike među istraživanjima s obzirom na utvrđenu učestalost pojedinih uzročnika prema tome mogu se objasniti različitim čimbenicima: karakteristikama ispitivane populacije (npr. dob ispitanika, prisutnost određenih rizičnih čimbenika), geografskim područjem, vrstom ispitivanih uzoraka, te primjenjenim mikrobiološkim metodama<sup>7,8,9</sup>.

*M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* i *Legionella* species još uvijek se često, iako neopravdano, nazivaju tzv. atipičnim uzročnicima. Neka istraživanja ukazuju na to da se udio slučajeva uzrokovanih ovim bakterijama povećava, te da je njihova uloga potcijenjena<sup>10-13</sup>. *C. pneumoniae* je tako u jednom istraživanju bila najčešće identificirani bakterijski uzročnik izvanbolničkih pneumonija, dok je u nekim istraživanjima po učestalosti bila na drugom mjestu, odmah iza pneumokoka<sup>14-19</sup>. Za *M. pneumoniae* već se dugo zna da pokazuje cikličke varijacije u učestalosti svakih 4-8 godina. Najnovije istraživanje pokazalo je da cikličke varijacije, ali u puno dužim vremenskim intervalima, pokazuje i *C. pneumoniae*<sup>20</sup>.

Kod bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom ponekad se utvrde dva ili više bakterijskih uzročnika. Postotak ovakvih miješanih izvanbolničkih pneumonija u istraživanjima se kreće od 10-20 %, a kao bakterijski uzročnici koji u njima sudjeluju najčešće se navode *S. pneumoniae*, *H. influenzae* i *C. pneumoniae*<sup>15,17,18,21</sup>.

U literaturi se često navodi da su mnoge pneumonije s nerazjašnjenom etiologijom zapravo uzrokovane pneumokokom koji nije dokazan zbog nesavršenosti postojeće mikrobiološke dijagnostike na ovom području<sup>22</sup>.

## 1.2. MIKROBIOLOŠKE DIJAGNOSTIČKE METODE

### 1.2.1. Konvencionalne mikrobiološke metode

Konvencionalne mikrobiološke metode za utvrđivanje bakterijskih uzročnika izvanbolničkih pneumonija razlikuju se ovisno o traženom uzročniku, a obuhvaćaju mikroskopski preparat i kultivaciju iz uzoraka sputuma (a ako su dostupni i iz bronhoskopski dobivenih uzoraka, te pleuralnih izljeva), hemokulturu, otkrivanje bakterijskih antigena u urinu i serološke metode<sup>1-20</sup>.

#### 1.2.1.1. *Streptococcus pneumoniae*

Mikrobiološka dijagnostika pneumokokne pneumonije i danas je otežana jer mikroskopski preparat i kulture sputuma, te hemokulture imaju nisku osjetljivost, posebno kod bolesnika kod kojih su već prethodno primjenjeni antimikrobni lijekovi, a prisutnost pneumokoka u sputumu uz to može predstavljati i kolonizaciju<sup>23</sup>.

Prema literaturi kultura sputuma pokazuje različite rezultate na koje može utjecati niz čimbenika kao što su način uzimanja, transport i brzina obrade uzorka, pravilna upotreba citoloških kriterija za procjenu adekvatnosti uzorka i prethodno primjenjeno antimikrobno liječenje. U istraživanju koje je pokazalo ograničenu dijagnostičku vrijednost uzorka sputuma, od 116 bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom samo 36 % njih moglo je dati uzorak sputuma, 55 % dobivenih uzoraka ocijenjeno je adekvatnim na osnovu mikroskopskog preparata, u 24 % kultivacijom je dobiven bakterijski uzročnik, a samo kod 1 bolesnika mikrobiološki nalaz utjecao je na daljnji izbor antimikrobnog liječenja koje je do tada bilo neuspješno<sup>24</sup>. U bolesnika s blagom izvanbolničkom pneumonijom bez komorbiditetnih čimbenika (maligna bolest, renalna insuficijencija, kronična opstruktivna plućna bolest, itd.) preparat po Gramu i kultura sputuma nisu bili dijagnostički korisni niti su utjecali na liječenje i njegov ishod<sup>25,26</sup>. Iako se u nekim istraživanjima preparat po

Gramu pokazao dijagnostički korisnim, meta-analiza je pokazala njegovu slabu uspješnost kada se uzme u obzir broj bolesnika kod kojih je uzorak sputuma adekvatan, te konačni rezultati<sup>27,28</sup>. Istraživanje utjecaja prethodno primjenjenog antimikrobnog liječenja pokazalo je da je mikroskopski preparat sputuma po Gramu dijagnostički koristan ako je uzorak uzet u prvih 6 do 12 sati, a kultura sputuma ako je uzorak uzet unutar 24 sata od početka antimikrobnog liječenja<sup>29</sup>.

Hemokulture su pozitivne kod samo 5-14 % bolesnika hospitaliziranih zbog izvanbolničke pneumonije, a njihovu osjetljivost bitno smanjuje prethodno primjenjeno antimikrobno liječenje. Nekoliko istraživanja je pokazalo da su hemokulture češće pozitivne kod bolesnika s teškom pneumonijom. Niska osjetljivost hemokultura pokušava se protumačiti na nekoliko načina:

- a) malim brojem mikroorganizama prisutnim po mililitru krvi,
- b) prisutnošću bakterija unutar leukocita (neutrofila) zbog fagocitoze,
- c) prethodno primjenjenim antimikrobnim liječenjem i
- d) zahtjevnošću pneumokoka pri kultivaciji (autolizini)<sup>25,30,31,32,33</sup>.

Fiberoptička bronhoskopija s bronhoalveolarnim ispirkom (BAL) invazivna je metoda za dobivanje uzorka koji nije kontaminiran bakterijskom florom gornjeg respiratornog sustava. Upotreba ove metode uobičajena je u razjašnjavanju etiologije plućne infekcije kod imunokompromitiranih bolesnika i bolesnika s pneumonijom povezanom sa strojnom ventilacijom (VAP). Međutim, njezino značenje kod imunokompetentnih bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom još uvijek je nejasno<sup>34,35</sup>.

Detekcija pneumokoknog antigena u urinu je brza (~15 minuta) i jednostavna metoda za dijagnostiku pneumokokne pneumonije, osobito u slučaju ako je već započeto antimikrobno liječenje jer na ovu metodu ono ne utječe kao na prije spomenute metode. Pneumokokni antigen je tako kod bolesnika s pneumokoknom bakterijemijom bio još uvijek pozitivan 3 dana nakon početka liječenja u 83 % slučajeva<sup>36</sup>. Problem predstavljaju mogući lažno-pozitivni nalazi kod djece s kolonizacijom nazofarinksa sa

*S. pneumoniae*, te perzistencija antigena u urinu i nekoliko tjedana nakon nastanka pneumonije, zbog čega pozitivni rezultat ne mora biti posljedica trenutno prisutne, nego neke prethodno preboljele pneumonije (unutar prethodna 3 mjeseca)<sup>37,38,39,40</sup>.

#### **1.2.1.2. *Mycoplasma pneumoniae***

Kultivacija *M. pneumoniae* iz kliničih uzoraka ima nisku osjetljivost, zahtjevna je i dugotrajna. Ovisno o inokulumu može trajati od 4 dana do nekoliko tjedana, te se stoga ne preporučuje u rutinskoj dijagnostici. Pneumonije uzrokovane s *M. pneumoniae* uglavnom se dokazuju serološkim testovima. IgG protutijela se u prvom tjednu bolesti ne mogu otkriti, dok s druge strane njihova niska razina može biti detektabilna i do 4 godine nakon preboljele infekcije. Zbog toga je nužno dokazati značajan porast njihovog titra, a to znači tek retrospektivno postavljanje dijagnoze. Rano postavljanje dijagnoze serološkim metodama temelji se na otkrivanju IgM protutijela koja se pojavljuju u prvom tjednu bolesti, a mogu se otkriti pomoću testa aglutinacije mikročestica (MAG) i ELISA metodom<sup>41</sup>. Otkrivanje IgM protutijela zadovoljavajuća je metoda kod djece. Naime, iako su pneumonije s *M. pneumoniae* češće u djece i mlađih odraslih osoba, mogu se pojaviti i u kasnijoj dobi, najvjerojatnije kao posljedica reinfekcije jer je imunost na

*M. pneumoniae* ograničenog trajanja. Zato se kod odraslih osoba kao osjetljivija metoda može koristiti određivanje IgA protutijela koja također nastaju rano tijekom bolesti<sup>42,43,44,45,46</sup>. Iako se ELISA metodom mogu otkriti IgG, IgM i IgA protutijela, još uvijek preostaje problem specifičnosti jer postoje križne reakcije s *M. genitalium*, vrstom koja je najsrodnija s *M. pneumoniae*<sup>47</sup>.

#### 1.2.1.4. *Legionella* species

Prema većini dostupne literature infekcije uzrokovane s *Legionella* spp. smatraju se češćima nego li se stvarno dijagnosticiraju, što je dijelom posljedica nesavršenosti konvencionalnih dijagnostičkih metoda. Serološkim metodama dijagnoza se postavlja samo retrospektivno. Glavno ograničenje serološke dijagnostike jest kasni nastanak serokonverzije, kod većine slučajeva nakon 3-4 tjedna, ali ponekad i nakon više od 10 tjedana. To znači da čak i ako je dostupan serum konvalescentne faze, on iz navedenog razloga može biti uzet prerano što rezultira lažno-negativnim rezultatima, a dijelom je i objašnjenje za 20-30 % bolesnika s legionelozom koji navodno ne razvijaju imunološki odgovor. Zbog toga se kod sumnje na infekciju s *Legionella* spp. preporučuje uzimanje još jednog dodatnog seruma konvalescentne faze. IgM protutijela, s druge strane, nisu pouzdani pokazatelj akutne infekcije jer mogu perzistirati vrlo dugo. Drugi nedostatak serološke dijagnostike je nemogućnost otkrivanja svih vrsta i serogrupa *Legionella* spp. Iako se serokonverzija za *L. pneumophila* serogrupa 1 općenito smatra visoko prediktivnom, osjetljivost i specifičnost serokonverzije za druge vrste i serogrupe nije potpuno potvrđena. Od različitih seroloških metoda koje su dostupne indirektna imunofluorescenca smatra se standardnom referentnom metodom.

Otkrivanjem antigena u urinu dijagnoza se postavlja dovoljno rano, ali samo za *L. pneumophila* serogrupa 1. Osjetljivost testa veća je kod težih oblika bolesti, te ukoliko se prije izvođenja testa urin prethodno 25x koncentrira selektivnom ultrafiltracijom<sup>449,50</sup> Za kultivaciju iz uzoraka sputuma potrebno je nekoliko dana, ali problem je veliki postotak bolesnika koji nemaju produktivni kašalj<sup>51</sup>.

### **1.2.1.3. *Chlamydomphila pneumoniae***

Kultivacija *C. pneumoniae* radi se na staničnim kulturama (Hep-2, HL) koje se nakon inkubacije bojaju specifičnim fluorescentno-obilježenim protutijelima pomoću kojih se detektiraju bakterije koje se umnožavaju unutar stanice (inkluzije). Ova metoda je zahtjevna i glavni joj je nedostatak nedovoljna osjetljivost. Potpuno zadovoljavajuće serološke metode nema, ali se mikroimunofluorescenca (MIF) preporučuje kao metoda izbora. Zbog kinetike serološkog odgovora rezultate dobivene serološkim pretragama ponekad je teško interpretirati i razlikovati akutnu od neke prošle infekcije. Prvo, s obzirom da je imunost na *C. pneumoniae* ograničenog trajanja, moguće su reinfekcije karakterizirane izostankom stvaranja IgM protutijela. Značajan porast titra IgG protutijela, s druge strane, nastaje kasno, pa ga zbog vrlo često nemogućnosti dobivanja uzorka seruma konvalescentne faze nakon 4-8 tjedana, nije moguće dokazati. Drugo, kod otprilike 50 % odrasle populacije prisutna su IgG protutijela<sup>48</sup>. Zbog svega navedenog teško je samo na osnovu seroloških pretraga postaviti dijagnozu akutne infekcije. Čak i ako se dijagnoza postavi, ona je samo retrospektivna, te ne doprinosi liječenju bolesnika.

### **1.2.1.5. Opravdanost primjene konvencionalnih mikrobioloških metoda u bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom**

Zbog navedenih ograničenja konvencionalnih mikrobioloških metoda, te prevelikih troškova koji bi nastali opsežnom dijagnostičkom obradom svih bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom, novije preporuke stručnih društava definiraju bolesnike kod kojih su ove metode radi utvrđivanja etiologije opravdane i treba ih napraviti. Svakako ih treba napraviti u slučaju kad se očekuje da će njihovi rezultati promijeniti antimikrobno liječenje pojedinog bolesnika, odnosno kod bolesnika kod kojih se uobičajeno ovim metodama dobivaju rezultati. Svim preporukama zajedničko je da opseg mikrobiološke

dijagnostičke obrade kod određenog bolesnika ovisi o težini pneumonije. Konkretnije rečeno, rutinsko dijagnostičko testiranje radi utvrđivanja etiologije kod ambulantno liječenih bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom nije obavezno, odnosno proizvoljno je. Kod hospitaliziranih bolesnika hemokulture i uzorak sputuma za preparat po Gramu i kulturu prije početka antimikrobnog liječenja treba uzeti u slučaju kad postoje kliničke indikacije (primitak u jedinicu intenzivnog liječenja, prethodno neuspjelo ambulantno liječenje, leukopenija, alkoholizam, kronična bolest jetre, teška opstruktivna/strukturalna plućna bolest, asplenija, pleuralni izljev). Kod hospitaliziranih bolesnika bez navedenih kliničkih indikacija dijagnostičko testiranje nije obavezno, odnosno proizvoljno je. Preparat po Gramu i kulturu iz uzorka sputuma prije primjene antimikrobnog liječenja treba napraviti samo ako je moguće dobiti adekvatan uzorak i zadovoljiti zahtjeve u odnosu na uzimanje, transport i obradu uzorka. Kod bolesnika s teškom izvanbolničkom pneumonijom treba kao minimum uzeti hemokulture, uzorak sputuma za kulturu, te napraviti testove za otkrivanje antigena u urinu za *L. pneumophila* serogrupa 1 i *S. pneumoniae*. Kod intubiranih bolesnika treba uzeti endotrahealni aspirat<sup>52,53,54</sup>.

Iz svega navedenog jasno je da su u mikrobiološkoj dijagnostici izvanbolničkih pneumonija potrebne nove i bolje metode.

### **1.2.2. Molekularne mikrobiološke metode**

Zbog navedenih nedostataka konvencionalnih, sve češće se nastoje primijeniti molekularne mikrobiološke metode – prije svega lančana reakcija polimerazom (PCR, prema engl. polymerase chain reaction).

PCR je brza enzimska metoda kojom se male količine DNA prisutne u nekom uzorku amplificiraju *in vitro* čak milijun puta na količinu potrebnu za daljnju analizu elektroforezom, hibridizacijom itd. Temelji se na ponavljajućim ciklusima od kojih se svaki sastoji od 3 reakcije, a svaka od njih ima određenu temperaturu i vrijeme trajanja koje je potrebno prethodno podesiti na termobloku (prema engl. heating block), odnosno aparatu

u kojem se reakcija odvija: 1. denaturacija DNA koja se odvija na visokoj temperaturi (npr. 95<sup>0</sup> C) kako bi se dva lanca DNA razdvojila, 2. vezanje početnica na određenu regiju gena ili genoma na nižoj temperaturi (npr. 50-62<sup>0</sup> C) i 3. elongacija ili sinteza novog lanca DNA pomoću *Taq* DNA polimeraze (obično na 72<sup>0</sup> C).

Reakcija se izvodi u mikrotubama/kapilarama, obično u 50 µl ili 20 µl otopine koja sadrži sljedeće čimbenike: ciljnu DNA, nukleotide (dNTP) i termostabilnu *Taq* DNA polimerazu koja se izdvaja iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus* ili sintetizira genetskim inženjerstvom<sup>55,56</sup>.

Osim konvencionalne PCR metode, danas postoje i njene brojne modifikacije. *Real-time* PCR je brža, potpuno automatizirana i kompjuterizirana PCR metoda koja, za razliku od konvencionalne, omogućuje amplifikaciju i detekciju PCR produkata u trajanju od oko samo 45 minuta. Metoda se radi na aparatu LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) koji omogućuje i kvantifikaciju ciljne DNA u uzorku (Slika 1).

Slika 1. Lightcycler® 2.0 Instrument



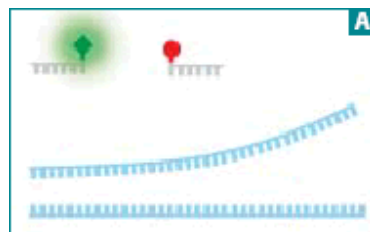
Prema Roche Applied Science<sup>57</sup>

Ovaj aparat omogućuje da se s jedne strane ciklusi amplifikacije odvijaju jako brzo, a s druge strane on istodobno ima i funkciju mikrovolumnog fluorometra. Na taj način se brzi ciklusi DNA amplifikacije kombiniraju s bilježenjem fluorescencije. To omogućuje kvantifikaciju jer je jačina fluorescentnog signala koja se mjeri u svakom amplifikacijskom ciklusu direktno proporcionalna s količinom stvorenog PCR produkta. Pri tome se mogu

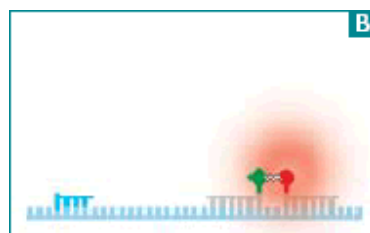


koristiti interkalirajuće fluorescentne boje, SYBR Green I i fluorescentno obilježene specifične probe. Upotreba fluorescentno obilježenih specifičnih probi temelji se na prijenosu fluorescentno-rezonantne energije (FRET, prema engl. fluorescence resonance energy transfer). Ove probe dodaju se u reakcijsku smjesu zajedno s početnicama, te se tijekom vezanja početnica vežu na određene sekvence na amplificiranim DNA fragmentima. S obzirom da se tada nalaze jedna blizu druge (unutar 15 nukleotida) dolazi do prijenosa energije i emitiranja fluorescentnog svjetla određene valne duljine. (Slika 2).

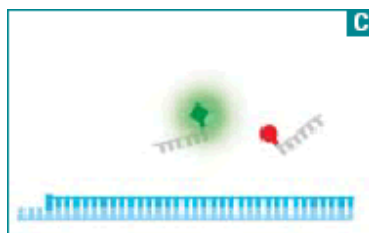
Slika 2. Upotreba fluorescentno obilježenih specifičnih probi za kvantifikaciju PCR produkata u *real-time* PCR metodi pomoću aparata LightCycler.



- A. Jedna proba obilježena je na 3' završetku s fluoresceinom (donor), a druga na 5' završetku s LightCycler® Red (akceptor). Za vrijeme denaturacije nema vezivanja probi (hibridizacije), te je zbog toga udaljenost između probi prevelika da bi moglo doći do prijenosa energije.



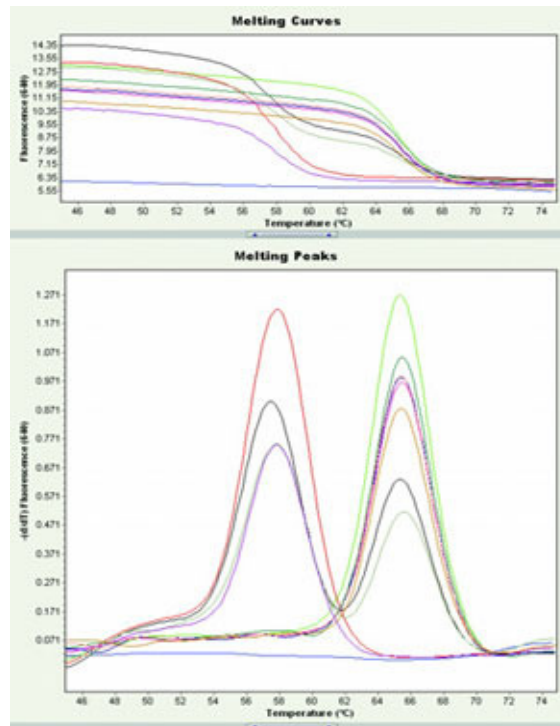
- B. Tijekom vezanja početnica probe se vežu za amplificirane DNA fragmente jedna blizu druge. Fluorescein emitira zeleno fluorescentno svjetlo, dolazi do prijenosa energije na LightCycler® Red koji nakon toga emitira crveno fluorescentno svjetlo. Ova crvena fluorescencija se mjeri na kraju svakog vezanja početnica, jer je tada intenzitet fluorescencije najjači.



C. Nakon vezanja početnica, odnosno tijekom elongacije, temperatura je viša, probe se odvajaju, a amplificirani DNA fragmenti opet su dvolančani. Zbog toga su probe opet predaleko jedna od druge da bi moglo doći do prijenosa fluorescentne energije. Prema Roche Applied Science<sup>57</sup>

Identifikacija PCR produkata u *real-time* metodi temelji se na *melting* temperaturi ( $T_m$ , prema engl. melting temperature). Općenito, temperatura pri kojoj se DNA lanci pri zagrijavanju odvajaju (engl. melting) razlikuje se ovisno o njihovoj sekvenci, duljini i GC sadržaju. Čak i razlika u jednoj jedinoj bazi može rezultirati promjenama u  $T_m$ , te se zbog toga karakteristike  $T_m$  mogu koristiti za identifikaciju PCR produkata. Konkretno, pri upotrebi ranije opisanih fluorescentno obilježenih specifičnih probi, LightCycler® analizira  $T_m$  u svakom uzorku tako da prati fluorescenciju svakog uzorka dok se pri tom temperatura povećava kako bi se probe razdvojile od svojih ciljanih DNA sekvenci. Kako temperatura raste, tako se fluorescencija u uzorcima smanjuje jer kad se probe odvoje od amplificiranih DNA fragmenata, međusobno su udaljene, te dolazi do pada u fluorescenciji.  $T_m$  je pri tome definirana kao temperatura u kojoj se 50 % probi odvojilo od DNA. Analizu  $T_m$  izvodi program koji podatke prikazuje u 2 oblika. Prvi oblik je *melting* krivulja (engl. melting curve) koja prikazuje fluorescenciju uzoraka u odnosu na temperaturu. To je silazeća krivulja koja prikazuje smanjenje fluorescencije u uzorcima dok se probe u njima, uslijed povišenja temperature, odvajaju (melting) od svojih ciljanih sekvenci. Drugi oblik su *melting* zupci (engl. melting peaks). To su zupci koji prikazuju negativnu derivaciju krivulje fluorescencije  $-(d/dT)$ .  $T_m$  svakog uzorka ovdje izgleda kao zubac. Na ovaj način se bolje uočavaju razlike između pojedinih uzoraka (Slika 3)<sup>57</sup>.

Slika 3. Analiza *melting* temperatura ( $T_m$ ) pomoću *melting* krivulje i *melting* peak-ova



Prema Roche Applied Science (57)

Iz svega navedenog vidljivo je da se PCR metoda čini kao vrlo pogodna za dijagnostiku izvanbolničkih pneumonija jer može detektirati minimalne količine nukleinskih kiselina svih eventualnih uzročnika, ne ovisi o njihovoj vijabilnosti, rezultati su dostupni vrlo brzo, a utjecaj prethodno primijenjenog antimikrobnog liječenja na ovu metodu daleko je manji nego li na kultivaciju. Pojedini bakterijski uzročnici razlikuju se međusobno s obzirom na istražene i objavljene metode, kao i njihove rezultate<sup>58,59,60</sup>.

### 1.2.2.1. *Streptococcus pneumoniae*

PCR je u dijagnostici pneumokokne pneumonije evaluiran na uzorcima krvi (puna krv, serum, plazma, izolirani leukociti) i na uzorcima iz respiratornog sustava.

Kao ciljana sekvenca najčešće je korišten gen pneumolizina, te rjeđe gen autolizina. Pneumolizin je kod pneumokoka jedan od najvažnijih čimbenika virulencije. To je toksin koji pripada u skupinu tzv. citolizina koji se vežu za kolesterol (engl. cholesterol-binding cytolysins). Slične toksine stvaraju i druge gram-pozitivne bakterije (npr. streptolizin O kod *Streptococcus pyogenes*, listeriolizin kod *Listeria monocytogenes*). Ovi toksini djeluju tako da se vežu na kolesterol kao receptor u staničnoj membrani ciljne stanice. Nakon toga dolazi do promjene njihove konformacije, ugrađuju se u staničnu membranu i stvaraju agregate. Kao posljedica toga u membrani nastaju transmembranski kanali odnosno oštećenja u obliku pora. Pneumolizin se razlikuje od svih ostalih pripadnika ove grupe bakterijskih toksina zbog toga što ga pneumokok ne izlučuje aktivno, već pneumolizin ostaje u njegovoj citoplazmi sve dok ne dođe do lize pneumokoka kada se pneumolizin oslobađa u njegovu okolinu<sup>61,62</sup>. Autolizin je N-acetil-muramil-L-alanin amidaza odgovorna za remodeliranje odnosno pregradnju staničnog zida. Njena funkcija važna je prilikom diobe bakterijske stanice, a smatra se odgovornom i za ireverzibilna oštećenja prilikom djelovanja beta-laktamskih antimikrobnih lijekova<sup>63</sup>.

Detekcija pneumokoka pomoću konvencionalnog PCR-a iz uzoraka krvi u do sada provedenim istraživanjima pokazala je vrlo varijabilne rezultate. Rudolph i suradnici koristili su *nested* PCR s prvim parom početnica specifičnim za gen autolizina (*lytA*), a drugim parom specifičnim za gen pneumolizina na uzorcima pune krvi i izoliranim leukocitima dobivenim od bolesnika s pneumokoknom bakterijemijom dokazanom u hemokulturi. U odnosu na hemokulture *nested* PCR pokazao je osjetljivost od 75 % s početnicama za pneumolizin, te 63 % s početnicama za autolizin na izoliranim leukocitima, dok je kod uzoraka pune krvi osjetljivost bila svega 35 %. Ispitivanje *in vitro* osjetljivosti na serijskim razrjeđenjima pneumokokne DNA pokazalo je da ova metoda može detektirati 10

fg (4.3 kopije genoma) pneumokokne DNA. Međutim, kad je metoda izvedena na uzorcima pune krvi i izolatima leukocita u koje je prethodno unesen soj *S. pneumoniae*, čime se zapravo "oponašaju" klinički uzorci, osjetljivost je bila manja (200 mikroorganizama na uzorcima pune krvi i 20 mikroorganizama na izoliranim leukocitima)<sup>64</sup>. Zhang i suradnici koristili su PCR za PBP 2B gen, također na uzorcima pune krvi dobivene od bolesnika s pneumokoknom bakterijemijom, te dobili osjetljivost od 80 %. *In vitro* osjetljivost bila je 100 fg DNA odnosno 1 CFU<sup>65</sup>. Kod Dagan i suradnika PCR za gen pneumolizina u uzorcima seruma pokazao je osjetljivost od 100 % kod djece s pneumokoknom bakterijemijom dokazanom u hemokulturi, dok je u djece s lobarnom pneumonijom osjetljivost bila 37 %. Problem su bili pozitivni PCR rezultati kod zdravih kontrolnih ispitanika kod kojih je bila prisutna kolonizacija nazofarinksa s pneumokokom<sup>66</sup>. Salo i suradnici su pomoću *nested* PCR metode za gen pneumolizina na uzorcima seruma kod bolesnika s pneumokoknom pneumonijom dokazanom u hemokulturi dobili osjetljivost od 100 %. *In vitro* osjetljivost određena pomoću serijskih razrjeđenja pneumokokne DNA pokazala je da ova metoda može detektirati 24 fg pneumokokne DNA (10 mikroorganizama)<sup>67</sup>. Kod Toikka i suradnika je *nested* PCR metoda na uzorcima krvi bila pozitivna u 12 od 25 (44 %) djece s invazivnom pneumokoknom infekcijom, a za optimalnu osjetljivost bilo je potrebno testirati više frakcija krvi (plazma, serum i izolirane leukocite). *In vitro* osjetljivost njihove PCR metode ispitana na serijskim razrjeđenjima soja pneumokoka (a ne izolirane pneumokokne DNA) bila je 10 CFU (odnosno 1 CFU nakon Southern blot hibridizacije)<sup>68</sup>. Hassan-King i suradnici analizirali su PCR metodom za gen autolizina 25 uzoraka krvi uzetih iz bočice za hemokulturu kod bolesnika sa suspektom pneumonijom. PCR metodom dobiveni su pozitivni rezultati i iz onih uzoraka krvi iz kojih nije izoliran pneumokok u hemokulturi. *In vitro* osjetljivost ove metode ispitana na serijskim razrjeđenjima pneumokokne DNA bila je 50 fg, dok je najmanji broj bakterija koji daje pozitivnu reakciju, određen pomoću serijskih razrjeđenja, bio 3 CFU<sup>69</sup>. Menendez i suradnici su *nested* PCR metodom na uzorcima seruma utvrdili peterostruko više pneumokoknih pneumonija nego li u hemokulturi (41 slučaj PCR metodom, a samo 7

slučajeva u hemokulturi)<sup>70</sup>. Istom *nested* PCR metodom su Lorente i suradnici utvrdili PCR-pozitivne rezultate na uzorcima krvi kod 48 % bolesnika s pneumokoknom pneumonijom i sterilnim hemokulturama<sup>71</sup>. Kod Dominguez i suradnika koji su koristili istu *nested* PCR metodu, kod svih bolesnika kod kojih su hemokulture bile negativne, negativni su bili i rezultati PCR-a<sup>72</sup>.

Murdoch i suradnici prvi su utvrdili razliku u rezultatima PCR-a između uzoraka krvi i uzoraka iz respiratornog sustava. Kod bolesnika s pneumonijom oni su u uzorcima krvi (plazma, izolirani leukociti) imali svega 2 % pozitivnih rezultata, dok ih je na uzorcima sputuma bilo čak 81 %, a na obriscima ždrijela 55 % pozitivnih. Jedna od važnijih spoznaja koja je također proizašla iz spomenutog istraživanja jest da PCR na ovim uzorcima iz respiratornog sustava nije pouzdana dijagnostička metoda za pneumokoknu pneumoniju jer ne može razlikovati kolonizaciju od infekcije<sup>73</sup>. U ovim uzorcima to je moguće pomoću kvantitativnog PCR-a gdje prisutnost većeg broja bakterija ukazuje na infekciju, a ne kolonizaciju<sup>74,75,76</sup>. Slične postotke PCR-pozitivnih uzoraka sputuma pokazala su i druga istraživanja<sup>77</sup>.

Do sada je provedeno samo jedno istraživanje u kojem je PCR za *S. pneumoniae* evaluiran na bronhoskopski dobivenim uzorcima, tj. na uzorcima BAL-a. U tom istraživanju korišten je *multiplex* PCR koji je osim početnica za *H. influenzae*, *M. pneumoniae* i *C. pneumoniae* uključivao i početnice specifične za *lytA* gen *S. pneumoniae*. U tom istraživanju *S. pneumoniae* je pomoću kulture otkriven u BAL-u kod 6.4 % (10/156) bolesnika, a *multiplex* PCR-om kod 28 % (44/156) bolesnika s infekcijom donjeg respiratornog sustava. Od 103 bolesnika koji su liječeni antimikrobnim lijekovima prije bronhoskopske pretrage, *S. pneumoniae* bio je otkriven pomoću kulture kod 2.9 %, a *multiplex* PCR-om kod njih 31 %. Ovo istraživanje pokazalo je da bi PCR na uzorcima BAL-a bio korisna dijagnostička metoda kod bolesnika prethodno liječenih antimikrobnim lijekovima<sup>78</sup>.

### 1.2.2.2. *Mycoplasma pneumoniae*

Za dijagnostiku pneumonija uzrokovanih s *M. pneumoniae* PCR se u dosadašnjim istraživanjima pokazao vrlo dobrim, te se danas smatra metodom izbora za direktno otkrivanje mikoplazmi u respiratornim uzorcima bolesnika.

Do sada su korištene početnice specifične za gen ATPaza operona, zatim za gen koji kodira P1 protein, te 16S rRNA. P1 protein glavni je čimbenik virulencije za *M. pneumoniae*, te ima ulogu adhezina. *M. pneumoniae* detektirana je pomoću PCR-a u različitim vrstama respiratornih uzoraka – obriscima ždrijela, nazofaringealnim aspiratima, sputumima, trahealnim aspiratima, BAL-ovima, transtorakalnim aspiratima, biopstatima pluća<sup>78,79,80,81</sup>. Neka istraživanja pokazala su da je najbolji uzorak za PCR sputum, dok je prema drugima to obrisak ždrijela zbog manje količine prisutnih PCR inhibitora<sup>59,60,82,83,84</sup>. PCR je brža i osjetljivija metoda od kulture, ali unatoč tome nije uvijek dovoljan za dijagnozu respiratorne infekcije uzrokovane s *M. pneumoniae*<sup>85</sup>. Naime, nekoliko studija pokazalo je slabu korelaciju između pozitivnih PCR rezultata i serološkog odgovora kod bolesnika s pneumonijom uzrokovanom s *M. pneumoniae*<sup>86,87,88</sup>.

Osim *single-step* PCR, *nested* PCR, *multiplex* PCR i *real-time* PCR metoda ispitivane su i metode amplifikacije RNA (RT-PCR, TMA). Danas su već dostupni i komercijalni kitovi za PCR dijagnostiku *M. pneumoniae* (Roche, Basel, Switzerland; Minerva Biolabs, Berlin, Germany)<sup>46,89</sup>.

#### **1.2.2.4. *Legionella species***

S obzirom da manje od 50 % bolesnika s infekcijom uzrokovanom s *Legionella* spp. ima produktivni kašalj i može dati iskašljaj kao uzorak, istraživanja PCR metoda provedena su na različitim vrstama uzoraka. Istraživanja provedena na uzorcima BAL-a dala su odlične rezultate, dok su rezultati istraživanja na uzorcima urina i seruma varijabilni. Osjetljivost PCR-a veća je kada se ispitivani uzorci uzmu rano tijekom bolesti i kad se kod pojedinog bolesnika testira više vrsta uzoraka<sup>110,111,112</sup>. Obrisci ždrijela također mogu biti dobri uzorci za PCR, ali je njihova primjena evaluirana u samo jednom istraživanju u kojem je PCR bio pozitivan kod 5 od ukupno 6 bolesnika s legionelozom<sup>113</sup>.

PCR se može smatrati metodom izbora za legionelozu kod bolesnika koji imaju produktivni kašalj i mogu dati uzorak sputuma. Uloga ostalih vrsta uzoraka pri izvođenju PCR-a nije jasna. Kao i za druge bakterijske uzročnike izvanbolničkih pneumonija metoda još uvijek nije standardizirana. Za *Legionella species* postoje komercijalni dijagnostički kitovi za PCR (Minerva Biolabs; Berlin, Germany)<sup>58,59,60</sup>.

#### **1.2.2.3. *Chlamydomphila pneumoniae***

Za *C. pneumoniae* do sada je opisano 18 *in-house* PCR metoda. One nisu standardizirane, a rezultati dobiveni u pojedinim laboratorijima međusobno se razlikuju. Kao ciljana sekvenca u ovim metodama najčešće je korišten *ompA* gen koji kodira glavni protein vanjske membrane (MOMP), 16S rRNA gen i *PstI* fragment. Ipak, kod *C. pneumoniae* je u odnosu na druge spomenute bakterijske uzročnike standardizacija PCR metoda najviše definirana. Naime, prema preporukama Centra za kontrolu bolesti i prevenciju (CDC, Atlanta, SAD) i Laboratorijskog centra za kontrolu bolesti (Ottawa, Kanada) četiri konvencionalne PCR metode su izdvojene kao one koje zadovoljavaju validacijske kriterije, iako pri njihovom uspoređivanju na uzorcima iz respiratornog sustava



bolesnika nisu pokazale zadovoljavajuću podudarnost u rezultatima (Tablica 1)<sup>48,90,91,92,93</sup>. Za ove 4 metode osjetljivost i specifičnost određena je u više od 2 vanjska laboratorija na kalibriranim arteficialnim i pravim kliničkim uzorcima, pri čemu je osjetljivost <1 IFU (inclusion-forming unit), a specifičnost je utvrđena u odnosu na druge vrste klamidija kao i niz prokariotskih i eukariotskih DNA. Bilo koju novu PCR metodu potrebno je validirati tako da se PCR rezultati ispitivane metode usporede s rezultatima neke od osjetljivih metoda kultivacije i s najmanje jednom validiranom PCR metodom koja za ciljanu sekvencu ima različiti gen ili različitu sekvencu istog gena. *Real-time* PCR također je moguće primjeniti, ali skupa oprema ograničavajući je čimbenik za izvođenje ove metode koja se u dosadašnjim istraživanjima na manjem broju kliničkih uzoraka iz respiratornog sustava pokazala vrlo dobrom, iako niti ona još nije standardizirana<sup>94,95,96,97,98</sup>. Trenutno postoje i dva komercijalna kita namijenjena za istraživačke svrhe (Lcx *C. pneumoniae* RUO PCR; Abbott Laboratories i Chlamylege; Argene Inc.) koji još nisu evaluirani na većem broju kliničkih uzoraka<sup>99,100</sup>.

Tablica 1. Četiri PCR metode za detekciju *Chlamydomphila pneumoniae* koje zadovoljavaju validacijske kriterije

PCR metoda	Ciljana sekvenca	Veličina produkta, bp	Metoda detekcije	Godina(referenca)
S + R	PstI fragment	474	AGE	1992 (85)
S	16S rRNA gen	463	AGE	1992 (86)
N + T	MOMP	prvi 333; drugi 207	AGE	1993 (87)
S+T+HS+M	16S rRNA gen	195	AGE	2000 (88)

\*AGE, elektroforeza u agarozu gelu; HS, *hot-start* PCR; M, *multiplex* PCR; MOMP, glavni protein vanjske membrane; N, *nested* PCR; R, digestija restrikcijskim enzimima; S, *single-step* PCR; T, *touchdown* PCR  
Prema Dowell i sur.(48).

*C. pneumoniae* je PCR metodama otkrivena u različitim vrstama kliničkih uzoraka iz respiratornog sustava, ali i izvan njega. Neki autori, naime, smatraju da *C. pneumoniae* ima ulogu u patogenezi ateroskleroze, tim više što je PCR-om dokazana u vaskularnom tkivu, ali i serumu i mononuklearnim leukocitima periferne

krvi<sup>101,102,103,104,105,106</sup>. Kod uzoraka iz respiratornog sustava, uzorci sputuma pokazali su se boljim od obrisaka ždrijela i nazofarinksa. Ipak, ovi obrisci su vrijedni uzorci u bolesnika koji nemaju produktivni kašalj<sup>107,108</sup>.

Do sada su provedena dva istraživanja u kojem je PCR za *C. pneumoniae* evaluiran na uzorcima BAL-a. Prvo istraživanje u kojem je korištena jedna od 4 validirane prije spomenute PCR metode, pokazalo je da je PCR visoko specifična i daleko osjetljivija metoda od kultivacije na staničnim kulturama<sup>78,109</sup>. U drugom istraživanju korišten je *multiplex* PCR koji je osim početnica za *H. influenzae*, *M. pneumoniae* i *S. pneumoniae* uključivao i početnice specifične za *ompA* gen *C.*

*pneumoniae*. U tom istraživanju osjetljivost ove metode na uzorcima BAL-a nije mogla biti evaluirana zbog niske učestalosti infekcija uzrokovanih s *C. pneumoniae* u razdoblju istraživanja. Činjenica da niti jedan ispitanik iz kontrolne skupine nije bio BAL mPCR pozitivan, dok je među bolesnicima s infekcijom donjeg respiratornog sustava bio pozitivan samo jedan bolesnik, ukazuje na to da je ova metoda vjerojatno specifična za *C. pneumoniae*. Zbog evaluacije BAL mPCR, istraživanje bi trebalo ponoviti na drugoj populaciji bolesnika s višom incidencijom infekcija uzrokovanih s *C. pneumoniae*<sup>78</sup>.

Vidljivo je iz svega navedenog da su molekularne mikrobiološke metode za otkrivanje 4 navedena bakterijska uzročnika izvanbolničkih pneumonija još uvijek uglavnom istraživačke, te da još nisu dovoljno standardizirane za rutinsku dijagnostičku primjenu, iako već postoje malobrojni komercijalni kitovi kao što su primjerice oni za *M. pneumoniae* i *Legionella species*.

#### **1.2.2.5. Ostali bakterijski uzročnici**

Mogući bakterijski uzročnici pneumonija su i *H. influenzae*, *S. aureus*, enterobakterije i *P. aeruginosa*. S obzirom da se mogu uspješno i dovoljno brzo izolirati na uobičajenim hranjivim podlogama, ne ispunjavaju glavne kriterije za primjenu molekularnih dijagnostičkih metoda. One su indicirane za detekciju mikroorganizama koji

se ne mogu uzgojiti *in vitro* ili su trenutno dostupne metode izolacije slabo osjetljive, za detekciju mikroorganizama koji zahtijevaju kompleksne hranjive podloge ili staničnu kulturu, te dugo vrijeme inkubacije. Iako se i *S. pneumoniae* može izolirati na uobičajenim hranjivim podlogama, molekularne metode za otkrivanje ovog uzročnika svakako vrijedi istraživati. Pneumokok ne samo da je najčešći uzročnik izvanbolničkih pneumonija, nego je u literaturi često prisutan stav da su mnoge pneumonije s nerazjašnjenom etiologijom zapravo uzrokovane pneumokokom koji nije dokazan konvencionalnim dijagnostičkim metodama<sup>22</sup>.

### **1.3. EMPIRIJSKO ANTIMIKROBNO LIJEČENJE IZVANBOLNIČKIH PNEUMONIJA**

Početno antimikrobno liječenje izvanbolničkih pneumonija je empirijsko. Preporuke stručnih društava pri tome se razlikuju, prije svega one europske od američkih. Dok prema europskim početno antimikrobno liječenje treba prvenstveno djelovati na pneumokok, prema američkim preporukama svakako treba pokriti i atipične uzročnike. Tako prema američkim preporukama kod bolesnika s blagom izvanbolničkom pneumonijom koji se mogu liječiti ambulantno i nemaju komorbiditetnih čimbenika treba dati makrolide, a prema onim europskim amoksicilin ili tetracikline. Dodatni razlog za to je možda i razlika u mehanizmima rezistencije na makrolide koji dominiraju na ova dva geografska područja. Naime, u Europi dominira MLS<sub>B</sub> tip koji je povezan s većim stupnjem rezistencije od onog koji dominira u Americi, odnosno M tipa<sup>9,52,53,54</sup>. I u Hrvatskoj postoje preporuke za empirijsko liječenje izvanbolničkih pneumonija<sup>114,115</sup>. Svim preporukama zajedničko je da izbor antimikrobnih lijekova koji će se empirijski primijeniti ovisi o težini bolesti, učestalosti pojedinih uzročnika i njihovoj rezistenciji na antimikrobne lijekove na određenom području, kao i o karakteristikama samog antimikrobnog lijeka.

Antimikrobno liječenje izvanbolničkih pneumonija često ostaje empirijskim i kasnije tijekom bolesti. S jedne strane to je posljedica nedostataka postojećih mikrobioloških

metoda kojima u velikom postotku slučajeva etiologija pneumonije ostaje neutvrđena. S druge pak strane, istraživanja su pokazala da unatoč dobivenim nalazima, pa čak i pozitivnih hemokultura, kliničari rijetko mijenjaju započetu empirijsku terapiju u

onu ciljanu, užeg spektra djelovanja koja je usmjerena na otkrivenog bakterijskog uzročnika<sup>24,31</sup>.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

### 2.1. PRIKAZ PROBLEMA

Konvencionalnim mikrobiološkim metodama etiologija izvanbolničkih pneumonija utvrdi se kod oko 50-75 % bolesnika<sup>2-6</sup>. Zbog nedostataka ovih metoda sve češće se nastoje primijeniti molekularne mikrobiološke metode, prije svega PCR. Ova metoda je vrlo pogodna jer može detektirati minimalne količine nukleinskih kiselina svih eventualnih uzročnika, ne ovisi o njihovoj vijabilnosti, rezultati su brzo dostupni, a utjecaj prethodno primjenjenog antimikrobnog liječenja na njih daleko je manji nego li na kultivaciju. Pojedini bakterijski uzročnici razlikuju se međusobno s obzirom na istražene i objavljene metode, kao i njihove rezultate što je u uvodu detaljnije objašnjeno. Iako su za neke bakterijske uzročnike, kao što su to *M. pneumoniae* i *Legionella* spp., molekularne metode već postale dijagnostičkim metodama izbora, još uvijek nema standardiziranih protokola niti pouzdanih, temeljito evaluiranih komercijalnih kitova<sup>58,59,60</sup>.

Zbog toga su dosadašnja istraživanja molekularnih metoda u dijagnostici izvanbolničkih pneumonija uzrokovanih bakterijama usmjerena prvenstveno na problem standardizacije ovih metoda i njihovu validaciju na što većem broju kliničkih uzoraka. Do sada provedenim istraživanjima nije utvrđeno kod kojih bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom bi izvođenje ovih skupih i tehnički zahtjevnih dijagnostičkih metoda bilo

opravdano u svakodnevnom kliničkom i laboratorijskom radu.

Važnost ovog problema postaje jasnija tim više što se u literaturi čak i primjena daleko jeftinijih konvencionalnih metoda vrlo često naziva kontroverznom, budući je dvojbeno njihovo značenje u etiološkom postavljanju dijagnoze izvanbolničke pneumonije i utjecaju na liječenje bolesnika. Stoga novije preporuke stručnih društava definiraju bolesnike kod kojih su ove metode radi utvrđivanja etiologije opravdane i treba ih napraviti. Svim preporukama zajedničko je da opseg mikrobiološke dijagnostičke obrade kod određenog bolesnika ovisi o težini pneumonije. Konkretnije rečeno, rutinsko dijagnostičko testiranje radi utvrđivanja etiologije kod ambulantno liječenih bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom nije obavezno, odnosno proizvoljno je<sup>52,53,54</sup>. Kao što su na taj način definirani bolesnici kod kojih je opravdano raditi konvencionalne mikrobiološke pretrage, isto tako bi trebalo definirati i one bolesnike kod kojih treba napraviti molekularne pretrage. Za očekivati je da se kod bolesnika s težom pneumonijom bakterijski uzročnik uspješnije umnožava, što bi rezultiralo i većim brojem kopija njegove DNA koja bi se onda lakše otkrila molekularnim metodama. Na osnovu toga bi ova skupina bolesnika, dakle onih s težom pneumonijom, bila zapravo ona kod koje je izvođenje ovih metoda opravdano u svakodnevnom radu.

Do sada su provedeno samo dva istraživanja u kojima su analizirani rezultati PCR-a u odnosu na težinu pneumonije prisutne kod bolesnika. U prvom istraživanju su kod bolesnika s teškom pneumonijom pomoću PCR-a detektirani patogeni u njih više od 90 %. Većina ispitanika bez utvrđenog uzročnika nalazila se u skupini bolesnika s lakšom pneumonijom i mlađim bolesnicima. Međutim, navedeno istraživanje ima nekoliko nedostataka – prvo, u njemu je primijenjen samo PCR za detekciju virusa i atipičnih bakterija, dok nije primijenjen PCR za detekciju pneumokoka što bi bilo neophodno s obzirom da se on smatra najčešćim uzročnikom izvanbolničkih pneumonija i drugo, PCR je izveden samo na uzorcima sputuma i obriscima ždrijela, a nisu analizirani bronhoskopski dobiveni uzorci<sup>116</sup>.

U drugom istraživanju većina bolesnika s pozitivnim *M. pneumoniae* PCR rezultatima nalazila se u skupini bolesnika s lakšom pneumonijom (PSI skupina I-II). Iako su hemokulture i pneumokokni antigen u urinu bili češće pozitivni kod bolesnika s teškom pneumonijom (PSI skupina III-V), niti u ovom istraživanju nije primjenjen PCR za detekciju pneumokoka. Bronhoskopski uzorci u ovom istraživanju su analizirani, ali ih je bilo svega tri<sup>117</sup>.

Već je u uvodu navedeno da unatoč dobivenim nalazima, pa čak i onima pozitivnih hemokultura, kliničari vrlo rijetko mijenjaju započetu empirijsku terapiju u onu ciljanu, užeg spektra djelovanja, koja je usmjerena samo na otkrivenog bakterijskog uzročnika<sup>24,31</sup>. Zato je neophodno znanstveno dokazati da je empirijski primjenjeno antimikrobno liječenje adekvatno. Takvo istraživanje u kojem bi se empirijsko liječenje evaluiralo na temelju istodobno provedenih konvencionalnih i molekularnih pretraga do sada nije provedeno.

## **2.2. HIPOTEZA**

1. Pretpostavka ovog istraživanja jest da skupe i tehnički zahtjevne molekularne metode za dijagnostiku bakterijskih uzročnika treba primjenjivati kod bolesnika s težim izvanbolničkim pneumonijama, budući se kod njih očekuje veći broj pozitivnih rezultata nego li kod bolesnika s lakšim pneumonijama.

2. Pretpostavka ovog istraživanja jest da se istodobno primjenjenim molekularnim dijagnostičkim metodama može znanstveno dokazati da je kod bolesnika s izvanbolničkim pneumonijama uzrokovanim bakterijama empirijski primjenjeno antimikrobno liječenje adekvatno.

## **2.3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Opći ciljevi ovog istraživanja su:

1. utvrditi učestalost pojedinih bakterijskih uzročnika i usporediti rezultate konvencionalnih i molekularnih mikrobioloških metoda i
2. oblikovati postupnike za primjenu istraživanih metoda u svakodnevnom laboratorijskom radu.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

1. usporediti rezultate konvencionalnih i molekularnih mikrobioloških metoda kod bolesnika s različitom težinom pneumonije i utvrditi utječe li težina pneumonije na rezultate molekularnih pretraga i
2. evaluirati empirijski primjenjeno antimikrobno liječenje u odnosu na rezultate konvencionalnih i molekularnih mikrobioloških pretraga.

## **3. ISPITANICI I METODE**

### **3.1. ISPITANICI**

U ovo prospektivno istraživanje uključeno je 80 ispitanika starijih od 18 godina koji su u razdoblju od 01. veljače 2007. do 31. siječnja 2008. godine ambulantno pregledani ili hospitalizirani u Klinici za plućne bolesti "Jordanovac" zbog izvanbolničke pneumonije.

Ovo istraživanje dio je znanstvenog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa "Molekularna detekcija mikroorganizama: utjecaj na uporabu antimikrobnih lijekova", čiji je voditelj doc. dr. sc. Vanda Plečko, a u koji sam uključena kao suradnik.

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Etičko povjerenstvo Klinike za plućne bolesti "Jordanovac" u Zagrebu.

Kriterij za kliničku dijagnozu izvanbolničke pneumonije bio je novonastali infiltrat utvrđen radiološkom snimkom prsnog koša kod bolesnika koji unatrag 14 i više dana od

pojavu simptoma nije bio hospitaliziran, niti je boravio u gerijatrijskoj ili sličnoj ustanovi. Prisutni simptomi uključivali su barem dvoje od navedenog: vrućica ili hipotermija, tresavica, znojenje, novonastali kašalj s ili bez iskašljaja, promjena u boji respiratornog sekreta kod bolesnika s kroničnim kašljem, bol u prsištu ili dispneja. Ovi kriteriji navedeni su u preporukama Američkog društva za infektivne bolesti, te su korišteni u većini objavljenih kliničkih istraživanja o izvanbolničkim pneumonijama<sup>1</sup>.

Kod svih ispitanika zabilježeni su podaci o dobi, spolu, pušenju, konzumiranju alkohola, uzimanju antimikrobnih lijekova unatrag 10 dana od hospitalizacije, trajanju hospitalizacije te eventualnom primitku u jedinicu intenzivnog liječenja (JIL). Navedeni podaci iz anamneze, kliničkog statusa i laboratorijski podaci prikupljeni su prema priloženom upitniku. U prilogu se nalazi i informirani pristanak bolesnika i suglasnost za sudjelovanje u istraživanju.

Kod svakog ispitanika na temelju prikupljenih podataka određena je težina pneumonije pomoću indeksa PSI (prema engl. Pneumonia severity index, indeks težine pneumonije) koji se inače uobičajeno koristi za procjenu težine pneumonije i potrebe za hospitalizacijom. Indeks PSI izračunat je na temelju kriterija prikazanih u Tablici 2., te su na temelju njega ispitanici raspoređeni u pet skupina (I-V): skupina I – osobe mlađe od 50 godina bez komorbiditeta i promijenjenih vitalnih znakova; skupina II – 70 bodova; skupina III – 71-90 bodova; Skupina IV – 91-130 bodova i skupina V- > 131 boda<sup>118,119</sup>. Kao bolesnici s težom pneumonijom smatrani su oni koji su pripadali u skupinu PSI IV-V. .



Tablica 2. Kriteriji za izračunavanje indeksa PSI

KRITERIJ	BODOVI
DOB muškarci žene	broj godina broj godina - 10
BORAVAK U UMIROVLJENIČKOM DOMU	10
KOMORBIDITET Maligna bolest Bolest jetre Kongestivno zatajenje srca Cerebrovaskularne bolesti Bubrežne bolesti	30 20 10 10 10
VITALNI ZNACI Mentalna konfuzija Broj respiracija 30/min Sistolički tlak < 90 mmHg Temperatura <35 ili ≥40 <sup>o</sup> C Tahikardija >125 otkucaja/min	20 20 20 15 10
LABORATORIJSKI NALAZI Urea ≥ 11mmol/L Natrij < 130 mmol/L Glukoza ≥ 14 mmol /L Hematokrit < 30 %	20 20 10 10
RADIOLOŠKI NALAZ Pleuralni izljev	10
PARAMETRI OKSIGENACIJE Arterijski pH < 7.35 PaO <sub>2</sub> < 60 mmHg SaO <sub>2</sub> < 90 %	30 10 10

Prema Fine i sur. (118)

U istraživanju su na uzorcima dobivenim od ispitanika napravljene konvencionalne i molekularne mikrobiološke pretrage za najčešće bakterijske uzročnike: *S. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* i *Legionella* spp., te su dobiveni rezultati uspoređeni. Za *H. influenzae*, *S. aureus*, enterobakterije, *P. aeruginosa* i anaerobe korištene su samo konvencionalne metode. Na osnovu epidemioloških podataka iz anamneze kliničari niti u jednog bolesnika nisu indicirali mikrobiološku dijagnostiku za *C. psittaci* i *C. burnetti*, a s obzirom da se radi o rijetkim uzročnicima izvanbolničkih pneumonija, ona u ovom istraživanju nije rutinski napravljena. Konvencionalne mikrobiološke pretrage, osim seroloških, napravljene su u Mikrobiološkom laboratoriju Klinike za plućne bolesti "Jordanovac", a serološke i molekularne u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Prethodno određene skupine ispitanika s različitom težinom pneumonije uspoređene su s obzirom na dobivene rezultate konvencionalnih i molekularnih mikrobioloških pretraga da bi se utvrdilo postoji li povezanost između težine pneumonije i

dobivenih rezultata, posebno onih dobivenih molekularnim pretragama, odnosno utječe li težina pneumonije na rezultate molekularnih pretraga.

Kod ispitanika kod kojih su istodobno napravljenim konvencionalnim i molekularnim pretragama otkriveni bakterijski uzročnici izvanbolničkih pneumonija, evaluirano je početno empirijsko antimikrobno liječenje. Empirijsko liječenje smatrano je adekvatnim ako je dokazani bakterijski uzročnik bio osjetljiv na barem jedan od primjenjenih antimikrobnih lijekova. Ako bakterijski uzročnik nije izoliran u kulturi, te mu zato nije ispitana osjetljivost, korišteni su podaci o praćenju rezistencije bakterija Mikrobiološkog laboratorija Klinike za plućne bolesti "Jordanovac" tijekom 2006. godine, te je na neki antimikrobni lijek smatran osjetljivim onaj bakterijski uzročnik za koji postotak rezistentnih sojeva ne prelazi 20 %, što je gornja granica koja još uvijek dozvoljava empirijsku primjenu tog antimikrobnog lijeka u liječenju ispitivanog bakterijskog uzročnika. S obzirom da za *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* i *Legionella* spp. ispitivanje osjetljivosti nije standardizirano, korišteni su podaci o osjetljivosti ovih bakterijskih uzročnika navedeni u literaturi.

## **3.2. ISTRAŽIVAČKE METODE**

### **3.2.1. Uzorci**

Kod svih ispitanika uzeti su uzorci koji su klinički indicirani u dijagnostici pneumonija, a uključivali su: sputum ako bolesnik može iskašljati, krv za hemokulturu ako je tako indicirao liječnik kliničar koji prati bolesnika, 8-10 ml krvi za serološke pretrage i uzorak urina za otkrivanje bakterijskih antigena.

Za molekularne pretrage uzet je dodatni uzorak sputuma, obrisak ždrijela, te uzorak seruma koji nije uziman posebno, već je dobiven istodobno s onim za serološke pretrage. Svi dodatni uzorci uzeti su nakon informiranja bolesnika, u skladu s naobrazbom, te potvrđivanjem razumijevanja potpisivanjem izjave o informiranom pristanku.

Kod bolesnika kod kojih je liječnik kliničar koji prati bolesnika indicirao bronhoskopsku pretragu, a nakon uobičajene mikrobiološke obrade je preostao dio bronhoskopski dobivenog uzorka (BAL), neiskorišteni dio tog uzorka uzet je za molekularne pretrage. Svi uzorci, osim bronhoskopskih, uzeti su unutar 24 sata od pregleda odnosno primitka bolesnika. Bronhoskopski uzorci uzeti su kada je to indicirao liječnik kliničar koji prati bolesnika. Serum konvalescentne faze uzet je najmanje nakon 14 dana nakon pregleda odnosno primitka bolesnika ako je bolesnik bio dostupan praćenju.

S obzirom da su testovi za otkrivanje antigena u urinu, serološke i molekularne pretrage napravljene tek nakon što su prikupljeni svi uzorci, uzorci na kojima su izvedene navedene pretrage pohranjeni su na adekvatan način. Uzorci urina za otkrivanje antigena i serumi za serološke pretrage pohranjeni su na  $-20^{\circ}$  C, a svi uzorci za molekularne pretrage u tekućem dušiku.

### **3.2.2. Konvencionalne mikrobiološke metode**

S obzirom da niti za jednog od navedenih bakterijskih uzročnika trenutno ne postoji dijagnostički "zlatni standard" visoke osjetljivosti i specifičnosti, konvencionalna mikrobiološka dijagnostika provedena je na temelju podataka u znanstvenoj literaturi i prema preporukama stručnih društava<sup>8,46,48,51,52,53,54</sup>. Konvencionalne mikrobiološke metode uključivale su sljedeće:

- a) za *S. pneumoniae* preparat po Gramu i kultura uzoraka sputuma (i BAL-a ako je to indicirao liječnik kliničar koji prati bolesnika), otkrivanje pnemokoknog antigena u urinu kod svih bolesnika kod kojih je moguće dobiti uzorak, hemokulture ako ih je indicirao liječnik kliničar,
- b) za *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* i *Legionella pneumophila* serogrupa 1-7 određivanje protutijela u serumu bolesnika ELISA metodom i
- c) za *Legionella pneumophila* serogrupa 1 otkrivanje antigena u urinu.

Za razliku od testa pneumokoknog antigena koji je napravljen kod svakog bolesnika kod kojeg je bilo moguće dobiti uzorak urina, otkrivanje antigena *L. pneumophila* serogrupa 1 napravljeno je isključivo kod bolesnika s težom pneumonijom (skupina PSI III-V), te kod slučajeva kod kojih je pretragu indicirao liječnik kliničar koji prati bolesnika. Navedeno je napravljeno iz razloga što pneumonije uzrokovane s *L. pneumophila* općenito nisu česte, ali je *L. pneumophila* uz *S. pneumoniae* u dosadašnjim istraživanjima utvrđena kao najčešći uzročnik kod bolesnika s teškom pneumonijom. Test za pneumokokni antigen napravljen je kod svih bolesnika s obzirom da se *S. pneumoniae* istovremeno smatra i najčešćim uzročnikom izvanbolničkih pneumonija uopće<sup>120,121,122</sup>.

Rutinska bakteriološka obrada uzoraka sputuma, te hemokulture korištene su i za dijagnostiku *H. influenzae*, *S. aureus* i *K. pneumoniae*.

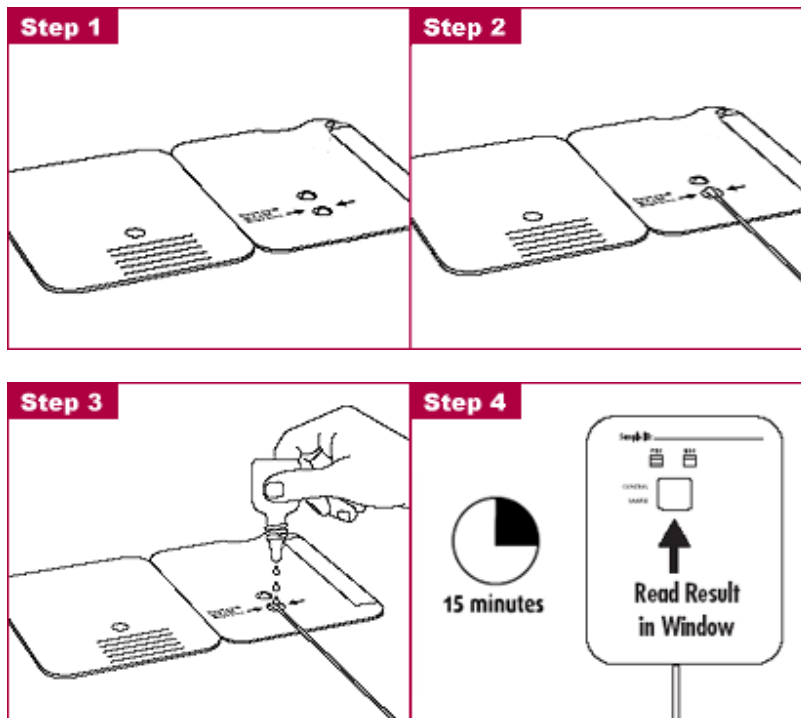
**Preparat po Gramu i kultura sputuma/BAL-a.** Adekvatnost uzoraka sputuma određena je pregledom pod malim mikroskopskim povećanjem (100x) uzorka obojenog metilenskim modrilom. Samo oni uzorci u kojima je bilo prisutno > 25 neutrofilnih leukocita i < 10 epitelnih stanica po vidnom polju evaluirani su na prisutnost predominantnog morfotipa bakterija u preparatu po Gramu (na velikom povećanju od 1000x) i u kulturi. Preparat po Gramu i kultivacija sputuma napravljeni su uobičajenim standardiziranim mikrobiološkim postupcima<sup>123</sup>.

**Hemokulture.** Hemokulture su obrađivane automatski uobičajenim standardiziranim mikrobiološkim postupkom u aparatu BacT/ALERT 3D (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)<sup>123</sup>.

**Otkrivanje antigena u urinu.** Otkrivanje pneumokoknog antigena u urinu napravljeno je pomoću komercijalnog kita (NOW *S. pneumoniae* test; Binax Inc., Scarborough, Maine, US). To je brzi imunokromatografski test za detekciju pneumokoknog antigena u urinu kod bolesnika s pneumonijom, te u cerebrospinalnom likvoru kod bolesnika s meningitisom. Pod pneumokoknim antigenom u testu zapravo se smatra C-polisaharid koji se nalazi u staničnom zidu pneumokoka. Princip testa temelji se na anti-*S. pneumoniae* protutijelima koja su adsorbirana na nitroceluloznu membranu u obliku crte

(engl. Sample Line), a konjugirana su s česticama koje omogućuju vidljivost crte u slučaju pozitivne reakcije, odnosno prisutnosti antigena u urinu koji će s protutijelima stvoriti kompleks. Na istu membranu adsorbirana su i kontrolna protutijela koja omogućuju nastanak druge, kontrolne crte (engl. Control Line). Test se izvodi tako da se bris uroni u uzorak urina, a potom stavi u jažicu u testu, doda se pufer koji se nalazi u pakiranju testa, te se poklopac testa zatvori. Test se očitava nakon 15 minuta na temelju prisutnosti ili odsutnosti dviju crta ružičasto-ljubičaste boje. U slučaju pozitivnog testa vidljive su obje crte, a kod negativnog samo ona kontrolna (Slika 4). U slučaju da kontrolna crta nedostaje, test je nevaljan i treba ga ponoviti<sup>34,36,37,38</sup>. Rezultati testa očitavani su nakon 15 minuta (kako je navedeno u uputi proizvođača), te ponovo nakon 60 minuta od početka testa. Naime, u jednom istraživanju navodi se da očitavanje nakon 60 minuta povećava osjetljivost testa, a ne utječe na specifičnost (100 %) što je potvrđeno na 50 slučajeva pneumonija ne-pneumokokne etiologije<sup>18</sup>.

Slika 4. Postupak izvođenja testa za otkrivanje antigena u urinu



Prema: NOW *Streptococcus pneumoniae* test; Binax Inc, Scarborough, Maine, US

Ovakav brzi imunokromatografski test korišten je i za otkrivanje antigena *L. pneumophila* serogrupa 1 u urinu (NOW *Legionella* Urinary Antigen Test; Binax Inc., Scarborough, Maine, US). Test je očitavan samo nakon 15 minuta kako je i navedeno u uputi proizvođača.

**Serološke pretrage.** Za *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* i *L.pneumophila* serogrupa 1-7 napravljene su serološke pretrage pri čemu su protutijela u serumu bolesnika određivana pomoću ELISA metode. Korišteni su komercijalni kitovi, a sve pretrage napravljene su na aparatu BEP® 2000 (Dade Behring Marburg GmbH; Marburg,

Germany) koji automatski i očitava rezultate testa na temelju optičke gustoće odnosno apsorbancije koristeći odgovarajući *software*.

Za *M. pneumoniae* određivana su IgA protutijela (SERION ELISA *classic* Mycoplasma pneumoniae IgG/IgM/IgA; Institut Virion/Serion GmbH, Würzburg, Germany). Za otkrivanje akutne infekcije odabrano je određivanje IgA protutijela jer su ispitanici odrasle osobe kod kojih ove infekcije mogu biti posljedica reinfekcije, a u tom slučaju porast IgM protutijela može izostati. Kao i IgM, i IgA protutijela nastaju rano u tijeku bolesti. Test je kvalitativan i kvantitativan. Kvalitativni rezultat izražen je kao pozitivan, graničan ili slabo pozitivan (prema engl. *borderline*) i negativan. Kvantitativni rezultat izražen je u U/mL, pri čemu je >14 U/mL pozitivan, 10-14 U/mL graničan ili slabo pozitivan, a <10 U/mL negativan rezultat. Uzorke seruma kod kojih je dobiven slabo pozitivan ili granični rezultat trebalo bi ispitati ponovno, i to istodobno s novim uzorkom seruma uzetim 1 – 2 tjedna kasnije.

Za *C. pneumoniae* određivana su IgM i IgG protutijela (Novagnost™ Chlamydia pneumoniae IgM, Novagnost™ Chlamydia pneumoniae IgG; Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany). Iako su i kod *C. pneumoniae* moguće reinfekcije s izostankom stvaranja IgM protutijela, nije određivana prisutnost IgA protutijela. Naime, prema literaturi titar ovih protutijela može biti povišen kod kronične infekcije koju ova

bakterija također može uzrokovati<sup>46</sup>. Test je kvalitativan i kvantitativan. Kvalitativni rezultat izražen je kao pozitivan, graničan ili slabo pozitivan i negativan. Kvantitativni rezultat izražen je u U, pri čemu je > 11.5 U pozitivan, 8.5-11.5 U graničan ili slabo pozitivan, a < 8.5 U negativan rezultat. Uzorke seruma kod kojih je dobiven slabo pozitivan ili graničan rezultat ne bi trebalo proglasiti niti pozitivnim niti negativnim. Takve uzorke seruma trebalo bi ispitati ponovno, i to istodobno s novim uzorkom seruma uzetim 2-4 tjedna kasnije. Ako je rezultat ponovno graničan ili slabo pozitivan, treba ga smatrati negativnim.

Za *L. pneumophila* serogrupa 1-7 određivana su IgM i IgG protutijela, (SERION ELISA *classic* Legionella pneumophila 1-7 IgG/IgM; Institut Virion/Serion GmbH, Würzburg, Germany). Test je kvalitativan i kvantitativan. Kvalitativni rezultat izražen je kao pozitivan, graničan ili slabo pozitivan i negativan. Kvantitativni rezultat izražen je u U/mL, pri čemu je > 70 U/mL pozitivan, 50-70 U/mL graničan ili slabo pozitivan, a < 50 U/mL negativan rezultat. Uzorke seruma kod kojih je dobiven slabo pozitivan ili granični rezultat trebalo bi ispitati ponovno, i to istodobno s novim uzorkom seruma uzetim 1 – 2 tjedna kasnije.

### **3.2.3. Molekularne mikrobiološke metode**

Od molekularnih metoda u istraživanju je za *S. pneumoniae*, *M. pneumoniae* i *Legionella* species korišten konvencionalni PCR, a za *C. pneumoniae* *real-time* PCR.

#### **3.2.3.1. Obrada kliničkih uzoraka za molekularne pretrage**

Uzorci sputuma i bronhoskopski dobiveni uzorci su zbog svoje viskoznosti obrađeni mukolitičkim agensom dodavanjem jednakog volumena 6 % N-acetil-L-cisteina, potom su vorteksirani 30 sekundi ili duže dok uzorak ne postane tekuć i homogen, a potom inkubirani 15 minuta na sobnoj temperaturi uz stalno miješanje. Uzorci su zatim centrifugirani na 3000g/15 minuta. Supernatant je odbačen, a sediment je resuspendiran

s 1.5 mL tris-EDTA pufera (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) . Nakon kratkog vorteksiranja tako obrađeni uzorci podijeljeni su u alikvote od 0.5 mL kako bi se izbjeglo višestruko odmrzavanje i zamrzavanje, te su pohranjeni u tekućem dušiku.

Obrisci ždrijela uzeti su pomoću brisa s plastičnom drškom koji je potom stavljen u epruvetu s 1.5 mL tris-EDTA pufera. Epruveta s brisom vorteksirana je 1 minutu, bris ocijeđen o stijenku epruvete i potom odbačen. Tako dobiveni tekući uzorci podijeljeni su u alikvote od 0.5 mL kako bi se izbjeglo višestruko odmrzavanje i zamrzavanje, te su pohranjeni u tekućem dušiku.

Uzorci seruma za molekularne pretrage u količini od 200 µL dobiveni su oduzimanjem od ukupne količine seruma uzetog za serološke pretrage i pohranjeni su u tekućem dušiku.

### **3.2.3.2. Izolacija DNA**

Za izolaciju DNA korišten je High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Prema uputi proizvođača izolacija je napravljena na 200 µL uzorka. Za uzorke seruma korišten je protokol za izolaciju nukleinskih kiselina iz krvi, a za uzorke sputuma, obriske ždrijela i bronhoskopski dobivene uzorke protokol za izolaciju nukleinskih kiselina iz tkiva prema uputi proizvođača. Za *S. pneumoniae*, *M. pneumoniae* i *Legionella* species izolirana DNA na kraju postupka razrijeđena je s 200 µL pufera za razrjeđivanje. Za *C. pneumoniae* planirano je izvođenje *real-time* PCR-a u kojem je volumen uzorka izolirane DNA koji se dodaje u reakcijsku smjesu manji. Zbog toga je pri izolaciji DNA za *C. pneumoniae* konačan volumen DNA pripravka s puferom za razrjeđivanje iznosio 50 µL. Cilj ovog manjeg konačnog volumena, kako je i navedeno u uputi proizvođača, bio je povećati koncentraciju DNA u maloj količini pripravka izolirane DNA koji se dodaje u reakcijsku smjesu kod *real-time* PCR-a. Svi pripravci izolirane DNA pohranjeni su do izvođenja PCR metoda na -20° C.



Pneumokokna DNA korištena kao pozitivna kontrola kod PCR-a za *S. pneumoniae* izolirana je iz bakterijske suspenzije pripremljene iz kulture pneumokoka stare 24 sata. Tri soja pneumokoka dobivena su iz rutinskog rada Mikrobiološkog laboratorija Klinike za plućne bolesti "Jordanovac" i identificirani su standardnim laboratorijskim metodama<sup>123</sup>. Iz kulture pneumokoka napravljena je suspenzija u sterilnoj fiziološkoj otopini gustoće 4 McFarlanda koja odgovara približno  $1.2 \times 10^9$  CFU/ml. Za izolaciju DNA iz ovako pripremljene bakterijske suspenzije također je korišten High Pure PCR Template Preparation Kit prema protokolu za bakterije koji uključuje i obradu lizozimom (10 mg/ml u 10 mM Tris-HCl, pH 8.0).

Za *M. pneumoniae*, *Legionella* species i *C. pneumoniae* nije bilo potrebno izolirati DNA iz bakterijskih sojeva koja bi bila korištena kao pozitivna kontrola jer su za PCR kod ovih bakterijskih uzročnika korišteni komercijalni kitovi koji između ostalog uključuju i pozitivnu kontrolu.

### **3.2.3.3. PCR metoda za *S. pneumoniae***

Za *S. pneumoniae* korišten je konvencionalni PCR. Ciljana sekvenca bio je fragment gena za pneumolizin. Produkt PCR reakcije veličine je 355 parova baza (bp). Korišten je par početnica TIB 1 (5'-GTGATATTTCTGTAACAGCTACC-3') i TIB 2 (5'-GAGAATTCCTGTCTTTTCAAAG-3') (TIB MOLBIOL; Berlin, Germany). Izbor početnica i njihova koncentracija, kao i sam PCR i detekcija produkata izvedeni su kako su opisali Dagan i suradnici<sup>64</sup>. DNA polimeraza, nukleotidi i  $MgCl_2$  korišteni su iz PCR Master kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Reakcijska smjesa napravljena je na sljedeći način:

<b>Reagencija</b>	<b>Volumen</b>
PCR master mix	25.0 µL
PCR voda	11.0 µL
TIB 1	2.0 µL
TIB 2	2.0 µL
Uzorak	10.0 µL
<b>Ukupni volumen</b>	<b>50.0 µL</b>

PCR reakcija izvedena je na aparatu Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems; Foster City, USA). Amplifikacija se sastojala od 30 ciklusa programiranih na sljedeći način:

	<b>Temperatura</b>	<b>Vrijeme trajanja</b>
Denaturacija	94° C	1 min
Vežanje početnica	60° C	1 min
Elongacija	72° C	1 min

Produkti PCR reakcije analizirani su elektroforezom u 2 % agarozu gelu. Osmam µl dobivenog PCR produkta i 1 µl boje (gel loading buffer) aplicirano je na agarozu gel koji je po završetku elektroforeze (60 mA, 60 min) obojen etidij-bromidom, te fotografiran pod ultravioletnim svjetlom. Za određivanje veličine PCR produkata korišten je DNA Molecular Weight Marker XIV (100-1500bp) (Roche Diagnostics; Mannheim, Germany).

PCR metoda za *S. pneumoniae* izvedena je prvo na uzorcima DNA izolirane iz ranije spomenutih sojeva pneumokoka. Nakon što su njihovom amplifikacijom dobiveni produkti očekivane veličine od 355 bp, metoda je izvedena na uzorcima seruma i BAL-a.

Kao pozitivna kontrola korištena je pneumokokna DNA izolirana iz bakterijske suspenzije, dok je kao negativna kontrola korištena sterilna destilirana voda. S obzirom da prema literaturi serum i uzorci iz respiratornog sustava pripadaju u kliničke uzorke u

kojima je moguća prisutnost inhibitora PCR reakcije, napravljeni su i postupci koji mogu umanjiti utjecaj inhibitora na PCR reakciju, kao i postupci kojima se eventualna prisutnost takvih inhibitora može otkriti. Da bi se smanjio utjecaj eventualno prisutnih inhibitora, PCR reakcija ponovljena je sa svim uzorcima seruma nakon njihovog razrjeđivanja u razrjeđenju 1:8 *pooliranjem* kako je to navedeno u literaturi. Prisutnost inhibitora PCR reakcije u PCR-negativnim uzorcima utvrđivana je ponavljanjem reakcije nakon što su u uzorke prije amplifikacije dodana 2 µl pneumokokne DNA (*spiking*). Ovaj postupak napravljen je s uzorcima seruma kod 16 bolesnika koji su imali pozitivan nalaz pneumokoknog antigena u urinu, kao i s uzorcima BAL-a. <sup>124,125</sup>.

#### **3.2.3.4. PCR metoda za *M. pneumoniae***

PCR metoda napravljena je pomoću dijagnostičkog kita Venor<sup>®</sup>Mp (Minerva Biolabs, Berlin, Germany) za konvencionalni PCR za *M. pneumoniae*. Sve potrebne reagensije, osim DNA polimeraze, nalaze se u kitu. Korištena je hot-start MB *Taq* DNA Polymerase (Minerva Biolabs, Berlin, Njemačka). Ciljana sekvenca je fragment regije P1 operona. Produkt PCR reakcije veličine je 207 bp.

Pozitivna kontrola koju čine fragmenti genoma *M. pneumoniae* sadržana je u samom kitu. Da bi se isključila eventualna inhibicija PCR reakcije kod PCR-negativnih uzoraka, u kitu je sadržana i interna kontrola (plazmidna DNA) koja se dodaje u svaku reakciju, te daje produkt veličine 263 bp.

PCR metoda i detekcija produkata izvedena je kako je to navedeno u uputi proizvođača.

Reakcijska smjesa napravljena je na sljedeći način:

<b>Reagencija</b>	<b>Volumen</b>
PCR voda	7.3 µL
Pufer	2.5 µL
Početnice i nukleotidi	5.0 µL
Interna kontrola	5.0 µL
<i>Taq</i> polimeraza	0.2 µL
Uzorak	5.0 µL
<b>Ukupni volumen</b>	<b>25.0 µL</b>

PCR reakcija izvedena je na aparatu Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems; Foster City, USA). Amplifikacija se sastojala od 35 ciklusa programiranih na sljedeći način::

	<b>Temperatura</b>	<b>Vrijeme trajanja</b>
Denaturacija	94 <sup>o</sup> C	30 sek
Vežanje početnica	65 <sup>o</sup> C	30 sek
Elongacija	72 <sup>o</sup> C	30 sek

Produkti PCR reakcije analizirani su elektroforezom u 1.5 % agarozu gelu. Osmam µl dobivenog PCR produkta i 1 µl boje (gel loading buffer) aplicirano je na agarozu gel koji je po završetku elektroforeze (100 mA, 90 min) obojen etidij-bromidom, te fotografiran pod ultravioletnim svjetlom. Za određivanje veličine PCR produkata korišten je DNA Molecular Weight Marker XIV (100-1500 bp) (Roche Diagnostics; Mannheim, Germany).

PCR metoda za *M. pneumoniae* izvedena je na uzorcima sputuma i BAL-a.

### 3.2.3.5. PCR metoda za *Legionella species*

PCR metoda napravljena je pomoću dijagnostičkog kita Onar<sup>®</sup>Ls (Minerva Biolabs, Berlin, Germany) za konvencionalni PCR za *Legionella species*. Sve potrebne reagensije, osim DNA polimeraze, nalaze se u kitu. Korištena je hot-start MB *Taq* DNA Polymerase (Minerva Biolabs, Berlin, Njemačka). Ciljana sekvenca je fragment 16S rRNA područja. Produkt PCR reakcije veličine je 245 bp. Ovo područje genoma je vrlo dobro očuvano unutar vrste *Legionella* i omogućuje detekciju *L. pneumophila* serogrupa 1-15, *L. longbeachae*, *L. dumoffi*, *L. bozemanii* i *L. gormanii*.

Pozitivna kontrola koju čine fragmenti genoma *L. pneumophila* sadržana je u samom kitu. Da bi se isključila eventualna inhibicija PCR reakcije kod PCR-negativnih uzoraka, u kitu je sadržana i interna kontrola (plazmidna DNA) koja se dodaje u svaku reakciju, te daje produkt veličine 150 bp.

PCR metoda i detekcija produkata izvedena je kako je to navedeno u uputi proizvođača.

Reakcijska smjesa napravljena je na sljedeći način:

Reagensija	Volumen
PCR voda (PCR Master kit; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)	12.3 µL
Pufer	2.5 µL
Početnice i nukleotidi	2.5 µL
Interna kontrola	2.5 µL
<i>Taq</i> polimeraza	0.2 µL
Uzorak	5.0 µL
<b>Ukupni volumen</b>	<b>25.0 µL</b>

PCR reakcija izvedena je na aparatu Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems; Foster City, USA). Amplifikacija se sastojala od 35 ciklusa programiranih na sljedeći način::

	Temperatura	Vrijeme trajanja
Denaturacija	94° C	30 sek
Vežanje početnica	55° C	30 sek
Elongacija	72° C	30 sek

Produkti PCR reakcije analizirani su elektroforezom u 1.5 % agarozu gelu. Osmam µl dobivenog PCR produkta i 1 µl boje (gel loading buffer) aplicirano je na agarozu gel koji je po završetku elektroforeze (100 mA, 90 min) obojen etidij-bromidom, te fotografiran pod ultravioletnim svjetlom. Za određivanje veličine PCR produkata korišten je DNA Molecular Weight Marker XIV (100-1500 bp) (Roche Diagnostics; Mannheim, Germany).

PCR metoda za *Legionella* species izvedena je na uzorcima sputuma i BAL-a.

### 3.2.3.6. PCR metoda za *Chlamydohila pneumoniae*

Za *C. pneumoniae* korišten je *real-time* PCR. Ciljana sekvenca je fragment veličine 140 bp *C. pneumoniae* genoma. Fragment je amplificiran pomoću specifičnih početnica i detektiran probama obilježenim s LightCycler® Red 640.

Internu kontrolu činio je dodatni PCR produkt veličine 278 bp. Detektiran je probama obilježenim s bojom LC705.

Kao pozitivna kontrola, a istovremeno i kao standard za kvantifikaciju korištena je ciljana DNA u obliku 6 različitih koncentracija od 10<sup>1</sup> do 10<sup>6</sup> ciljanih molekula/reakciji. Sve navedene reagensije nalaze se u kitu LightMix® for the detection of *Chlamydia pneumoniae* (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany).

Navedeni kit sadržavao je potrebne početnice, probe, internu kontrolu i standarde za pozitivnu kontrolu i kvantifikaciju. Za ostale potrebne reagensije (DNA polimeraza,

nukleotidi i  $Mg^{2+}$ ) korišten je LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Metoda je napravljena kako je to navedeno u uputi proizvođača.

Reakcijska smjesa napravljena je na sljedeći način:

<b>Reagencija</b>	<b>Volumen</b>
PCR voda	1.8 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> otopina 25 mM	3.2 $\mu$ L
Specifične početnice i probe	4.0 $\mu$ L
Interna kontrola	4.0 $\mu$ L
FastStart mix	4.0 $\mu$ L
Uzorak i standard	5.0 $\mu$ L
<b>Ukupni volumen</b>	<b>20.0 <math>\mu</math>L</b>

Metoda je izvedena na aparatu LightCycler® 2.0 Instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Protokol se sastojao od 4 koraka:

1. denaturacija – denaturacija DNA u uzorcima i aktivacija enzima,
2. amplifikacija ciljne DNA,
3. *melting* – analiza *melting* krivulje za identifikaciju PCR produkata i
4. hlađenje aparata.

Programiranje je napravljeno na sljedeći način:

	Denaturation	Cycling			Melting			Cooling
Analysis Mode	None	Quantification mode			Melting Curves mode			None
Cycles	1	55			1			1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	1
Target [C <sup>0</sup> ]	95	95	62	72	95	40	85	40
Hold [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:05	00:00:05	00:00:05	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30
Ramp Rate [C <sup>0</sup> ]	20	20	10	20	30	30	0.2	20
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Continu.	None

Prema LightMix® for the detection of *Chlamydia pneumoniae* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)

Analiza rezultata napravljena je pomoću LightCycler Software Version 4.05. Identifikacija PCR produkata za uzorke i standarde napravljena je pomoću *melting* krivulje s Tm od 67.0<sup>0</sup> C na kanalu 640. Interna kontrola detektirana je na kanalu 705 s Tm od 67-69<sup>0</sup> C.

Metoda je izvedena na uzorcima sputuma i BAL-a.

Tijekom izvođenja molekularnih metoda obavezno je bilo pridržavanje općih mjera opreza kako bi se spriječila kontaminacija (korištenje odvojenih prostora za izolaciju DNA, pripremu reagensa i postamplifikacijske postupke, upotreba nastavaka za pipete s filterom, redovito čišćenje radnih površina i UV zračenje).



### **3.3. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA**

U statističkoj analizi podataka korišteni su parametri deskriptivne statistike, a razlike među skupinama ispitane su pomoću Pearsonovog hi-kvadrat testa i Fisherovog egzaktnog testa. Statistički značajnim smatrane su vrijednosti od  $p < 0.05$ .

## **INFORMIRANI PRISTANAK BOLESNIKA**

### **Naziv istraživanja: Značenje molekularnih metoda u dijagnostici izvanbolničkih pneumonija uzrokovanih bakterijama**

Poštovana/poštovani,

pozivamo Vas da sudjelujete u znanstvenom istraživanju u kojem će se istražiti nove dijagnostičke metode i njihovo značenje u dijagnostici izvanbolničkih pneumonija. Molimo Vas da pažljivo pročitate ovu obavijest jer su u njoj sadržani podaci koji će Vam pomoći da odlučite želite li sudjelovati u ovom znanstvenom istraživanju, te zašto i kako se ono provodi. U slučaju da neke dijelove sadržaja ne razumijete, molimo Vas da se s pitanjima obratite liječniku koji vodi ovo znanstveno istraživanje.

Pneumonija (upala pluća) uzrokovana bakterijama liječi se antimikrobnim lijekovima (antibioticima). S obzirom da pneumonije može uzrokovati niz različitih bakterija, neophodno je utvrditi o kojoj se bakteriji radi da bi se mogao primijeniti odgovarajući antibiotik i tako uspješno liječiti bolesnik. Za sada se bakterijski uzročnici mogu utvrditi na dva načina: uzgojem bakterijskih uzročnika iz uzoraka iskašljaja i krvi ili pak otkrivanjem bakterijskih proteina u urinu ili protutijela u serumu (dio krvi koji se dobiva postupkom identičnim vađenju krvi). Ovi navedeni postupci nemaju zadovoljavajuće rezultate jer se njima uzročnik otkrije u svega 50-75 % bolesnika s pneumonijom, a bez poznatog uzročnika nema niti adekvatnog i ciljanog liječenja antimikrobnim lijekovima.

Danas se u kliničkim bolnicama u svijetu svakodnevno primjenjuju i nove, molekularne metode pomoću kojih se mogu detektirati nukleinske kiseline (DNA, RNA) bakterijskih uzročnika u istim uzorcima koji se i inače uzimaju i gore su spomenuti, ali su ove metode brže i osjetljivije.

#### **Cilj istraživanja**

Ovim bismo istraživanjem dokazali da se novim, molekularnim metodama bakterijski uzročnici mogu otkriti u većeg broja bolesnika s pneumonijom nego li dosadašnjim dijagnostičkim metodama. Na taj način bi se poboljšalo i liječenje pneumonija, jer bi se i u onih bolesnika u kojih danas ne možemo otkriti uzročnika mogli primijeniti odgovarajući antimikrobni lijekovi. Zato je potrebno na uzorcima istodobno napraviti uobičajene pretrage kao do sada, ali i one nove, molekularne. Obje vrste pretraga radit će se na uzorcima koji se i inače uzimaju za dijagnostiku pneumonija, samo što ih je potrebno uzeti količinski više kako bi se mogle ispitati i molekularne metode.

### **Vaša uloga u ovom znanstvenom istraživanju**

Ako se složite sa sudjelovanjem u istraživanju, bit će vam uzeti sljedeći uzorci:

- a) iskašljaj ako možete iskašljati; potrebna su dva uzorka – jedan za uobičajene, a drugi za molekularne pretrage;
- b) krv ako je Vaš liječnik odlučio da je potrebno mikrobiološki ispitati uzorke krvi;
- c) serum – dobiva se tako da se izvadi krv, a onda se iz nje izdvoji serum koji je zapravo dio krvi; za uzorak seruma potrebno je izvaditi 8-10 mL krvi, a na taj način dobit će se uzorak i za uobičajeno određivanje protutijela na bakterijske uzročnike kao i za molekularne pretrage;
- d) urin – uobičajeni uzorak za određivanje bakterijskih proteina pomoću brzih testova;
- e) obrisak ždrijela - ovo je uzorak koji je potrebno dodatno učiniti za potrebe ovog istraživanja.

Važno je naglasiti da su svi gore navedeni uzorci i inače indicirani i uzimaju se u bolesnika s pneumonijom (osim obriska ždrijela čije je uzimanje vrlo jednostavno, brzo i bezbolno).

Vaši podaci će se obrađivati elektronički. U bazu podataka bit ćete uneseni prema inicijalima, te Vaše ime neće biti otkriveno. Vašu medicinsku dokumentaciju moći će pregledati samo liječnici koji sudjeluju u istraživanju, predstavnici Etičkog povjerenstva u ustanovi u kojoj se liječite i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta.

Podaci dobiveni istraživanjem mogu imati znanstvenu vrijednost, te će u tom slučaju biti objavljeni u znanstvenim publikacijama, pri čemu će Vaš identitet ostati anoniman.

Ovo istraživanje pregledalo je i odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje se provodi u skladu sa svim primjenjivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje istraživanja i sigurnost osoba koje sudjeluju u ovom znanstvenom istraživanju uključujući Osnove dobre kliničke prakse, Helsinšku deklaraciju, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03) i Zakon o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04).

Vaše sudjelovanje u ovom istraživanju je dobrovoljno. Ako odlučite sudjelovati, potrebno je potpisati suglasnost o sudjelovanju čiji jedan primjerak ostaje kod Vas. U bilo koje vrijeme možete slobodno, bez navađanja razloga i bez posljedica prekinuti sudjelovanje u istraživanju. Ako odlučite prekinuti sudjelovanje, molimo Vas da o tome na vrijeme obavijestite liječnika koji vodi ovo znanstveno istraživanje. Nepriстанak na sudjelovanje u ovom istraživanju neće utjecati na vaše daljnje liječenje i kontrole, kao niti na odnos medicinskog osoblja prema Vama.

Za dodatne podatke slobodno se obratite liječniku koji vodi istraživanje:

Ivana Mareković, dr. med.

Klinika za plućne bolesti "Jordanovac", Zagreb

Mikrobiološki laboratorij

Tel.:01 2385 264.

Hvala Vam što ste pročitali ovaj dokument i razmotrili sudjelovanje u ovom znanstvenom istraživanju.

Ako ste odlučili sudjelovati, molimo Vas da potpišete Suglasnost za sudjelovanje.

### **SUGLASNOST ZA SUDJELOVANJE**

Upoznat sam sa svim detaljima i koristima, te eventualnim mogućim rizicima ovog istraživanja od strane liječnika, te pristajem da se isto provede.

IME I PREZIME ISPITANIKA: \_\_\_\_\_

POTPIS: \_\_\_\_\_

DATUM: \_\_\_\_\_

Voditelj istraživanja:

Ime i prezime: Ivana Mareković, dr. med.

Potpis. \_\_\_\_\_

Datum: \_\_\_\_\_



Antimikrobni lijek	Doza	Trajanje primjene (dani hospitalizacije)
1. _____	_____	_____
2. _____	_____	_____
3. _____	_____	_____

UZORCI UZETI U BOLESNIKA:

- a) obrisak ždrijela
- b) sputum
- c) bronhoskopski uzorak (kateter aspirat, bronhoalveolarni lavat)
- d) serum akutne faze
- e) serum konvalescentne faze
- f) urin

REZULTATI MIKROBIOLOŠKIH PRETRAGA

*Streptococcus pneumoniae*

Gram preparat sputuma	Kultura sputuma	Hemokultura	Antigen u urinu	PCR serum

*Mycoplasma pneumoniae*

ELISA	PCR obrisak ždrijela	PCR sputum	PCR bronhoskopski uzorak

*Chlamydomphila pneumoniae*

ELISA	PCR obrisak ždrijela	PCR sputum	PCR bronhoskopski uzorak

*Legionella species*

Antigen u urinu	ELISA	PCR obrisak ždrijela	PCR sputum	PCR bronhoskopski uzorak

\* rezultat seroloških reakcija upisati kao titar, a rezultat PCR metode upisati kao pozitivan, negativan ili inhibicija reakcije

OSTALI MIKROBIOLOŠKI NALAZI

UZORAK	NALAZ

## 4. REZULTATI

### 4.1. DEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA S IZVANBOLNIČKOM PNEUMONIJOM

U ovo prospektivno istraživanje bilo je uključeno 80 ispitanika starijih od 18 godina s kliničkom dijagnozom izvanbolničke pneumonije.

Od ukupno 80 ispitanika njih 28 (35,0 %) bile su žene, a njih 52 (65,0 %) muškarci. Srednja dob ( $\pm$  SD) ispitanika bila je  $62,6 \pm 15,5$  godina (raspon 25-93 godine).

Dvadeset tri (28,8 %) ispitanika bili su pušači.

Kod 47 (58,8 %) ispitanika bile su prisutne popratne bolesti, odnosno komorbiditet. Najčešće su bile kardiovaskularne bolesti koje su bile prisutne kod 27 (33,8 %) ispitanika, a zatim kronična opstruktivna plućna bolest (KOPB) kod 21 (26,3 %), diabetes mellitus kod 8 (10,0 %), maligne bolesti kod 7 (8,8 %) i cerebrovaskularne bolesti kod 5 (6,3 %) ispitanika. Od ostalih popratnih bolesti i stanja hipotireoza, astma, bronhiektazije i epilepsija bile su prisutne u po tri (3,8 %), bubrežne bolesti i kronična bolest jetre u po dva (2,5 %), a alkoholizam, splenektomija, amiotrofična lateralna skleroza i reumatoidni artritis u po jednog (1,3 %) ispitanika. Kod 23 (28,8 %) ispitanika bile su prisutne > 2 popratne bolesti istovremeno. Srednja vrijednost leukocita u krvi iznosila je  $12,7 \times 10^9/L$  (raspon 3,8-34,3), a C-reaktivnog proteina (CRP) 151,5 mg/L (raspon 2,5 – 542,4) (Tablica 2).

Tablica 2. Demografske i kliničke karakteristike ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom (N=80).

Karakteristike ispitanika	N (%)
<b>Demografske karakteristike</b>	
Srednja dob ± SD	62,6 ± 15,5
Žene	28 (35,0)
Muškarci	52 (65,0)
<b>Kliničke karakteristike</b>	
Pušenje	23 (28,8)
Komorbiditet	
Kardiovaskularne bolesti	27 (33,8)
KOPB*	21 (26,3)
Diabetes mellitus	8 (10,0)
Maligne bolesti	7 (8,8)
Cerebrovaskularne bolesti	5 (6,3)
Leukociti	
medijan x 10 <sup>9</sup> /L (raspon vrijednosti)	12,7 (3,8 - 34,3)
C-reaktivni protein,	
medijan mg/L (raspon vrijednosti)	151,5 (2,5 – 542,4)

\*KOPB: kronična opstruktivna plućna bolest

Podaci su prikazani kao broj ispitanika (%) ako nije drugačije navedeno.

Od ukupno 80 ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom, hospitalizirano ih je bilo 69 (86,3 %), a ambulantno liječeno njih 11 (13,8 %). Trinaest (16,3 %) hospitaliziranih bolesnika liječeno je u jedinici intenzivnog liječenja (JIL) (Tablica 3).



Tablica 3. Ispitanici s izvanbolničkom pneumonijom s obzirom na mjesto liječenja (N=80).

Mjesto liječenja	N(%)
<b>Ambulantno liječeni</b>	11 (13,8)
<b>Hospitalizirani</b>	69 (86,3)
<b>Primljeni u JIL*</b>	13 (16,3)

\*JIL: jedinica intenzivnog liječenja

U svakog ispitanika na temelju prikupljenih podataka određena je težina pneumonije pomoću indeksa PSI<sup>115,116</sup>. Na temelju PSI indeksa 23 (28,8 %) ispitanika pripadala su u skupinu I, 9 (11,3 %) ispitanika u skupinu II, 16 (20,0) ispitanika u skupinu III, 23 (28,8 %) ispitanika u skupinu IV i 9 (11,3 %) ispitanika u skupinu V (Tablica 4).

Tablica 4. Ispitanici s izvanbolničkom pneumonijom s obzirom na težinu pneumonije (N=80).

PSI* skupina	N(%)
<b>PSI I</b>	23 (28,8)
<b>PSI II</b>	9 (11,3)
<b>PSI III</b>	16 (20,0)
<b>PSI IV</b>	23 (28,8)
<b>PSI V</b>	9 (11,3)

\*PSI: indeks težine pneumonije (prema. engl. Pneumonia severity index)

Antimikrobno liječenje prije pregleda i/ili hospitalizacije u Klinici primjenjeno je u 30,0 % (24/80) ispitanika.

## 4.2. ETIOLOGIJA I UČESTALOST POJEDINIH BAKTERIJSKIH UZROČNIKA

Etiologija izvanbolničkih pneumonija utvrđena je kod 42 (52,5 %) ispitanika.

Etiologija je češće utvrđena kod bolesnika koji prije pregleda i/ili hospitalizacije u Klinici nisu liječeni antimikrobnim lijekovima u odnosu na one koji jesu, ali ova razlika nije bila statistički značajna (53,6 % vs 50,0 %;  $p=0,764$ ).

Najčešći bakterijski uzročnik bio je *S. pneumoniae* koji je utvrđen kod 25 (31,3 %) ispitanika, a nakon njega *M. pneumoniae* kod 7 (8,8 %) i *H. influenzae* kod 5 (6,3 %) ispitanika. *C. pneumoniae* i *P. aeruginosa* utvrđeni su u po 4 (5,0 %), a *Legionella species* i *K. pneumoniae* u po dva (2,5 %) ispitanika (Tablica 5). Atipični bakterijski uzročnici utvrđeni su kod ukupno 13 (16,3 %) ispitanika.

Tablica 5. Etiologija i učestalost bakterijskih uzročnika kod ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom (N=80).

Bakterijski uzročnik	N (%)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	25 (31,3)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	7 (8,8)
<i>Haemophilus influenzae</i>	5 (6,3)
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	4 (5,0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4 (5,0)
<i>Legionella species</i>	2 (2,5)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2 (2,5)
UKUPNO	49 (61,3)
Miješane infekcije	7 (8,8)

Kod 35 ispitanika bio je prisutan samo jedan, dok su kod 7 (8,8 %) ispitanika istovremeno bila prisutna 2 bakterijska uzročnika (Tablica 6). Etiologija je ostala nepoznata kod 47,5 % (38/80) ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom.

Tablica 6. Kombinacije bakterijskih uzročnika kod 7 ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom miješane etiologije.

Bakterijski uzročnici	N (%)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> + drugi uzročnik	5 (71,4)
<i>S. pneumoniae</i> + <i>H. influenzae</i>	3 (42,9)
<i>S. pneumoniae</i> + <i>K. pneumoniae</i>	1 (14,3)
<i>S. pneumoniae</i> + <i>M. pneumoniae</i>	1 (14,3)
Ostali uzročnici	
<i>P. aeruginosa</i> + <i>M. pneumoniae</i>	2 (28,6)

U svim dobnim skupinama najčešći bakterijski uzročnik bio je *S. pneumoniae*. Učestalost pojedinih bakterijskih uzročnika nije se statistički značajno razlikovala između ispitanika mlađih i starijih od 60 godina (*S. pneumoniae* 40,5 % vs 23,3 %,  $p=0,096$ ; *M. pneumoniae* 8,1 % vs 6,97 %,  $p=0,415$ ; *H. influenzae* 8,1 % vs 2,32 %,  $p=0,136$ ; *C. pneumoniae* 2,7 % vs 7,0 %,  $p=0,367$ ; *P. aeruginosa* 2,7 % vs 7,0 %,  $p=0,367$ ; *Legionella* spp. 2,7 % vs 2,3 %,  $p=0,714$ ; *K. pneumoniae* 0 vs 4,65 %,  $p=0,286$ ) (Tablica 7).

Tablica 7. Učestalost bakterijskih uzročnika kod ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom s obzirom na dob ispitanika (N=80).

Bakterijski uzročnik	N (%) po dobnim skupinama *			
	15-44 god. (N=11)	45-59 god. (N=26)	>60 god. (N=43)	Ukupno (N=80)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5 (45,5)	10 (38,5)	10 (23,3)	25 (31,3)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	0	4 (15,4)	3 (7,0)	7 (8,8)
<i>Haemophilus influenzae</i>	0	4 (15,4)	1 (2,3)	5 (6,3)
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	0	1 (3,8)	3 (7,0)	4 (5,0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	1 (3,8)	3 (7,0)	4 (5,0)
<i>Legionella species</i>	0	1 (3,8)	1 (2,3)	2 (2,5)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	2 (4,7)	2 (2,5)
UKUPNO	5 (45,5)	21 (80,8)	23 (53,5)	49 (61,3)

\* Dobne skupine prema preporukama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO)<sup>16</sup>

### 4.3. REZULTATI KONVENCIONALNIH I MOLEKULARNIH MIKROBIOLOŠKIH METODA

#### 4.3.1. Uzorci

Uzorci sputuma dobiveni su kod 64 (80,0%) ispitanika, dok su hemokulture uzete kod njih 11 (13,8 %). Uzorci urina za otkrivanje antigena *S. pneumoniae* i *L. pneumophila* serogrupa 1 dobiveni su kod 76 (95,0 %) ispitanika. Bronhoskopsku pretragu liječnici kliničari indicirali su kod 19 (23,8 %) ispitanika, te je kod njih dobiven uzorak BAL-a. Uzorci seruma za PCR za *S. pneumoniae* dobiveni su kod 77 (96,3 %) ispitanika, a za serološke pretrage za *M. pneumoniae*, *L. pneumophila* serogrupa 1-7 i *C. pneumoniae* kod 79 (98,8 %) ispitanika.

Kod 8 ispitanika liječnici kliničari indicirali su i pleuralnu punkciju kojom su dobiveni uzorci pleuralnog izljeva.

Od ukupno 64 dobivena uzorka sputuma, 36 (56,3 %) uzoraka bilo je adekvatno, a u njih 10 (27,8 %, odnosno 12,5 % od ukupno 80 ispitanika) utvrđena je prisutnost predominantnog morfotipa bakterija. Pri tome su u 9 uzoraka bili prisutni gram-pozitivni diplokokci, a samo u jednom gram-negativni štapići.

Kultura sputuma bila je pozitivna u 17 (47,2 %) adekvatnih uzoraka. Pozitivne kulture sputuma u adekvatnim uzorcima bile su statistički značajno rjeđe kod bolesnika koji su prethodno primali antimikrobne lijekove u usporedbi s onima koji ih nisu dobivali (22,2 % vs 72,2 %;  $p=0,003$ ). Rezultati preparata po Gramu po pozitivitetu se nisu statistički značajno razlikovali između bolesnika koji su prethodno primali antimikrobne lijekove i onih koji ih nisu dobivali (27,8 % vs 27,8 %;  $p=0,644$ ).

Kultura BAL-a bila je pozitivna kod 6 (31,6 %) od ukupno 19 ispitanika kod kojih je indicirana bronhoskopska pretraga. Svi bolesnici su prije bronhoskopske pretrage primali antimikrobne lijekove.

#### 4.3.2. *Streptococcus pneumoniae*

Primjenjenim mikrobiološkim metodama *S. pneumoniae* utvrđen je kod 25 (31,3 %) ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom.

Od ukupno 64 ispitanika kod kojih je dobiven uzorak sputuma, *S. pneumoniae* izoliran je u kulturi kod njih 8 (12,5 %). Od 9 uzoraka sputuma koji su imali pozitivan preparat po Gramu s prisutnim gram-pozitivnim diplokokima, pneumokok je u kulturi porastao u njih 4. Od preostalih 5 uzoraka, u njih 4 porasla je fiziološka flora, a u jednom *Candida* spp.

Od ukupno 19 ispitanika kod kojih je dobiven uzorak BAL-a, *S. pneumoniae* izoliran je u kulturi u samo jednom uzorku (5,3 %).

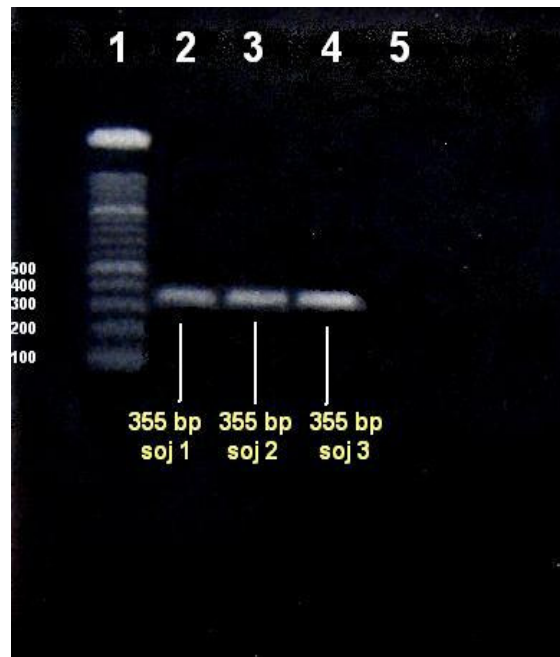
Sve hemokulture (N=11) ostale su sterilne.

Od ukupno 76 ispitanika kod kojih je dobiven uzorak urina, pneumokokni antigen bio je pozitivan kod njih 16 (21,1 %). Kod dva bolesnika s pozitivnim pneumokoknim antigenom u urinu pneumokok je bio izoliran i u kulturi sputuma.

Uzorci pleuralnog izljeva (N=8) ostali su sterilni.

PCR za *S. pneumoniae* izveden je prvo na uzorcima DNA izolirane iz tri soja pneumokoka. Amplifikacijom pomoću početnica za gen pneumolizina su kod sva tri soja dobiveni produkti očekivane veličine od 355 bp (Slika 5).

Slika 5. Elektroforeza na agarozu gelu amplificiranih PCR-produkata u uzorcima DNA izolirane iz tri soja pneumokoka. Stupac 1, DNA molecular weight marker XIV (100-1500 bp); stupci 2, 3 i 4, produkti očekivane veličine od 355 bp dobiveni amplifikacijom pomoću početnica za gen pneumolizina; stupac 5, negativna kontrola (sterilna destilirana voda).



PCR je nakon toga izveden na uzorcima seruma i BAL-ovima ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom. PCR rezultati u svih 77 uzoraka seruma bili su negativni. Kao primjer, negativni rezultati za 9 takvih uzoraka seruma prikazani su na Slici 6.

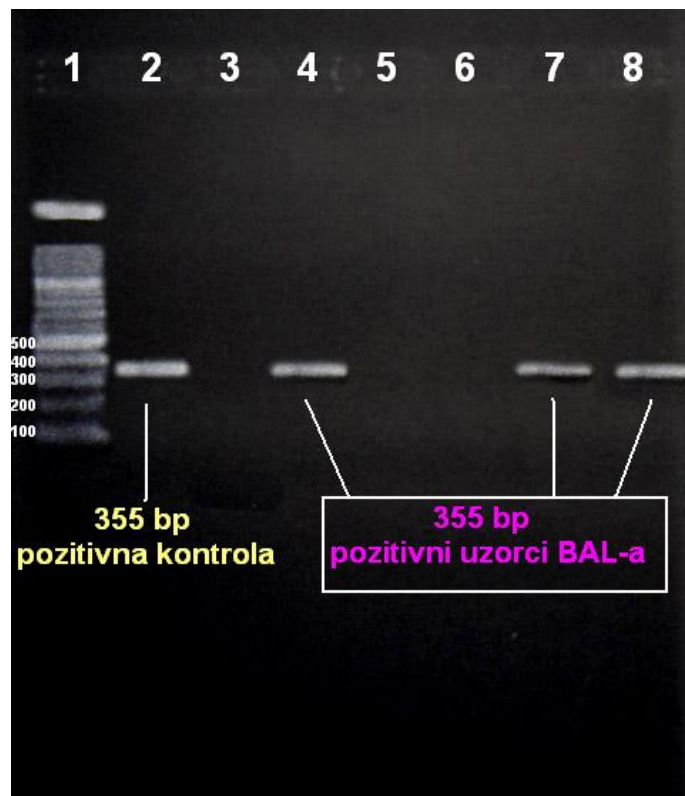
Od ukupno 19 bronhoskopiranih ispitanika, uzorci BAL-a bili su PCR-pozitivni kod njih 3 (15,8 %) (Slika 7).

BAL PCR za *S. pneumoniae* bio je češće pozitivan (N=3, 15,8 %) od kulture BAL-a (N=1, 5,3 %), ali razlika nije bila statistički značajna ( $p=0,302$ ).

Slika 6. Elektroforeza na agarozu gelu 9 PCR-negativnih uzoraka seruma. Stupac 1, DNA molecular weight marker XIV (100-1500 bp); stupac 2, pozitivna kontrola (pneumokokna DNA); stupci 3-11 PCR negativni uzorci seruma; stupac 12, negativna kontrola (sterilna destilirana voda).



Slika 7. Elektroforeza na agarozu gelu amplificiranih PCR-produkata u uzorcima BAL-a. Stupac 1, DNA molecular weight marker XIV (100-1500 bp); stupac 2, pozitivna kontrola (pneumokokna DNA); stupac 3, negativna kontrola (sterilna destilirana voda); stupci 4, 7 i 8 pozitivni uzorci BAL-a; stupci 5 i 6, negativni uzorci BAL-a.

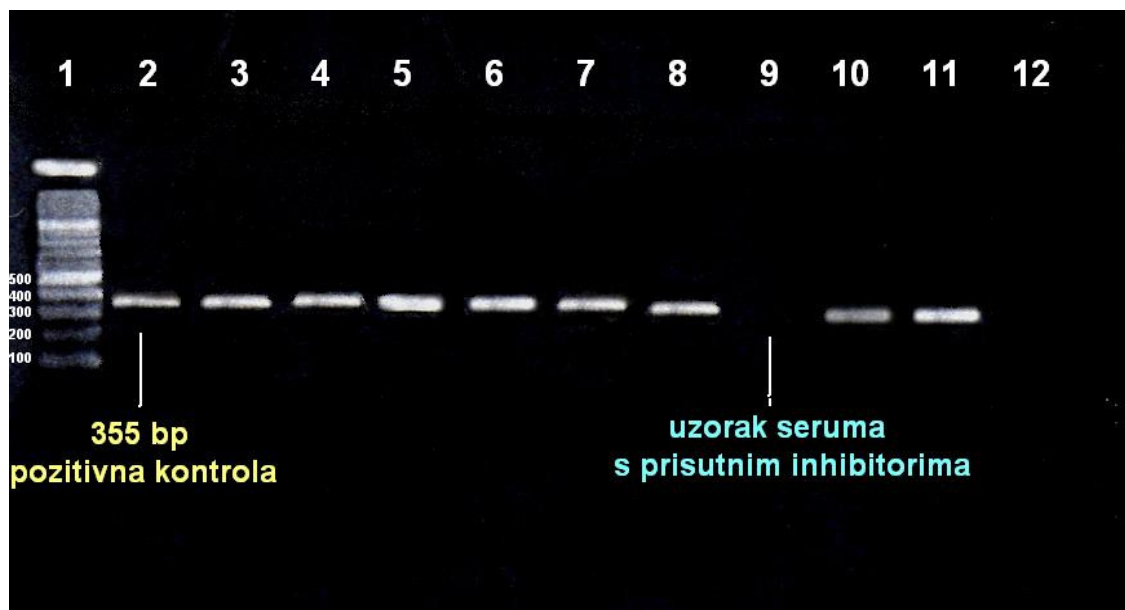




U dva od ukupno tri ispitanika kod kojih je PCR za *S. pneumoniae* u uzorku BAL-a bio pozitivan, to je bila i jedina metoda kojom je *S. pneumoniae* kod ovih ispitanika dokazan. U preostalog jednog ispitanika uz pozitivan PCR bio je pozitivan i pneumokokni antigen u urinu. Uzorak BAL-a koji je bio pozitivan u kulturi bio je PCR negativan.

Prisutnost inhibitora PCR reakcije određivana je u PCR-negativnim uzorcima seruma i BAL-a (*spiking*). Prisutnost inhibitora utvrđena je u jednom uzorku seruma (Slika 8). Inhibitori u uzorcima BAL-a nisu otkriveni.

Slika 8. Elektroforeza u agarozu gelu amplificiranih PCR-produkata nakon što su u PCR-negativne uzorke seruma prije amplifikacije dodana 2  $\mu$ l pneumokokne DNA (*spiking*). Stupac 1, DNA molecular weight marker XIV (100-1500 bp); stupac 2, pozitivna kontrola (pneumokokna DNA); stupci 3-8, 10 i 11, uzorci seruma bez prisutnih inhibitora; stupac 9, uzorak seruma s prisutnim inhibitorima bez PCR-produkta veličine 355 bp; stupac 12, negativna kontrola (sterilna destilirana voda).



Nakon razrjeđivanja uzoraka seruma u razrjeđenju 1:8 *pooliranjem*, kako bi se smanjio utjecaj eventualno prisutnih inhibitora, PCR rezultati u svim uzorcima seruma ostali su negativni (Slika 9).

Slika 9. Elektroforeza u agarozu gelu PCR-negativnih uzoraka seruma nakon razrjeđivanja *pooliranjem*. Svi uzorci ostali su negativni. Stupac 1, DNA molecular weight marker XIV (100-1500 bp); stupac 2, pozitivna kontrola (pneumokokna DNA); stupci 3-11 PCR-negativni uzorci seruma nakon *pooliranja*; stupac 12, negativna kontrola (sterilna destilirana voda).



Rezultati svih mikrobioloških metoda za *S. pneumoniae* prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. Rezultati konvencionalnih i molekularnih metoda za *S. pneumoniae*

Mikrobiološka metoda	Broj pozitivnih/broj testiranih (%)
Adekvatni uzorci sputuma/ ukupan broj uzoraka sputuma	36/64 (56,3)
Preparat po Gramu (adekvatni uzorci sputuma)	9/36 (25,0)
Sputum kultura (adekvatni uzorci sputuma)	8/36 (22,2)
BAL <sup>†</sup> kultura	1/19 (5,3)
Hemokultura	0/11 (0)
Pleuralni izljev kultura	0/8 (0)
Pneumokokni antigen u urinu	16/76 (21,1)
Serum PCR <sup>**</sup>	0/79 (0)
BAL PCR	3/19 (15,8)

BAL: bronhoalveolarni ispirak, PCR: lančana reakcija polimerazom (prema engl. polymerase chain reaction)

#### 4.3.3. *Mycoplasma pneumoniae*

Primjenjenim mikrobiološkim metodama *M. pneumoniae* utvrđena je kod 7 (8,8 %) ispitanika.

Srednja dob ( $\pm$  SD) ispitanika s dokazanom *M. pneumoniae* bila je  $70,5 \pm 13,4$  godina (raspon 46-80 godina). Samo jedan ispitanik liječen je ambulantno, dok su svi ostali bili hospitalizirani (Tablica 9). Kod niti jednog od ovih ispitanika nije napravljena bronhoskopska pretraga.

Tablica 9 . Rezultati konvencionalnih i molekularnih metoda, te neke karakteristike ispitanika s dokazanom infekcijom s *M. pneumoniae* (N=7).

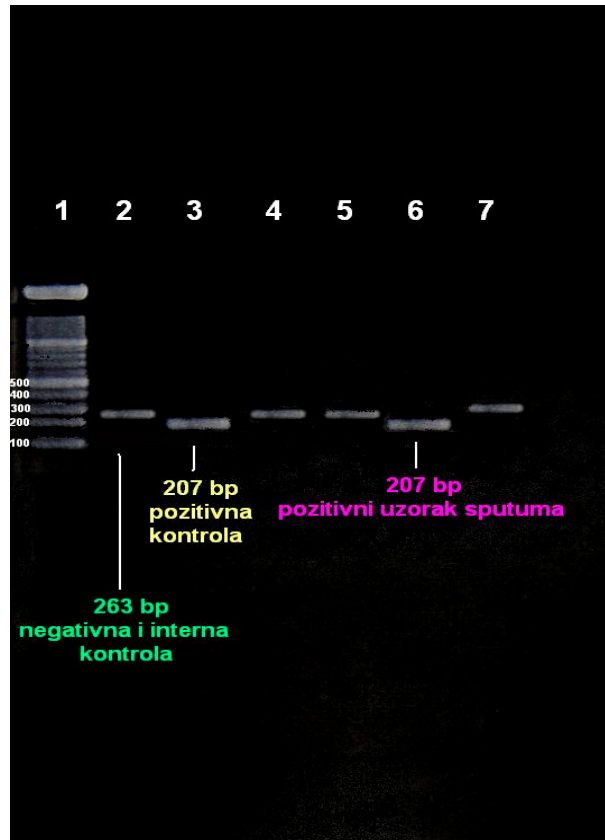
	Dob	IgA	Sputum PCR <sup>†</sup>	BAL <sup>**</sup> PCR	Mjesto liječenja
1	61	+	-	NN <sup>***</sup>	hospitaliziran
2	58	+	-	NN	hospitaliziran
3	55	+	-	NN	hospitaliziran
4	71	+	-	NN	ambulantno
5	46	+	-	NN	hospitaliziran
6	50	+	-	NN	hospitaliziran
7	80	-	+	NN	hospitaliziran

<sup>†</sup>PCR: lančana reakcija polimerazom (prema engl. polymerase chain reaction), <sup>\*\*</sup>BAL: bronhoalveolarni ispirak, <sup>\*\*\*</sup>NN – nije napravljeno jer bolesnik nije bronhoskopiran

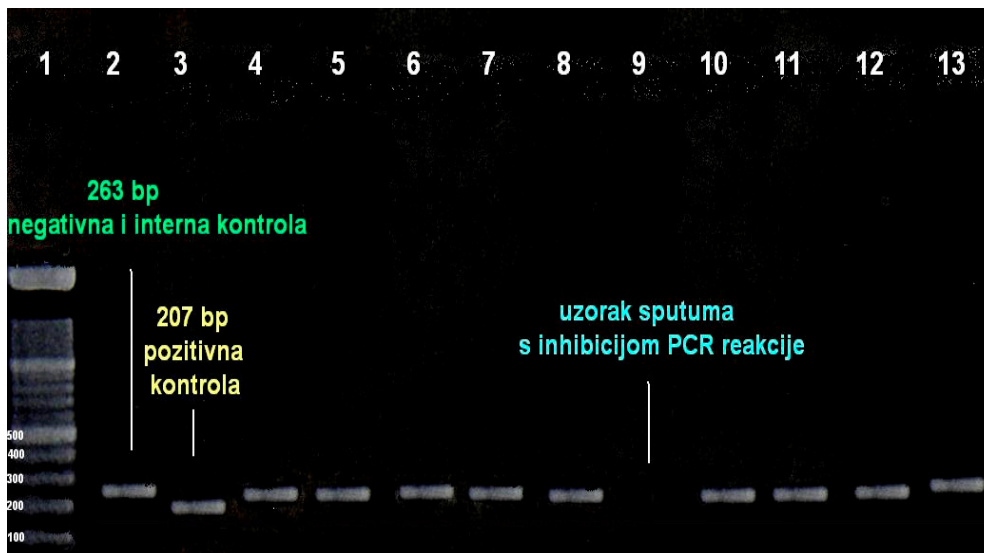
Kod šest ispitanika bile su pozitivne serološke pretrage odnosno IgA protutijela, a kod jednog ispitanika PCR za *M. pneumoniae* u uzorku sputuma (Slika 10). Kod šest ispitanika sa serološki dokazanom *M. pneumoniae* PCR rezultati bili su negativni i obrnuto, kod bolesnika s PCR-pozitivnim rezultatom *M. pneumoniae* serološki nije dokazana. Inhibicija PCR reakcije pomoću interne kontrole utvrđena je samo u jednom uzorku sputuma (Slika 11).

Kod dva ispitanika rezultate seroloških pretraga nije bilo moguće sa sigurnošću protumačiti. Kod njih je rezultat IgA protutijela bio graničan odnosno slabo pozitivan (11.8 U/ml i 11.7 U/ml). Ponavljanjem testa na ova dva uzorka seruma dobiveni su isti rezultati. Novi uzorci seruma 1-2 tjedna kasnije koje bi trebalo ispitati kod ovakvih slučajeva nisu dobiveni.

Slika 10. Elektroforeza u agarozu gelu amplificiranih PCR-produkata za *M. pneumoniae* u uzorcima sputuma (Venor@Mp). Stupac 1, DNA molecular weight marker XIV (100-1500 bp); stupac 2, negativna kontrola i interna kontrola s PCR-produktom veličine 263 bp; stupac 3, pozitivna kontrola s PCR-produktom veličine 207 bp; stupac 4, 5 i 7 negativni uzorci sputuma; stupac 6, pozitivni uzorak sputuma.



Slika 11. Elektroforeza u agarozu gelu amplificiranih PCR-produkata za *M. pneumoniae* u uzorcima sputuma (Venor@Mp). Stupac 1, DNA molecular weight marker XIV (100-1500 bp); stupac 2, negativna kontrola i interna kontrola s PCR-produktom veličine 263 bp; stupac 3, pozitivna kontrola s PCR-produktom veličine 207 bp; stupac 4-8 i 10-13 negativni uzorci sputuma; stupac 9, uzorak sputuma s inhibicijom PCR reakcije.



Rezultati svih mikrobioloških metoda za *M. pneumoniae* prikazani su u Tablici 10.

Tablica 10 . Rezultati konvencionalnih i molekularnih metoda za *M. pneumoniae*

Mikrobiološka metoda	Broj pozitivnih/broj testiranih (%)
IgA (ELISA)*	6/79 (7,6)
Sputum PCR**	1/64 (1,6)
BAL*** PCR	0/19 (0)

\*ELISA: imunoenzimski metoda (prema engl. enzyme-linked immunosorbent assay), \*\*PCR: lančana reakcija polimerazom (prema engl. polymerase chain reaction), \*\*\*BAL: bronhoalveolarni ispirak

#### 4.3.4. *Legionella species*

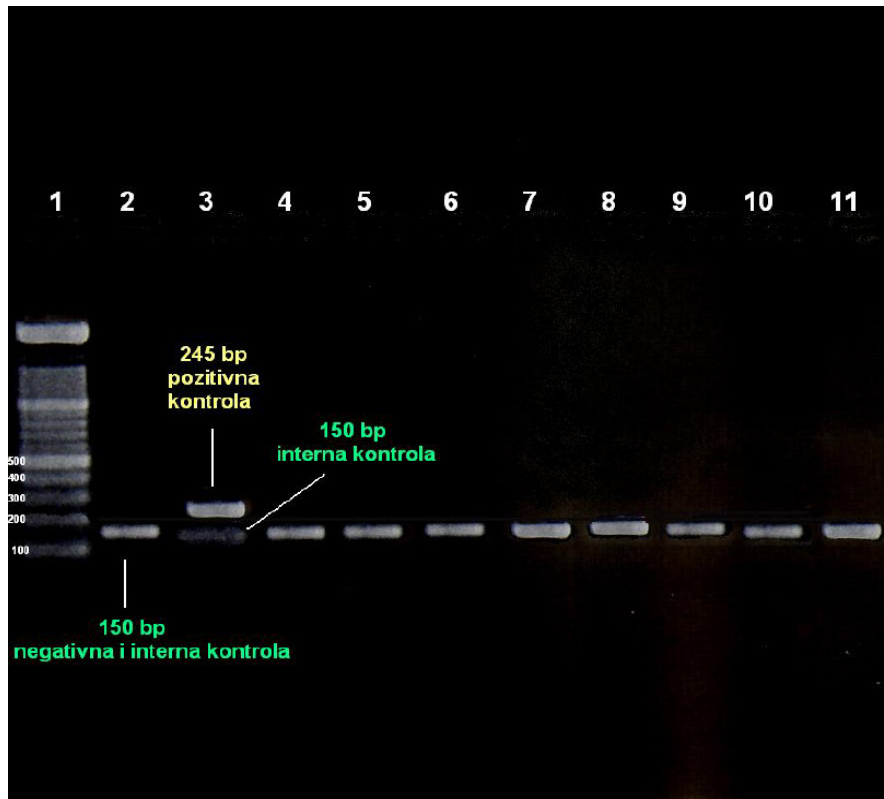
Primjenjenim mikrobiološkim metodama *Legionella species* utvrđena je kod 2 (2,5 %) ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom.

Kod oba ispitanika etiološka dijagnoza postavljena je na temelju pozitivnog antigena za *L. pneumophila* serogrupa 1 u urinu. Kod jednog od njih su IgG i IgM protutijela za *L. pneumophila* serogrupa 1-7 bila negativna, dok kod drugog ispitanika uzorak seruma nije dobiven.

Kod tri ispitanika rezultate seroloških pretraga bilo je teže protumačiti. Kod prva dva ispitanika bila su negativna IgM, a pozitivna IgG protutijela za *L. pneumophila* serogrupa 1-7. Ponavljanjem testa na ova dva uzorka seruma, dobiveni su isti rezultati. Rezultati su potvrđeni i u Mikrobiološkom laboratoriju Klinike za infektivne bolesti "dr. Fran Mihaljević" u Zagrebu. Kod trećeg ispitanika bila su pozitivna IgG protutijela za *L. pneumophila* serogrupa 7-14 (pool II) u testu indirektno imunofluorescence koji je indicirao liječnik kliničar koji je pratio bolesnika. ELISA metodom IgG i IgM protutijela za *L. pneumophila* serogrupa 1-7 kod ovog ispitanika bila su negativna. I ovaj je rezultat potvrđen u navedenom vanjskom laboratoriju. Novi uzorci seruma 1-2 tjedna kasnije koje bi trebalo ispitati u ovakvim slučajevima kod ova tri ispitanika nisu dobiveni.

PCR za *Legionella species* u svim uzorcima sputuma i BAL-a bio je negativan. Kao primjer, negativni rezultati za 8 takvih negativnih uzoraka sputuma prikazani su na Slici 12. Interna kontrola pokazala je da PCR reakcija nije bila inhibirana niti u jednom uzorku.

Slika 12. Elektroforeza u agarozu gelu amplificiranih PCR-produkata za *Legionella* species u uzorcima sputuma (Onar@Ls). Stupac 1, DNA molecular weight marker XIV (100-1500 bp); stupac 2, negativna kontrola i interna kontrola s PCR-produktom veličine 150 bp; stupac 3, pozitivna kontrola s PCR-produktom veličine 245 bp; stupac 4-11 negativni uzorci sputuma.



Rezultati svih mikrobioloških pretraga za *Legionella* species prikazani su u Tablici 11 .

Tablica 11 . Rezultati konvencionalnih i molekularnih metoda za *Legionella* species.

Mikrobiološka metoda	Broj pozitivnih/broj testiranih (%)
IgM (ELISA)*	0/79
IgG (ELISA)	2/79 (2,5)
Legionela antigen u urinu	2/76 (2,6)
PCR** u sputumu	0/64 (0)
PCR u BAL-u***	0/19 (0)

\*ELISA: imunoenzimaska metoda (prema engl. enzyme-linked immunosorbent assay), \*\*PCR: lančana reakcija polimerazom (prema engl. polymerase chain reaction), \*\*\*BAL: bronhoalveolarni ispirak



#### 4.3.5. *Chlamydomphila pneumoniae*

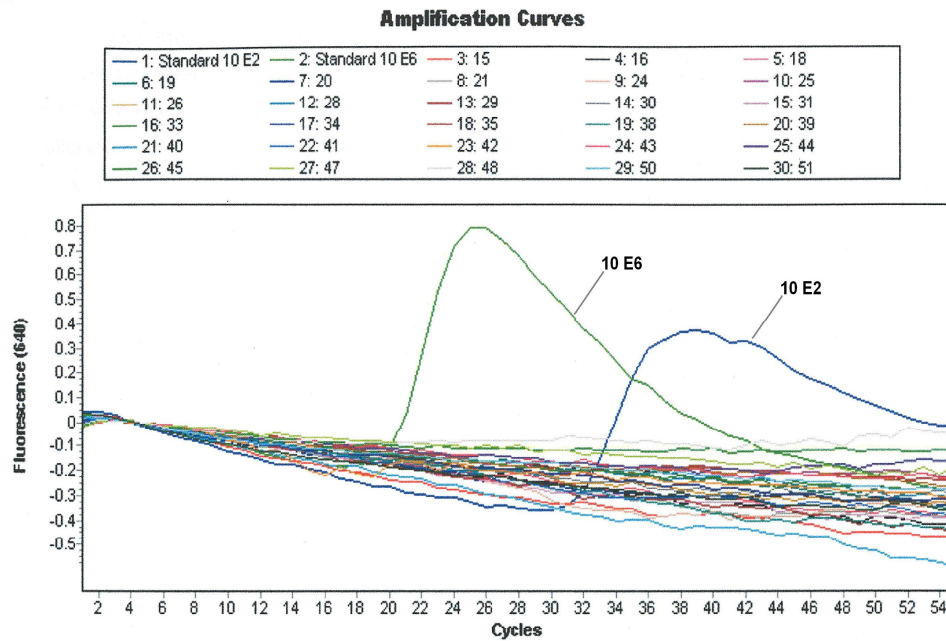
Primjenjenim mikrobiološkim metodama *C. pneumoniae* utvrđena je kod 4 (5,0 %) ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom.

Kod sva četiri ispitanika *C. pneumoniae* otkrivena je serološkim pretragama odnosno na temelju pozitivnih IgM protutijela. Kod ova četiri ispitanika bila su pozitivna i IgG protutijela. *Real-time* PCR za *C. pneumoniae* u uzorcima sputuma i BAL-a kod ova četiri, kao i svih ostalih ispitanika u ovom istraživanju, bio je negativan.

Od ukupno 79 ispitanih uzoraka seruma, u njih 49 (62,0 %) bila su prisutna samo IgG protutijela. Ona su bila statistički značajno češće prisutna kod bolesnika s KOPB-om nego li kod bolesnika bez KOPB-a (94,7 % vs 67,4 %;  $p= 0,017$ ). Kod još 10 ispitanika rezultat IgG protutijela bio je graničan ili slabo pozitivan. Rezultat IgM protutijela bio je graničan ili slabo pozitivan kod 4 ispitanika. Novi uzorci seruma 2-4 tjedna kasnije koje bi trebalo ispitati kod ovakvih slučajeva nisu dobiveni.

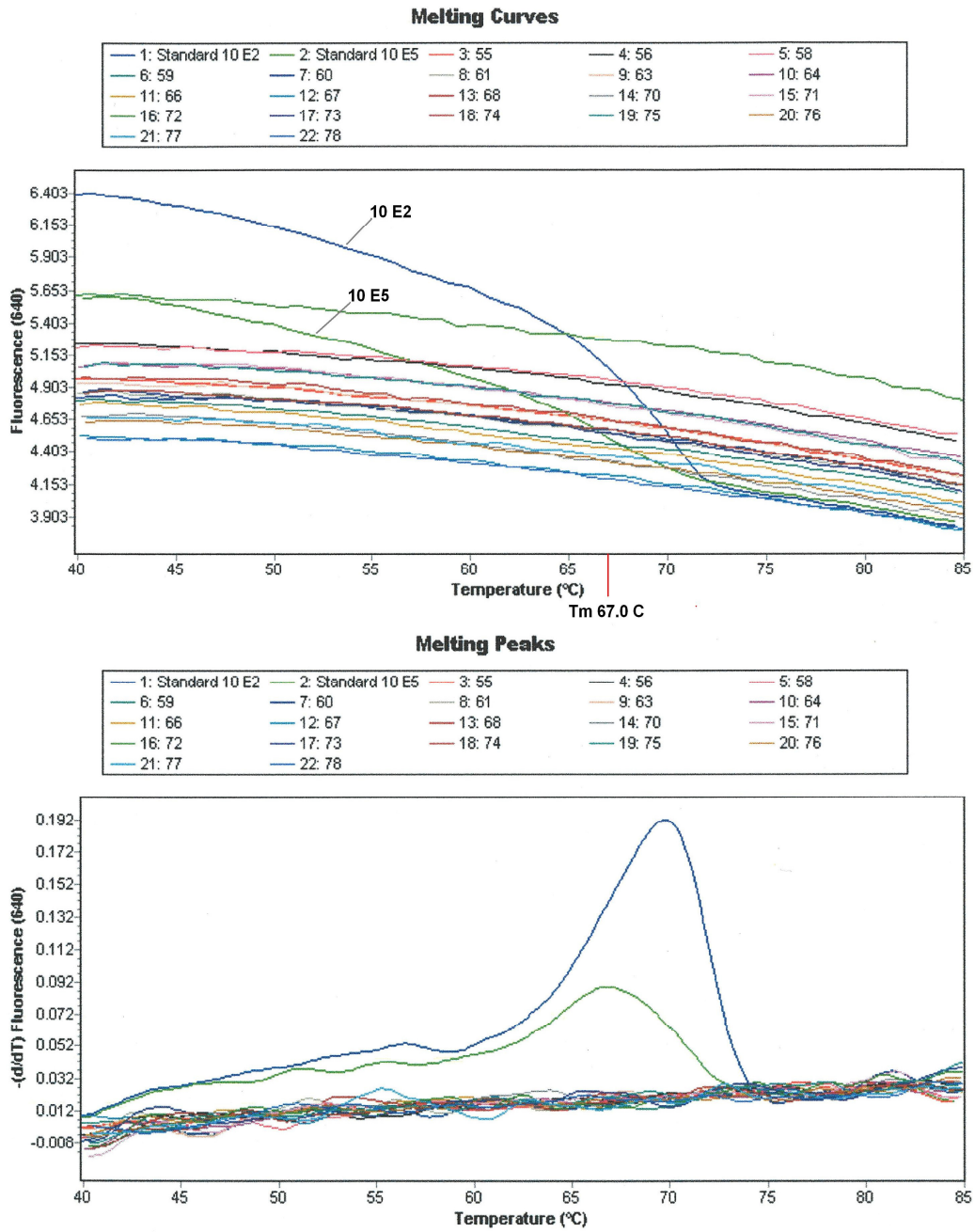
*Real-time* PCR za *C. pneumoniae* u svim uzorcima sputuma i BAL-a u ovom istraživanju bio je negativan. Dobivene amplifikacijske krivulje pokazale su uspješnu amplifikaciju pozitivnih kontrola odnosno standarda koncentracije  $10^1$ - $10^6$  ciljanih molekula/reakciji. Na Slici 13 su prikazane amplifikacijske krivulje za standarde koncentracije  $10^2$  i  $10^6$  ciljanih molekula/reakciji.

Slika 13. *Real-time* PCR za *C. pneumoniae*. Zelena i plava amplifikacijska krivulja pokazuju uspješnu amplifikaciju pozitivnih kontrola odnosno standarda koncentracije  $10^2$  i  $10^6$  ciljanih molekula/reakciji. Ostale amplifikacijske krivulje odgovaraju negativnim uzorcima sputuma i BAL-a.



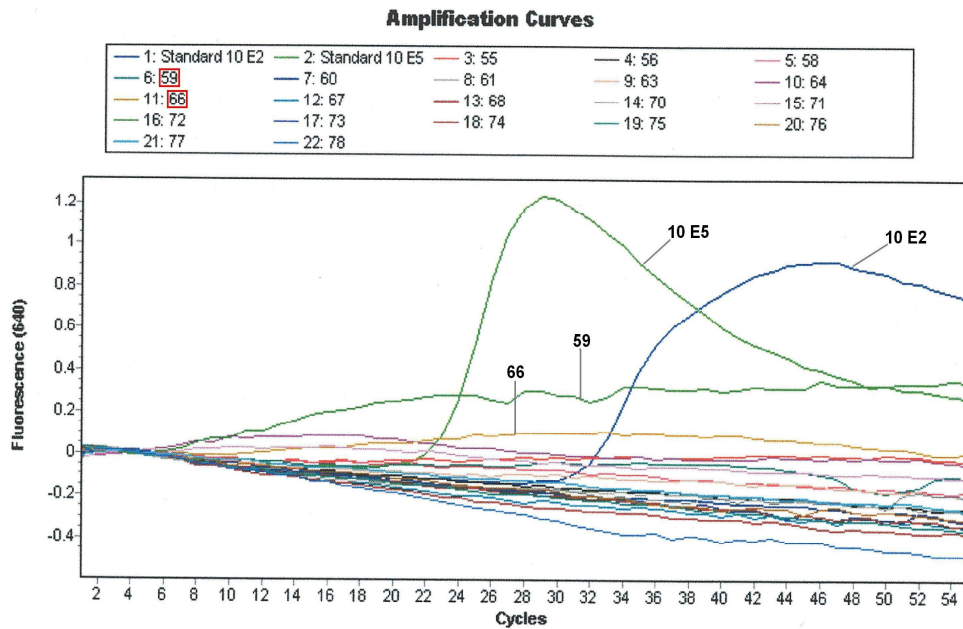
Identifikacija PCR-produkata pomoću *melting* krivulja u uzorcima i standardima s  $T_m$  od  $67.0^{\circ}\text{C}$  na kanalu 640, te *melting peak*-ovi prikazani su na Slici 14. Interna kontrola detektirana je na kanalu 705 s  $T_m$  od  $67-69^{\circ}\text{C}$  i bila je uredna u svima ispitivanim uzorcima.

Slika 14. Real-time PCR za *C. pneumoniae*. Zelena i plava melting krivulja i melting peak-ovi pokazuju identifikaciju PCR-produkata za *C. pneumoniae* u pozitivnim kontrolama odnosno standardima koncentracije  $10^2$  i  $10^5$  ciljanih molekula/reakciji s  $T_m$  od  $67.0^\circ\text{C}$ . Ostale amplifikacijske krivulje odgovaraju negativnim uzorcima sputuma i BAL-a.

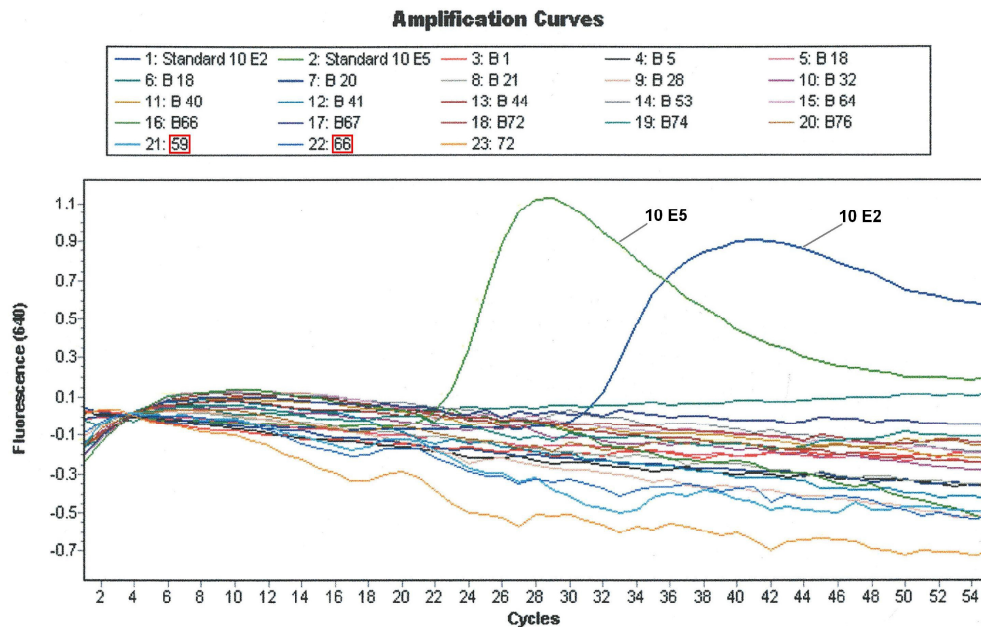


U tri uzorka sputuma rezultati su bili nesigurni, ali su ponavljanjem reakcije i u ovim uzorcima dobiveni negativni rezultati (Slike 15 i 16).

Slika 15. *Real-time* PCR za *C. pneumoniae*. Amplifikacijske krivulje za standarde koncentracije  $10^2$  i  $10^5$  ciljanih molekula/reakciji, te dva uzorka sputuma (59 i 66) s nesigurnim rezultatom.



Slika 16. *Real-time* PCR za *C. pneumoniae*. Amplifikacijske krivulje za standarde koncentracije  $10^2$  i  $10^5$  ciljanih molekula/reakciji, te dva uzorka sputuma (59 i 66) s nesigurnim rezultatom nakon ponovljenog testa koji je sada negativan.



Rezultati svih mikrobioloških metoda za *C. pneumoniae* prikazani su u Tablici 12.

Tablica 12 . Rezultati konvencionalnih i molekularnih metoda za *C. pneumoniae*

Mikrobiološka metoda	Broj pozitivnih/broj testiranih (%)
IgM (ELISA)*	4/79 (5,1)
IgG (ELISA)	53/79 (67,1)
Sputum PCR**	0/64 (0)
BAL*** PCR	0/19 (0)

\*ELISA: imunoenzimski metoda (prema engl. enzyme-linked immunosorbent assay), \*\*PCR: lančana reakcija polimerazom (prema engl. polymerase chain reaction), \*\*\*BAL: bronhoalveolarni ispirak

#### 4.3.6. Ostali bakterijski uzročnici

Ostali bakterijski uzročnici utvrđeni su kod 11 (13,8 %) ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom.

*H. influenzae* utvrđen je kod 5 (6,3 %) ispitanika, te je po učestalosti bio na trećem mjestu. Kod tri ispitanika izoliran je u uzorku sputuma, a u jednoga u uzorku BAL-a. Kod jednog ispitanika bio je izoliran i u sputumu i u BAL-u.

*P. aeruginosa* utvrđen je kod 4 (5,0 %) ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom. Kod tri ispitanika izoliran je u uzorku sputuma, a kod jednoga u uzorku BAL-a. Kod jednog ispitanika bio je izoliran i u sputumu i u BAL-u.

*K. pneumoniae* utvrđena je kod 2 (2,3 %) ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom. Kod oba ispitanika bila je izolirana i u sputumu i u BAL-u.

#### 4.4. USPOREDBA REZULTATA MIKROBIOLOŠKIH METODA KOD BOLESNIKA S RAZLIČITOM TEŽINOM PNEUMONIJE

Etiologija izvanbolničke pneumonije utvrđena je kod 42 ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom. Broj razjašnjenih izvanbolničkih pneumonija nije se statistički značajno razlikovao između ispitanika u PSI skupinama I-III (26/48) i IV-V (16/32) (54,2 % vs 50,0 %;  $p=0,718$ ).

Učestalost pojedinih bakterijskih uzročnika između ispitanika u PSI skupinama I-III i IV-V također se nije statistički značajno razlikovala (Tablica 13), kao niti učestalost miješanih infekcija (10,4 % vs 6,3 %;  $p=0,414$ ).

Tablica 13. Učestalost pojedinih bakterijskih uzročnika u PSI skupinama I-V ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom.

Bakterijski uzročnik	N (%)					I-III vs. IV-V
	I (N=23)	II (N=9)	III (N=16)	IV (N=23)	V (N=9)	
<i>S. pneumoniae</i>	10 (43,5)	3 (33,3)	2 (12,5)	8 (34,8)	2 (22,2)	1,000
<i>M. pneumoniae</i>	1 (4,3)	1 (11,1)	3 (18,8)	2 (8,7)	0	0,414
<i>H. influenzae</i>	3 (13,0)	0	1 (6,3)	1 (4,3)	0	0,330
<i>C. pneumoniae</i>	1 (4,3)	0	2 (12,5)	0	1 (11,1)	0,473
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	3 (18,8)	1 (4,3)	0	0,473
<i>Legionella species</i>	0	0	0	0	2 (22,2)	0,157
<i>K. pneumoniae</i>	0	2 (22,2)	0	0	0	0,357
UKUPNO	15 (65,2)	6 (18,0)	11 (68,8)	12 (52,2)	5 (55,6)	0,157

PSI: indeks težine pneumonije (prema engl. Pneumonia severity index)

Rezultati konvencionalnih i molekularnih mikrobioloških metoda između bolesnika u PSI skupinama I-III i IV-V nisu se statistički značajno razlikovali (Tablica 14).

Tablica 14. Rezultati konvencionalnih i molekularnih mikrobioloških metoda u PSI\* skupinama I-V ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom.

Bakterijski uzročnik	Broj pozitivnih/broj testiranih (%)					p
	I (N=23)	II (N=9)	III (N=16)	IV (N=23)	V (N=9)	
<b><i>S. pneumoniae</i></b>						
Sputum kultura	3/19 (15,8)	2/5 (40,0)	0/14 (0)	3/20 (15,0)	0/6 (0)	0,583
BAL kultura	1/7 (0)	0/6 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	0/0 (0)	0,842
Hemokultura	0/4 (0)	0/2 (0)	0/1 (0)	0/2 (0)	0/2 (0)	-
Pneumokokni antigen u urinu	4/22 (18,2)	2/9 (22,2)	2/15 (13,3)	6/22 (27,3)	2/8 (25,0)	0,332
Serum PCR	0/23 (0)	0/8 (0)	0/15 (0)	0/23 (0)	0/8 (0)	-
BAL PCR	2/7 (28,6)	0/6 (0)	0/3 (0)	1/3 (33,3)	0/0 (0)	0,422
<b><i>M. pneumoniae</i></b>						
IgA (ELISA)	1/23 (4,3)	1/9 (11,1)	2/16 (12,5)	2/23 (8,7)	0/8 (0)	0,561
Sputum PCR	0/19 (0)	0/5 (0)	1/14 (7,1)	0/20 (0)	0/6 (0)	0,594
BAL PCR	0/7	0/6	0/3	0/3 (0)	0/0 (0)	-
<b><i>Legionella species</i></b>						
IgM (ELISA)	0/23 (0)	0/9 (0)	0/16 (0)	0/23 (0)	0/8 (0)	-
IgG (ELISA)	1/23 (4,3)	0/9 (0)	0/16 (0)	0/23 (0)	1/8 (12,5)	0,634
Legionela antigen u urinu	0/22 (0)	0/9 (0)	0/15 (0)	0/22 (27,3)	2/8 (25,0)	0,153
Sputum PCR	0/19 (0)	0/5 (0)	0/14 (0)	0/20 (0)	0/6 (0)	-
BAL PCR	0/7	0/6	0/3	0/3 (0)	0/0 (0)	-
<b><i>C. pneumoniae</i></b>						
IgM (ELISA)	1 /23 (4,3)	0/9 (0)	2/16 (12,5)	0/23 (0)	1/8 (12,5)	0,486
IgG (ELISA)	11/23 (47,8)	6/9 (66,7)	15 /16 (93,8)	16/23 (69,6)	5/8 (62,5)	0,920
Sputum PCR	0/19 (0)	0/5 (0)	0/14 (0)	0/20 (0)	0/6 (0)	-
BAL PCR	0/7	0/6	0/3	0/3 (0)	0/0 (0)	-

PSI: indeks težine pneumonije (prema engl. Pneumonia severity index)

Budući su pomoću kulture sputuma osim *S. pneumoniae* utvrđeni i ostali bakterijski uzročnici, te tako utvrđena etiologija kod ukupno 17 ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom, rezultati preparata po Gramu i kulture sputuma analizirani su i za sve bakterijske uzročnike zajedno sa *S. pneumoniae*.

Broj dobivenih uzoraka sputuma, adekvatnost uzoraka, pozitivitet preparata po Gramu, te pozitivitet kultura sputuma nisu se statistički značajno razlikovali između ispitanika u PSI skupinama I-III i IV-V (Tablica 15).

Tablica 15. Rezultati preparata po Gramu i kultura sputuma u PSI<sup>†</sup> skupinama I-V ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom (N=80).

N (%)						<i>p</i>
	I (N=23)	II (N=9)	III (N=16)	IV (N=23)	V (N=9)	I-III vs. IV-V
Dobiveni uzorci sputuma 64 (80,0)	19/23	5/9	14/16	20/23	6/9	0,823
Adekvatni uzorci sputuma 36 (56,3)	10/19	4/5	10/14	9/20	3/6	0,179
Preparat po Gramu 10 (27,8)	4/10	0/4	2/10	3/9	1/3	0,440
Kultura sputuma 17 (47,2)	5/10	3/4	4/10	5/9	0/3	0,639

PSI: indeks težine pneumonije (prema engl. Pneumonia severity index)



#### 4.5. EVALUACIJA EMPIRIJSKI PRIMJENJENOG ANTIMIKROBNOG LIJEČENJA U ODNOSU NA REZULTATE KONVENCIONALNIH I MOLEKULARNIH MIKROBIOLOŠKIH METODA

Antimikrobni lijekovi primjenjeni u empirijskom liječenju ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom u ovom istraživanju prikazani su u Tablici 16.

Tablica 16. Antimikrobni lijekovi primjenjeni u empirijskom liječenju ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom (N=80)

Antimikrobni lijek	N (%)
Ko-amoksiklav	32 (40,0)
Ceftriakson	21 (26,3)
Makrolidi	16 (20,0)
Kinoloni	12 (15,0)
Aminoglikozidi	8 (10,0)
Klindamicin	2 (2,5)
Amoksisilin	1 (1,3)
Doksiciklin	1 (1,3)
2 ili više antimikrobnih lijekova istodobno	21 (26,3)

Antimikrobni lijek najčešće primjenjen u empirijskom liječenju bio je ko-amoksiklav, a potom ceftriakson, makrolidi i kinoloni. Kombinirano antimikrobno liječenje primjenjeno je kod 11 (13,8 %) ispitanika.

Empirijski primijenjeno antimikrobno liječenje evaluirano je kod 38 ispitanika s utvrđenom etiologijom izvanbolničke pneumonije (Tablica 17).

Tablica 17. Evaluacija empirijski primijenjenog antimikrobnog liječenja kod ispitanika s dokazanom etiologijom izvanbolničke pneumonije (N=38)

Empirijsko antimikrobno liječenje	N (%)
Adekvatno	28 (73,7)
Neadekvatno	10 (26,3)

Empirijsko antimikrobno liječenje bilo je adekvatno kod 28 (73,7 %) ispitanika s dokazanom etiologijom izvanbolničke pneumonije. Bakterijski uzročnici, te primjenjeni antimikrobni lijekovi kod deset bolesnika s neadekvatnim empirijskim liječenjem prikazani su u Tablici 18.

Tablica 18. Bakterijski uzročnici i primjenjeni antimikrobni lijekovi kod ispitanika s neadekvatnim empirijskim antimikrobnim liječenjem (N=10).

	Bakterijski uzročnik	Empirijski primjenjeni antimikrobni lijekovi
1	<i>C. pneumoniae</i>	ceftriakson + klindamicin
2	<i>C. pneumoniae</i>	ko-amoksiklav
3	<i>C. pneumoniae</i>	ko-amoksikalv
4	<i>C. pneumoniae</i>	ceftriakson
5	<i>M. pneumoniae</i>	ko-amoksiklav
6	<i>P. aeruginosa</i> + <i>M. pneumoniae</i>	ceftriakson
7	<i>P. aeruginosa</i> + <i>M. pneumoniae</i>	ceftriakson
8	<i>P. aeruginosa</i>	ko-amoksiklav
9	<i>P. aeruginosa</i>	ceftriakson
10	<i>Legionella</i> spp.	ceftriakson

## 5. RASPRAVA

Demografske i kliničke karakteristike ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom u ovom istraživanju bile su slične onima u ostalim provedenim istraživanjima.

Etiologija izvanbolničkih pneumonija u ovom istraživanju utvrđena je kod 52,5 % ispitanika. Ovakav postotak može se naći i u ostalim istraživanjima o izvanbolničkim pneumonijama. Iako je etiologija izvanbolničke pneumonije češće utvrđena kod bolesnika koji prije pregleda i/ili hospitalizacije u Klinici nisu liječeni antimikrobnim lijekovima, ova razlika nije bila statistički značajna.

Prema očekivanjima, najčešći bakterijski uzročnik bio je *S. pneumoniae* koji je utvrđen kod 31,3 % ispitanika, dok su atipični bakterijski uzročnici utvrđeni kod ukupno 16,3 % ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom<sup>2-6</sup>. Na trećem mjestu po učestalosti nalazio se *H. influenzae*.

U ovom istraživanju su kod 8,8 % ispitanika s utvrđenom etiologijom izvanbolničke pneumonije istovremeno bila prisutna dva bakterijska uzročnika. Značenje miješane etiologije kod izvanbolničkih pneumonija još uvijek je nepoznato jer je teško procijeniti kakvu ulogu pojedini od otkrivenih uzročnika ima u patogenezi bolesti. U literaturi o tome postoje potpuno suprotni stavovi. Neki autori smatraju da su izvanbolničke pneumonije miješane etiologije zaista moguće. Pri tome u nekim slučajevima oba uzročnika mogu doprinijeti nastanku bolesti, dok u drugima infekcija s jednim patogenom može pogodovati da drugi postane uzročnikom izvanbolničke pneumonije kao što infekcija s virusom influence može pogodovati nastanku sekundarne pneumonije uzrokovane sa *S. aureus* ili *S. pneumoniae*. Sličan mehanizam mogao bi vrijediti i za ostale kombinacije uzročnika izvanbolničkih pneumonija<sup>126</sup>. U istraživanjima se dva patogena istovremeno nađu kod 5-38 % izvanbolničkih pneumonija ovisno o dijagnostičkim postupcima koji se koriste<sup>9,15-20,127</sup>. U prilog tome da bi ove miješane infekcije zaista mogle biti važne, govore istraživanja koja pokazuju da je kombinirano empirijsko antimikrobno liječenje koje uključuje i makrolide povezano s nižim mortalitetom

kod bolesnika s pneumokoknom pneumonijom i bakterijemijom<sup>128,129</sup>. Potpuno suprotno, neki autori smatraju da izvanbolničku pneumoniju, osim u slučaju aspiracijske pneumonije i anaerobnih plućnih apscesa, uvijek uzrokuje samo jedan uzročnik, te da miješane infekcije zapravo ne postoje<sup>130</sup>. Tome u prilog govori i istraživanje u kojem je kod bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom u uzorcima samog plućnog tkiva uvijek nađen samo jedan uzročnik, a ne više njih<sup>22</sup>.

U ovom istraživanju je u miješanim infekcijama kao najčešći uzročnik bio prisutan *S. pneumoniae*. Bio je prisutan kod 71,4 % (N=5) ovih slučajeva i to najčešće u kombinaciji s *H. influenzae*. S obzirom da je pneumokok utvrđen kod ukupno 25 ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom, to drugim riječima znači da je kod svakog petog ispitanika bio prisutan istodobno s nekim drugim bakterijskim uzročnikom. Prevladavanje pneumokoka u izvanbolničkim pneumonijama miješane etiologije zabilježeno je i u drugim istraživanjima<sup>15,17,21,126,131</sup>. U jednom od njih je kao i u ovom najčešća kombinacija bila *S. pneumoniae* i *H. influenzae*<sup>21</sup>.

U nekim istraživanjima miješane infekcije osobito često su zabilježene kod bolesnika sa serološki dokazanom *C. pneumoniae* infekcijom<sup>18,132,133</sup>. Moguća uloga *C. pneumoniae* u miješanim infekcijama pokušava se objasniti pomoću ciliostatskog učinka. Naime, dokazano je da *C. pneumoniae* uzrokuje ciliostazu bronhalnih epitelnih stanica, a na taj način stvara uvjete u kojima neki drugi uzročnik može uzrokovati infekciju<sup>134</sup>. U ovom istraživanju *C. pneumoniae* nije utvrđena niti kod jednog ispitanika s miješanom etiologijom izvanbolničke pneumonije, već je uvijek bila prisutna samostalno. Istraživanja s ovakvim rezultatima već su objavljena<sup>126</sup>.

Od ostalih kombinacija iznenađuje ona *P. aeruginosa* i *M. pneumoniae* koja u dosadašnjim istraživanjima nije navedena, a u ovom istraživanju utvrđena je kod 2 ispitanika. Kod prvog ispitanika s otprije prisutnim KOPB-om kao predisponirajućim čimbenikom, *P. aeruginosa* izoliran je u uzorku sputuma uz istovremeno pozitivan *M. pneumoniae* IgA. Ulogu *P. aeruginosa* u ovog ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom teško je procijeniti jer je kod 25 % bolesnika s KOPB-om kolonizacija bakterijama prisutna

čak i u stabilnoj fazi bolesti. S druge strane, novija istraživanja su pokazala da *Legionella* spp., *C. pneumoniae* i *M. pneumoniae* nemaju ulogu niti u stabilnoj fazi bolesti niti u egzacerbacijama KOPB-a<sup>135</sup>. Stoga pojedinačnu ulogu ovih dvaju uzročnika kod ovog bolesnika ne možemo sa sigurnošću odrediti: jesu li oba uzročnika zajedno sudjelovala u nastanku pneumonije ili je *M. pneumoniae* bila uzročnik, a *P. aeruginosa* samo inače prisutna kolonizacija kod ovog bolesnika s KOPB-om? Kod drugog ispitanika bez KOPB-a, ali s antimikrobnim lijekovima primjenjenim prije hospitalizacije,  $10^5$  CFU/mL *P. aeruginosa* izolirano je u BAL-u uz istovremeno pozitivan *M. pneumoniae* IgA. S obzirom na kvantitativni nalaz u BAL-u uloga *P. aeruginosa* u etiologiji izvanbolničke pneumonije kod ovog ispitanika ne bi trebala biti upitna. Potrebna su daljnja istraživanja da bi se točnije utvrdila međusobna povezanost ovih dvaju uzročnika kod bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom.

Mogućnost da neke od miješanih infekcija u ovom ispitivanju zapravo predstavljaju lažno-pozitivne rezultate dijagnostičkih testova ne može se potpuno isključiti. Naime, već je spomenuto da niti za jednog od navedenih bakterijskih uzročnika izvanbolničkih pneumonija trenutno ne postoji dijagnostički zlatni standard visoke osjetljivosti i specifičnosti, kao i činjenica da su navedeni stavovi u literaturi koji se odnose na miješane infekcije suprotni.

U nekim istraživanjima kod bolesnika s miješanim pneumonijama češće su nego li u monomikrobnim utvrđeni pleuralni izljevi, hipoksemija, te visoki PSI indeks, iako ove razlike nisu bile statistički značajne<sup>126</sup>. U ovom istraživanju učestalost miješanih infekcija između bolesnika u PSI skupinama I-III i IV-V nije se statistički značajno razlikovala (10,4 % vs 6,3;  $p=0,414$ ).  $PaO_2$  i  $SaO_2$  bili su sniženi kod dva, a pleuralni izljev postojao je kod jednog od ovih bolesnika

U nekim istraživanjima utvrđena je veća učestalost *S. pneumoniae* kod bolesnika starijih od 60 godina, a atipičnih uzročnika, osobito *M. pneumoniae*, kod onih mlađih od 60 godina<sup>16,19,136</sup>. U ovom istraživanju najčešći bakterijski uzročnik u svim dobnim skupinama bio je *S. pneumoniae*, a učestalost pojedinih bakterijskih uzročnika nije se

statistički značajno razlikovala između ispitanika mlađih i starijih od 60 godina. Sličnost između različitih dobnih skupina s obzirom na moguće bakterijske uzročnike pokazuje da empirijski primjenjeno antimikrobno liječenje uvijek, bez obzira na dob bolesnika, mora prvenstveno biti usmjereno na pneumokok.

Značenje preparata po Gramu i kulture sputuma u dijagnostici izvanbolničkih pneumonija i utjecaj na antimikrobno liječenje bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom još uvijek je kontroverzno. Neki autori smatraju da ove metode imaju velike nedostatke u smislu niske osjetljivosti, problematične pouzdanosti zbog moguće kontaminacije uzorka florom gornjih dišnih putova i kao posljedica toga neznatno utječu na odluku o liječenju bolesnika<sup>24,25,137</sup>. Drugi pak autori smatraju uzorak sputuma korisnim u početnoj evaluaciji bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom<sup>27,29</sup>.

Ovo istraživanje omogućilo je evaluaciju preparata po Gramu i kulture sputuma u svakodnevnoj praksi. Njegovi rezultati dovode do zaključka da se uzorci sputuma mogu dobiti kod velikog postotka bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom (80,0 %), ali su često nepravilno uzeti i kontaminirani florom gornjeg respiratornog sustava (43,7 % uzoraka sputuma u ovom istraživanju bilo je neadekvatno).

Odluke o empirijskom antimikrobnom liječenju kliničari ponekad temelje na nalazu preparata po Gramu kao brzom mikrobiološkoj metodi. Rezultati ovog istraživanja pokazali su ograničeno značenje preparata po Gramu iz uzoraka sputuma kao temelja za izbor antimikrobnog liječenja kod bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom. Naime, na temelju pozitivnog preparata po Gramu izbor antimikrobnog lijeka bio je moguć samo u 10 (12,5 %) od ukupno 80 bolesnika.

Utjecaj prethodno primjenjenog antimikrobnog liječenja na rezultate preparata po Gramu i kulture sputuma već je dokazan<sup>24,29,138</sup>. Rezultati ovog istraživanja također su pokazali da je kultura sputuma rjeđe pozitivna kod bolesnika koji su prethodno primali antimikrobne lijekove (22,2 % vs 72,2 %;  $p=0,003$ ). Utjecaj prethodno primjenjenog antimikrobnog liječenja na rezultate preparata po Gramu u ovom istraživanju nije dokazan (27,8 % vs. 27,8 %;  $p=0,644$ ).

Iako rezultati ovog istraživanja pokazuju ograničenu dijagnostičku vrijednost preparata po Gramu i kulture sputuma, te se čini da su u skladu s novijim trendovima koji umanjuju ulogu ovih dijagnostičkih testiranja, što se odražava i u novijim preporukama stručnih društava, neophodno je naglasiti da je značenje uspješno izoliranog uzročnika s testom osjetljivosti na antimikrobne lijekove neprocjenjivo. Ono omogućuje da se primjenjuju antimikrobni lijekovi usmjereni na otkrivenog bakterijskog uzročnika kod pojedinog bolesnika, da se deeskalacijom izbjegne bespotrebna upotreba antimikrobnih lijekova širokog spektra djelovanja, a time se smanjuju i troškovi liječenja, moguće nuspojave kao i razvoj rezistencije uslijed selektivnog antibiotskog pritiska.

Već je u uvodu navedeno da je, za razliku od imunokompromitiranih bolesnika i bolesnika s VAP-om, dijagnostičko značenje BAL-a kod imunokompetentnih bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom zbog malog broja istraživanja još uvijek nejasno<sup>34,35, 139-143</sup>. Čak i malobrojna provedena istraživanja napravljena su u uvjetima koji ne odražavaju rutinsku kliničku praksu. Naime, uzorci BAL-a u tim istraživanjima uzimani su odmah po primitku u bolnicu (unutar 24-48 sati), te kod bolesnika kod kojih još nisu primjenjeni antimikrobni lijekovi. Stoga niti rezultati ovih istraživanja ne iznenađuju. Kod Jimenez i suradnika kvantitativne kulture BAL-a uzetog prije primjene antimikrobnog liječenja bile su pozitivne kod 77 % (31/40) bolesnika s umjereno teškom izvanbolničkom pneumonijom<sup>141</sup>. Još bolji rezultati bili su kod Dalhoff i suradnika koji su utvrdili pozitivne kulture BAL-a prije primjene antimikrobnog liječenja kod 94 % (15/16) bolesnika s teškom pneumonijom<sup>142</sup>. U svakodnevnoj kliničkoj praksi ovakvi su slučajevi iznimni jer se kod većine bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom bronhoskopska pretraga indicira tek u slučaju terapijskih i dijagnostičkih poteškoća, a većina ovih bolesnika uspješno se liječi bez potrebe za ovom invazivnom dijagnostičkom pretragom. Do sada je provedeno samo jedno istraživanje u kojem je dijagnostičko značenje BAL-a kod izvanbolničkih pneumonija evaluirano u rutinskoj kliničkoj praksi. U tom istraživanju je kultura BAL-a bila pozitivna kod svega 8 od 71 (11,2 %) bolesnika, pri čemu su svi bolesnici prije bronhoskopske pretrage primili antimikrobno liječenje, a prosječno trajanje hospitalizacije prije napravljene bronhoskopske

pretrage bilo je 9,9 dana<sup>34</sup>. Utjecaj antimikrobnog liječenja na rezultate kulture BAL-a dokazan je u više istraživanja<sup>139,142,143</sup>. I u ovom istraživanju je kod svih bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom prije uzimanja uzorka BAL-a primjenjeno antimikrobno liječenje, a kultura BAL-a bila je pozitivna kod 6 (31,6 %) od ukupno 19 bolesnika kod kojih je uzorak BAL-a uzet.

Značenje hemokultura, kao i uzoraka sputuma, u dijagnostici izvanbolničkih pneumonija i njihov utjecaj na antimikrobno liječenje bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom još uvijek je kontroverzno, te se neprestano preispituje, tim više što ova pretraga nije jeftina. Novija istraživanja sve više govore o njihovom malom značenju u dijagnostici izvanbolničkih pneumonija. Campbell i suradnici utvrdili su samo 2,1 % (6/289) pozitivnih hemokultura kod bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom<sup>144</sup>. Benenson i suradnici utvrdili su 3,4 % (23/684) pozitivnih hemokultura koje nisu utjecale na antimikrobno liječenje bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom, te su preporučili da se kod ovih bolesnika one ne uzimaju<sup>145</sup>. Rezultati ovih novijih istraživanja utjecali su i na već spomenute preporuke stručnih društava. Tako preporuke Američkog društva za infektivne bolesti (IDSA) i Američkog torakalnog društva (ATS) preporučuju selektivno uzimanje uzoraka sputuma kao i hemokultura. Treba ih uzeti prije primjene antimikrobnog liječenja samo kod hospitaliziranih bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom koji imaju kliničku indikaciju kao što je teška pneumonija, primitak u JIL, neuspješno ambulantno primjenjeno antimikrobno liječenje, leukopenija, kronična bolest jetre, etilizam, splenektomija, itd. dok kod bolesnika bez navedenih indikacija uzimanje navedenih uzoraka nije obavezno<sup>52</sup>. Slično kao u nekim drugim istraživanjima, i u ovom su istraživanju sve hemokulture (N=11) ostale sterilne<sup>25</sup>. Objašnjenje bi moglo biti prethodno primjenjeno antimikrobno liječenje kod 1 bolesnika, te blaga pneumonija (PSI skupina I-III) kod 7 bolesnika s uzetom hemokulturom. Naime, u istraživanjima je utvrđeno da su hemokulture češće pozitivne kod bolesnika s težom pneumonijom kao i utjecaj prethodno primjenjenog antimikrobnog liječenja na rezultate hemokultura<sup>33, 146,147</sup>.



Najuspješnija metoda za dijagnostiku izvanbolničke pneumonije uzrokovane sa *S. pneumoniae* u ovom istraživanju bila je otkrivanje pneumokoknog antigena u urinu kao što je bio slučaj i u nekim prethodnim istraživanjima<sup>117,148</sup>. Većina od 25 pneumokoknih infekcija otkrivene su uglavnom pomoću pneumokoknog antigena u urinu (N=16; 64,0 %). Kod 13 (52,0 %) slučajeva pneumokokni antigen u urinu bio je jedini pozitivan test za *S. pneumoniae* i kod ovih bolesnika je omogućio dijagnozu koju ostale metode nisu. Kod 3 bolesnika s pozitivnim pneumokoknim antigenom u urinu prethodno su bili primjenjeni antimikrobni lijekovi.

PCR za *S. pneumoniae* bio je negativan u svih 77 uzoraka seruma. Dakle, kod bolesnika čije su hemokulture ostale sterilne (N=11) bili su PCR-negativni i uzorci seruma. Ovakvi rezultati na uzorcima seruma govore u prilog onih autora koji smatraju da PCR na ovim uzorcima nije koristan test u dijagnostici pneumokokne pneumonije<sup>72,73</sup>.

PCR-negativni rezultati na uzorcima periferne krvi, ponekad i kod pneumokokne bakterijemije dokazane u hemokulturi, pokušavaju se u literaturi protumačiti na različite načine:

- a) niskom koncentracijom *S. pneumoniae* (broj mikroorganizama po mililitru krvi), a time i pneumokokne DNA u krvi tijekom bakterijemije,
- b) prethodno primjenjenim antimikrobnim liječenjem,
- c) nepotpuno odstranjenim inhibitorima prisutnim u uzorku,
- d) visokom razinom prisutne humane DNA u uzorku,
- e) razgradnjom pneumokokne DNA tijekom čuvanja uzoraka i
- f) malim volumenom uzorka krvi odnosno seruma koji se koristi za izolaciju DNA<sup>64,66,68,69,72,73,124</sup>.

Činjenica da koncentracija pneumokoka u krvi tijekom bakterijemije može biti vrlo niska dokazana je kod djece. U istraživanju u kojem je *S. pneumoniae* bio izoliran u hemokulturi kod 22 djece, kod njih 23 % bilo je prisutno <1 bakterije/ml, kod 27 % 1-9 bakterija/ml, kod 23 % 10-100 bakterija/ml i kod 28 % >100 bakterija /ml. Dakle, kod 50 % djece u krvi je bilo prisutno <10 bakterija/ml<sup>68</sup>. Analogno tome niti PCR u uzorcima pune

krvi kod djece s pneumokoknom pneumonijom nije pokazao dobre rezultate. Naime, uzorci pune krvi u djece s pozitivnom hemokulturom bili su PCR-negativni. Autori su ovaj nalaz protumačili kao posljedicu gore navedenih niskih koncentracija bakterija u krvi čemu pridonosi i mali volumen uzorka koji se koristi za izolaciju DNA<sup>149</sup>.

Utjecaj antimikrobnog liječenja na rezultate PCR za *S. pneumoniae* u uzorcima krvi opisalo je nekoliko autora. Dagan i suradnici nisu detektirali prethodno dokazanu pneumokoknu DNA u serumu bolesnika 48 sati nakon početka antimikrobnog liječenja<sup>66</sup>. Kod Toikka i suradnika kod 2 bolesnika s pozitivnom hemokulturom PCR u uzorcima krvi bio je negativan, ali su uzorci krvi za PCR bili uzeti 2-5 dana nakon hemokultura, a u tom vremenu su bolesnici primali antimikrobne lijekove<sup>68</sup>. U nekim pak istraživanjima PCR je pokazao dobre rezultate u detekciji pneumokoka u krvi kod bolesnika prethodno liječenih antimikrobnim lijekovima<sup>70,150,151</sup>. Očito je da se rezultati o utjecaju antimikrobnog liječenja na PCR vrlo razlikuju između pojedinih istraživanja. U ovom istraživanju antimikrobno liječenje primjenjeno je prije pregleda i/ili hospitalizacije u Klinici kod 31,2 % (24/77) ispitanika s PCR-negativnim rezultatima u uzorcima seruma.

Klinički uzorci mogu sadržavati čimbenike koji djeluju inhibitorno na PCR reakciju, te mogu biti uzrokom lažno-negativnih rezultata. Prisutnost inhibitora do sada je utvrđena u različitim vrstama kliničkih uzoraka kao što su krv i njene frakcije (serum, plazma, leukociti), uzorci iz respiratornog i urogenitalnog sustava, cerebrospinalni likvor itd. Osobito velik broj inhibitora otkriven je u uzorcima krvi. Najpoznatiji je hemoglobin čiji porfirinski prsten može inhibirati PCR reakciju vezivanjem Taq DNA polimeraze. Inhibitorno djelovanje u uzorcima krvi mogu imati i leukocitna DNA, IgG i antikoagulansi. Za mnoge inhibitore točan mehanizam djelovanja još uvijek je nepoznat<sup>65,152,153,154</sup>. Prisutnost inhibitora u kliničkim uzorcima može se otkriti uključivanjem istodobne amplifikacije humanih  $\beta$ -globinskih gena, upotrebom specifičnih pozitivnih internih kontrola, te pomoću *spiking*-a. Postoje i postupci kojima se inhibitori mogu ukloniti iz kliničkih uzoraka ili barem umanjiti njihovo djelovanje. To se može postići razrjeđivanjem uzoraka, njihovim zagrijavanjem (denaturacija inhibitora proteinskog sastava), te

odgovarajućim postupcima izolacije DNA<sup>58,155</sup>. U ovom istraživanju za utvrđivanje prisutnosti inhibitora u PCR-negativnim uzorcima seruma i BAL-a korišten je *spiking*, a za uklanjanje eventualno prisutnih inhibitora iz uzoraka seruma korišteno je razrjeđivanje uzoraka *pooliranjem* kako je opisano u literaturi<sup>124,125</sup>. Prisutnost inhibitora utvrđena je u jednom uzorku seruma, dok inhibitori u uzorcima BAL-a nisu otkriveni. U ostalim sličnim istraživanjima broj uzoraka krvi s utvrđenom inhibicijom PCR reakcije varirao je<sup>69,72,73,124,149</sup>. U jednom takvom istraživanju uzorci krvi pokazivali su inhibiciju PCR reakcije kada je korištena standardna fenol-kloroform izolacija DNA, ali je inhibicija nestala nakon ponovljene izolacije DNA komercijalnim kitom, sličnom onom koji je korišten i u ovom istraživanju<sup>69</sup>. Metoda izolacije DNA, protokol za PCR reakciju, kao i početnice za gen pneumolizina korišteni u ovom istraživanju već su uspješno korišteni u ranije provedenim istraživanjima.

U kliničkim uzorcima PCR reakcijom se mala količina mikrobne DNA mora otkriti u okruženju koje sadrži eukariotski genetski materijal. Humana DNA pri tome može interferirati s PCR reakcijom. U uzorcima krvi humana leukocitna DNA može djelovati inhibitorno tako da kompeticijom ometa vezivanje početnica za ciljane sekvence. Štoviše, inhibitorno djelovanje može biti jednostavno posljedica otežane difuzije svih komponenti u reakcijskoj smjesi zbog prisutnosti dugih lanaca humane DNA. Neki autori preporučuju da se pri izolaciji DNA iz uzoraka krvi ispiranje radi 5 puta, te da uzorak dobiven izolacijom ne sadrži više od 4 µg DNA<sup>156</sup>. U ovom istraživanju prema protokolu koji je korišten za izolaciju DNA, ispiranje je rađeno 4 puta kako je navedeno u preporuci proizvođača kita za izolaciju. Prema navodima proizvođača količina nukleinske kiseline dobivena izolacijom iz 200 µl pune krvi iznosi 3-6 µg, ali je u ovom istraživanju bila manja od navedene jer su korišteni uzorci seruma u kojima je za očekivati manja količina leukocitne DNA nego li u uzorcima pune krvi. Može se zaključiti da su oba uvjeta kojima se može smanjiti utjecaj leukocitne DNA na rezultate PCR reakcije u ovom istraživanju bila zadovoljena.

Razgradnja pneumokokne DNA moguća je pri nepravilnom čuvanju uzoraka, te njihovom ponovnom zamrzavanju i odmrzavanju. Unatoč tome što su u ovom istraživanju

svi klinički uzorci podijeljeni u manje alikvote da se izbjegne ponovno zamrzavanje i odmrzavanje, te pohranjeni u tekućem dušiku, a pripravci izolirane DNA na -20<sup>o</sup> C, utjecaj razgradnje pneumokokne DNA ne može se sa sigurnošću isključiti. Ipak, dokazano je da niti inkubacija *S. pneumoniae* odnosno pneumokokne DNA u punoj krvi na 4<sup>o</sup>C tijekom 12 dana ne utječe na amplifikaciju pneumokokne DNA<sup>64</sup>.

Mali volumen uzorka krvi odnosno seruma (200 μ) koji je u većini istraživanja korišten za izolaciju DNA svakako je jedan od čimbenika koji treba uzeti u obzir pri razmatranju negativnih PCR rezultata, posebno s obzirom na već spomenutu dvojbenu koncentraciju pneumokokne DNA u bolesnika s bakterijemijom. U najnovijem nedavno objavljenom istraživanju je za izolaciju DNA korišten veći volumen pune krvi (1 ml), a u reakcijskoj smjesi je također korišten veći volumen pripravka izolirane DNA (21 μl). Korištena je *real-time* PCR metoda koja je dala pozitivne rezultate i u bolesnika sa sterilnom hemokulturom<sup>157</sup>.

PCR za *S. pneumoniae* bio je pozitivan kod 3 (15,8 %) od ukupno 19 uzoraka BAL-a. Kod dva od ukupno tri ispitanika kod kojih je PCR za *S. pneumoniae* u uzorku BAL-a bio pozitivan, to je bila i jedina metoda kojom je *S. pneumoniae* utvrđen i kod ovih bolesnika je, za razliku od ostalih metoda, omogućio postavljanje etiološke dijagnoze unatoč tome što su bolesnici prethodno liječeni antimikrobnim lijekovima. Stoga nije neobično da su kulture BAL-a kod ovih bolesnika bile negativne. Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da se BAL PCR-om za *S. pneumoniae*, čak i ako je već primjenjeno antimikrobno liječenje, mogu dijagnosticirati dodatni slučajevi pneumokokne pneumonije koje nije moguće otkriti konvencionalnim metodama. Problem predstavlja činjenica da je fiberoptička bronhoskopija invazivni postupak koji se izvodi samo kod određenih bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom – kod neuspješnog antimikrobnog liječenja odnosno sporo regredirajućih i neregredirajućih pneumonija (engl. nonresolving pneumonia). Ova činjenica umanjuje ulogu BAL PCR-a kao brze metode u ranoj dijagnostici pneumokokne pneumonije, te mijenja ulogu PCR-a u njezinoj dijagnostici. Umjesto kod tek primljenog bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom, PCR ovime postaje važan kod bolesnika kod

kojeg je započeto antimikrobno liječenje neuspješno, te se indicira bronhoskopska pretraga, a PCR na uzorku BAL-a jedna je od dijagnostičkih metoda koju bi trebalo napraviti na dobivenom uzorku zbog eventualnog razjašnjenja etiologije i donošenja odluke o daljnjem liječenju bolesnika. Naime, s obzirom da je bolesnik tada obično već više dana pod djelovanjem antimikrobnih lijekova, kultivacija, pa čak i takvog uzorka kao što je BAL, teško će dokazati pneumokok kao uzročnika pneumonije što je vidljivo i iz rezultata ovog ispitivanja gdje je u samo jednom uzorku BAL-a *S. pneumoniae* izoliran u kulturi. Do sada je provedeno samo jedno istraživanje u kojem je PCR za *S. pneumoniae* evaluiran na uzorcima BAL-a. U tom istraživanju korišten je *multiplex* PCR koji je osim početnica za *H. influenzae*, *M. pneumoniae* i *C. pneumoniae* uključivao i početnice specifične za *lytA* gen *S. pneumoniae*. U tom istraživanju *S. pneumoniae* je pomoću kulture otkriven u BAL-u kod 6.4 % (10/156) bolesnika, a *multiplex* PCR-om kod 28 % (44/156) bolesnika s infekcijom donjeg respiratornog sustava. Od 103 bolesnika koji su liječeni antimikrobnim lijekovima prije bronhoskopske pretrage, *S. pneumoniae* bio je otkriven pomoću kulture kod 2.9 %, a pomoću *multiplex* PCR-a kod njih 31,0 %. Ovo istraživanje pokazalo je da bi PCR na uzorcima BAL-a bio korisna dijagnostička metoda kod bolesnika prethodno liječenih antimikrobnim lijekovima<sup>78</sup>. U našem istraživanju BAL PCR za *S. pneumoniae* bio je također češće pozitivan (N=3, 15,8 %) od kulture BAL-a (N=1, 5,3 %), ali razlika nije bila statistički značajna ( $p=0,302$ ). Iako je možda broj uzoraka u našem istraživanju premalen (N=19), veći postotak BAL PCR-pozitivnih rezultata kod bolesnika prethodno liječenih antimikrobnim lijekovima u navedenom istraživanju (31,0 %) u odnosu na naše (15,8 %) ne iznenađuje. Za razliku od našeg istraživanja u kojem su uzorci BAL-a uzimani u slučaju terapijskih i dijagnostičkih poteškoća, što znači nekoliko dana od primitka, u navedenom istraživanju uzorci BAL-a uzeti su kod svih bolesnika unutar 24 sata od primitka u bolnicu. Za očekivati je da je utjecaj antimikrobnih lijekova u navedenom istraživanju bio manji nego li u našem, pa stoga i veći postotak pozitivnih BAL PCR rezultata. S druge strane, naše istraživanje daleko točnije odražava kakve su mogućnosti ove metode u svakodnevnoj rutinskoj praksi.

Za razliku od malobrojnih PCR-pozitivnih rezultata u uzorcima krvi kod djece s pneumonijom, Lahti i suradnici PCR metodom na uzorcima pleuralnih izljeva kod djece s empijom povećali su stopu detekcije *S. pneumoniae* sa 8 % na 75 % u usporedbi s kultivacijom<sup>149</sup>. Analogno tome, negativni PCR-rezultati na uzorcima seruma, a pozitivni na uzorcima BAL-a u našem istraživanju upućuju na zaključak da PCR metodu u dijagnostici pneumokokne pneumonije ne treba izvoditi na uzorcima krvi, već na uzorcima dobivenim s mjesta infekcije, odnosno iz respiratornog sustava. Za pretpostaviti je da se samo tamo pneumokok nalazi u dovoljnom broju da ga PCR svojim pragom detekcije može obuhvatiti, dok je u krvi njegova koncentracija preniska.

*M. pneumoniae* je u ovom istraživanju utvrđena kod 7 (8,8 %) ispitanika. Poznato je da se infekcije s *M. pneumoniae* javljaju tijekom cijele godine, bez znatnijeg sezonstva, a epidemije svake 4-8 godina. U Hrvatskoj je u 2002. godini, kada nije bilo epidemije, učestalost *M. pneumoniae* među atipičnim uzročnicima bila 6 %<sup>158</sup>. Zadnja epidemija u Hrvatskoj zabilježena je 2004. godine kada je prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo 36 % atipičnih pneumonija bilo uzrokovano s *M. pneumoniae*. Učestalost *M. pneumoniae* među bakterijskim uzročnicima utvrđena u ovom istraživanju (8,8 %) u skladu je sa činjenicom da se Hrvatska trenutno nalazi u međuepidemijskom razdoblju.

Srednja dob ( $\pm$  SD) ispitanika s dokazanom *M. pneumoniae* u ovom istraživanju bila je 70,5 godina. Ovaj rezultat u skladu je s ostalim istraživanjima koja pokazuju da ona može biti uzročnik pneumonije i u starijim dobnim skupinama<sup>42,43,44,82</sup>.

U ovom istraživanju kod 6 ispitanika sa serološki dokazanom *M. pneumoniae* PCR rezultati bili su negativni i obrnuto, kod 1 bolesnika s PCR-pozitivnim rezultatom *M. pneumoniae* serološki nije dokazana. Ovi rezultati govore u prilog činjenici da, unatoč naprednoj *in vitro* tehnologiji, sam PCR nije uvijek dovoljan za dijagnozu respiratornih infekcija uzrokovanih s *M. pneumoniae*. Naime, nekoliko je istraživanja pokazalo da postoji slaba korelacija između serološkog odgovora i pozitivnih PCR rezultata kod bolesnika s pneumonijom uzrokovanom s *M. pneumoniae*<sup>86,87,88</sup>. Za bolesnike s PCR-pozitivnim rezultatom kod kojih *M. pneumoniae* nije serološki dokazana prema literaturi postoji

nekoliko objašnjenja<sup>46</sup>. Prvo, prisutnost *M. pneumoniae* u respiratornom sustavu nije uvijek povezana sa prisutnošću kliničkih simptoma. Ona može biti prisutna u ždrijelu 5,1-13,5 % zdravih odraslih osoba. Ovakvo prolazno asimptomatsko kliconoštvo može biti posljedica njezine perzistencije nakon bolesti ili se može raditi o pravoj infekciji koja je u fazi inkubacije, jer ne treba zaboraviti da inkubacija kod respiratornih infekcija s *M. pneumoniae* traje otprilike 3 tjedna. Drugo, serološkog odgovora nema ako se radi o ranom stadiju bolesti. Treće, serološkog odgovora nema niti kod imunokompromitiranih bolesnika. Može se zaključiti da prisutnost *M. pneumoniae* u uzorcima iz respiratornog sustava ne mora biti siguran dokaz da je ona uzročnik pneumonije kod tog bolesnika. Međutim, prisutnost kliničkih znakova pneumonije i pozitivni PCR-rezultat ukazuju na mikoplazmatsku etiologiju bolesti i predstavljaju indicaciju za primjenu odgovarajućeg antimikrobnog liječenja. U ovom istraživanju PCR za *M. pneumoniae* bio je pozitivan kod 80-godišnjeg ispitanika s kliničkom slikom izvanbolničke pneumonije kod kojeg su sve ostale mikrobiološke pretrage bile negativne, te se kod njega izostanak serološkog odgovora može protumačiti činjenicom da je uzorak seruma uzet rano u tijeku bolesti ili je pak serološki odgovor bio manjkav zbog njegove visoke životne dobi. Značajno niži titrovi protutijela na *M. pneumoniae* kod starijih bolesnika već su utvrđeni u drugim istraživanjima, a u jednom istraživanju su čak bolesnici s PCR-pozitivnim rezultatom bez dokazanog serološkog odgovora bili značajno stariji od bolesnika s pozitivnim serološkim nalazom<sup>82</sup>. Novi uzorak seruma 1-2 tjedna kasnije koji bi trebalo ispitati kod našeg bolesnika nije dobiven. Obrnuti slučajevi, odnosno PCR-negativni rezultati kod bolesnika sa serološki dokazanom *M. pneumoniae* u literaturi se objašnjavaju kao posljedica učinka antimikrobnog liječenja ili djelovanja imunološkog sustava domaćina. Dakle, iako *M. pneumoniae* može perzistirati u respiratornom sustavu nekih bolesnika i nekoliko mjeseci, rjeđe se detektira u kasnijim stadijima bolesti kada je nastao serološki odgovor. Za razliku od pozitivnih PCR-rezultata, porast titra specifičnih protutijela uvijek je pouzdan dokaz svježije infekcije s *M. pneumoniae*<sup>46</sup>. Rezultati ovog istraživanja govore u prilog onih autora koji smatraju da za *M. pneumoniae* PCR nema prednosti pred serološkim

metodama<sup>70,159,160</sup>. Ovakvom stavu dodatno doprinosi današnja mogućnost određivanja IgA protutijela koja se mogu otkriti već u akutnoj fazi bolesti, pa niti rano otkrivanje etiologije, inače jedna od glavnih osobina PCR-a, ovdje nema značajnu ulogu. On može biti koristan u onih bolesnika u kojih se ne stvara serološki odgovor kao što su osobe starije životne dobi (poput ranije opisanog 80-godišnjeg ispitanika) i imunokompromitirani bolesnici uopće.

*Legionella* species je u ovom istraživanju utvrđena kod 2 (2,5 %) ispitanika. Sa ovakvom učestalošću utvrđena je i u ostalim sličnim istraživanjima<sup>2,70,159,161</sup>.

Kod oba ispitanika etiološka dijagnoza postavljena je na temelju pozitivnog antigena za *L. pneumophila* serogrupa 1 u urinu. Istodobno negativna IgG i IgM protutijela za *L. pneumophila* serogrupa 1-7 kod jednog od ova dva bolesnika kod kojeg je uzorak seruma bio dostupan lako se mogu objasniti. Naime, glavno ograničenje serološke dijagnostike legioneloze jest kasni nastanak serokonverzije, u većini slučajeva nakon 3-4, ali ponekad i nakon više od 10 tjedana. S obzirom da je kod bolesnika bio dostupan samo uzorak akutne faze bolesti, negativni serološki nalaz ne iznenađuje.

Kod dva ispitanika bila su negativna IgM, a pozitivna IgG protutijela za *L. pneumophila* serogrupa 1-7, pa je ove rezultate bilo teško protumačiti bez seruma konvalescentne faze bolesti koji nisu bili dostupni. Kod jednog ispitanika radilo se o teškoj pneumoniji (PSI skupina V) kakvu legionele inače mogu uzrokovati, ali uzorak urina za otkrivanje antigena, kao ni uzorak sputuma ni BAL-a za PCR kod tog ispitanika nisu dobiveni. Sve ostale mikrobiološke pretrage bile su negativne. Radilo se o ispitaniku kod kojeg je istovremeno bilo prisutno više čimbenika koji inače povećavaju rizik od infekcije legionelom (teška pneumonija, pušač, KOPB, imunokompromitiran zbog karcinoma pluća). Međutim, na temelju samo jednog uzorka s pozitivnim IgG bez dokaza dinamike titra ne može se znati radi li se o akutnoj ili nekoj prošloj infekciji s legionelom<sup>51,162</sup>. Kod drugog ispitanika radilo se o blažoj pneumoniji koja je nakon početnog neuspješnog liječenja ko-amoksiklavom prije hospitalizacije regredirala na kombinirano liječenje ceftriaksonom i azitromicinom. Antigen za *L. pneumophila* serogrupa



1 u urinu bio je negativan kao i PCR za *Legionella* spp. u sputumu. Svi ostali mikrobiološki nalazi također su bili negativni. Antigen u urinu može biti negativan u slučaju legioneloze uzrokovane nekom drugom serogrupom *L. pneumophila*. PCR rezultat u uzorku sputuma može ostati negativan ako uzorak nije uzet u ranoj fazi bolesti kada je veća vjerojatnost da bude pozitivan<sup>51</sup>. Niti kod ovog ispitanika na temelju samo jednog uzorka s pozitivnim IgG bez dokaza dinamike titra ne može se znati radi li se o akutnoj ili nekoj prošloj infekciji s legionelom<sup>51,162</sup>.

Kod jedne ispitanice bila su pozitivna IgG protutijela za *L. pneumophila* serogrupa 7-14 (pool II) u testu indirektna imunofluorescence koji je indicirao liječnik kliničar koji je pratio bolesnika. ELISA metodom IgG i IgM protutijela za *L. pneumophila* serogrupa 1-7 bila su negativna. Antigen za *L. pneumophila* serogrupa 1 u urinu nije napravljen jer se radilo o bolesnici s blažom pneumonijom (PSI skupina I), a PCR za *Legionella* spp. u sputumu bio je negativan. Ispitanica je liječena u JIL-u kombinacijom ceftriaksona i azitromicina. Kod ispitanice je istovremeno bio pozitivan pneumokokni antigen u urinu s jakim intenzitetom obojene linije što prema nekim autorima upućuje na definitivnu dijagnozu pneumokokne pneumonije<sup>163</sup>. Na temelju samo jednog uzorka s pozitivnim IgG bez dokaza dinamike titra ne može se znati kakvo je bilo njegovo značenje kod ove ispitanice<sup>51,162</sup>.

Rezultati ovog istraživanja potvrdili su sve nedostatke mikrobiološke dijagnostike legioneloze – činjenicu da bolesnici s legionelozom često nemaju produktivni iskašljaj, pa je uzorak sputuma nemoguće dobiti, nemogućnost otkrivanja ostalih vrsta i serogrupa testom za antigen u urinu i potrebu za uzimanjem seruma konvalescentne faze koji tek omogućuje definitivnu dijagnozu, iako retrospektivnu. Najkorisnija metoda u ovom istraživanju bilo je otkrivanje legionela antigena u urinu. PCR rezultati na uzorcima sputuma i BAL-a u ovom istraživanju bili su negativni, te nisu doprinijeli dijagnozi dodatnih slučajeva legioneloze. Iz tog razloga, kao i već navedene činjenice da dio bolesnika nema produktivni kašalj, jasno je da PCR-om treba evaluirati druge vrste kliničkih uzoraka. U

novije vrijeme sve se više istražuju uzorci seruma koji su u nekim istraživanjima pokazali dobre rezultate<sup>164,165</sup>.

*C. pneumoniae* utvrđena je u ovom istraživanju kod 4 (5,0 %) bolesnika. Ovaj rezultat u skladu je s do sada objavljenim istraživanjima u kojima učestalost infekcija s ovim bakterijskim uzročnikom varira između <1 % do 13 %<sup>3,5,13,78,117,136,139,148</sup>.

Kod sva četiri bolesnika *C. pneumoniae* dokazana je konvencionalnom metodom odnosno na temelju pozitivnih IgM protutijela. *Real-time* PCR za *C. pneumoniae* na uzorcima sputuma kod ovih bolesnika bio je negativan, a s obzirom da u njih nije bila indicirana bronhoskopija, uzorak BAL-a nije bio dostupan.

*Real-time* PCR rezultati za *C. pneumoniae* na svim uzorcima sputuma i BAL-a u ovom istraživanju bili su negativni. U tri uzorka sputuma *real-time* PCR dao je nesigurne rezultate, ali su ponavljanjem testa i u ovim uzorcima dobiveni negativni rezultati. Činjenica da su svi slučajevi infekcije s *C. pneumoniae* dokazani serološki, a niti jedan PCR reakcijom u skladu je s ranije objavljenim istraživanjima<sup>116,117,166</sup>. Naime, u svim istraživanjima pomoću PCR-a otkriveno je 10-20 % više slučajeva nego li kultivacijom na staničnim kulturama, ali je zato serološkim testovima otkriveno 10-20 % više slučajeva nego li pomoću PCR-a<sup>58</sup>. Upitno je samo da li bi i uzorci BAL-a, da su bili klinički indicirani kod četiri bolesnika sa serološki dokazanom *C. pneumoniae*, također bili negativni. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je serologija najprihvatljivija metoda za dijagnostiku *C. pneumoniae* infekcija. PCR treba dalje evaluirati i standardizirati ili pak tražiti nove brze metode za dijagnostiku ovog bakterijskog uzročnika koji može uzrokovati i teže pneumonije.

U 62,0 % uzoraka seruma (49/79) bila su prisutna samo *C. pneumoniae* IgG. Poznato je da su ova protutijela prisutna kod oko 50 % odrasle populacije bez klinički vidljive bolesti<sup>48,167,168</sup>. U nekim istraživanjima seroprevalencija je bila češća kod starijih ljudi i bolesnika s KOPB-om, te je iznosila preko 75 %<sup>169,170</sup>. Rezultati ovog istraživanja to su potvrdili jer je srednja dob ispitanika iznosila 62,6 godina, a prevalencija *C. pneumoniae* IgG bila je statistički značajno veća kod bolesnika s KOPB, nego li kod bolesnika bez

KOPB ( $p=0,017$ ). Iako su i druge serološke studije ukazivale na to da *C. pneumoniae* može imati ulogu u akutnim egzacerbacijama KOPB, novija istraživanja pokazala su da ona nema ulogu niti u stabilnoj fazi bolesti niti u egzacerbacijama<sup>135</sup>.

Do sada su provedena samo četiri istraživanja u kojima su analizirani rezultati mikrobioloških metoda u odnosu na PSI skupine bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom<sup>116,117,119,148</sup>. U navedenim istraživanjima utvrđene su neke razlike između bolesnika s različitom težinom pneumonije. Iako se u njima može naslutiti tendencija da se etiološka dijagnoza češće utvrdi kod bolesnika s težom pneumonijom (PSI skupine IV-V), to u njima nije dokazano. Izuzetak je istraživanje Templeton i suradnika u kojem je kod bolesnika s težom pneumonijom uzročnik otkriven kod njih  $>90\%$ <sup>116</sup>. Niti u ovom našem istraživanju u kojem je etiologija utvrđena kod 42 bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom, broj razjašnjenih izvanbolničkih pneumonija nije se statistički značajno razlikovao između bolesnika u PSI skupinama I-III (54,2 %) i IV-V (50,0 %).

U navedenim istraživanjima pokušala se i utvrditi eventualna povezanost između otkrivenog bakterijskog uzročnika i PSI skupine bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom. *S. pneumoniae* bio je najčešći bakterijski uzročnik bez obzira na težinu pneumonije, iako nešto češće kod bolesnika s težom pneumonijom, kao i *L. pneumophila*, dok je *M. pneumoniae* češće otkrivena kod bolesnika s lakšom pneumonijom<sup>117,119</sup>. Rezultati našeg istraživanja pokazali su slično - učestalost pojedinih bakterijskih uzročnika između bolesnika u PSI skupinama I-III i IV-V nije se statistički značajno razlikovala. Ipak je uočljivo da je, bez obzira radilo se o blažoj ili težoj pneumoniji, *S. pneumoniae* bio najčešći bakterijski uzročnik. Kad govorimo o atipičnim uzročnicima važno je naglasiti da su se oba bolesnika s otkrivenom legionelom nalazila u PSI skupini V, a da istovremeno niti jedan bolesnika s otkrivenom *M. pneumoniae* ne pripada u ovu skupinu bolesnika s najtežom pneumonijom. Za razliku od toga, jedan ispitanik s *C. pneumoniae* pripadao je u PSI skupinu V što potvrđuje činjenicu već navedenu u literaturi da ovaj uzročnik može uzrokovati i teže pneumonije<sup>117</sup>. Ovaj bolesnik primljen je u JIL s kliničkom dijagnozom pleuropneumonije i mogućeg apscesa pluća. Pri primitku bio je visoko febrilan (do 42° C)

uz vrijednosti leukocita od  $12,0 \times 10^9/L$ , te CRP 246,8 mg/L, te je započeto liječenje ceftriaksonom i klindamicinom. Peti dan po primitku kod ispitanika su u uzorku sputuma nađeni acidorezistentni bacili, te je započeto liječenje antituberkuloticima. U kulturi je naknadno porastao *Mycobacterium tuberculosis*. S obzirom da su kod bolesnika bila pozitivna i IgM i IgG protutijela kao dokaz akutne infekcije s *C. pneumoniae*, može se zaključiti da se radi o bolesniku s tuberkulozom kod kojeg je bila prisutna popratna izvanbolnička pneumonija u prilog kojoj govore i izrazito povišena temperatura i povišeni parametri upale. Ovakvi slučajevi kod bolesnika s tuberkulozom prema literaturi nisu rijetki<sup>127</sup>. Kod bolesnika je tuberkuloza vjerojatno bila prisutna već neko vrijeme, a u bolnicu je primljen zbog izvanbolničke pneumonije, pri čemu je onda otkrivena i tuberkuloza.

Hohenthal i suradnici pokazali su da se rezultati pojedinih mikrobioloških metoda razlikuju u odnosu na težinu pneumonije. U tom istraživanju pneumokokni antigen u urinu i hemokulture bili su statistički značajno češće pozitivni kod bolesnika s težom pneumonijom. Naprotiv, PCR i serologija za *M. pneumoniae* bili su češće pozitivni kod onih s lakšom pneumonijom<sup>117</sup>. U našem istraživanju pneumokokni antigen u urinu bio je češće pozitivan u PSI skupinama IV-V nego li I-III, a *M. pneumoniae* IgA i *C. pneumoniae* IgM protutijela u PSI skupinama I-III nego li IV-V, ali ove razlike nisu bile statistički značajne. Činjenica da su oba bolesnika s pozitivnim antigenom za *L. pneumophila* serogrupa 1 u urinu imala tešku pneumoniju (PSI skupina V), a jedan od njih je bio liječen i u JIL-u, u skladu je s navodima u literaturi prema kojoj bolesnici s pozitivnim legionela antigenom u urinu imaju teži klinički tijek bolesti<sup>161</sup>. Za ostale mikrobiološke metode u ovom istraživanju razlike između PSI skupina nisu zabilježene.

Rezultati PCR-a u odnosu na težinu pneumonije analizirani su u samo dva istraživanja. U prvom istraživanju je, kako je već spomenuto, utvrđeno da je PCR za *M. pneumoniae* češće pozitivan kod bolesnika s lakšom pneumonijom, a u drugom je kod bolesnika s teškom pneumonijom pomoću PCR-a etiološku dijagnozu bilo moguće

postaviti kod >90 % bolesnika<sup>116,117</sup>. Ova dva istraživanja imaju dva nedostatka – prvo, u njima nije primjenjen PCR za *S. pneumoniae* kao najčešćeg bakterijskog uzročnika izvanbolničke pneumonije i drugo, PCR-om nisu analizirani bronhoskopski dobiveni uzorci odnosno bili su analizirani u zanemarivom broju (N=3). Ova dva nedostatka (PCR za *S. pneumoniae* i uzorci BAL-a) u našem istraživanju su ispravljena, te su upravo njihovim dodavanjem u istraživanje dobivene neke od glavnih spoznaja koje će proizaći iz ovog znanstveno-istraživačkog rada. Važnost BAL-a kao uzorka za PCR za *S. pneumoniae* već je u ovoj raspravi naglašen. Sva tri bolesnika s pozitivnim PCR-om za *S. pneumoniae* bila su pozitivna upravo u uzorku BAL-a, a ne u serumu, a kod dvojice je to bio i jedini dokaz pneumokokne infekcije. Rezultati BAL PCR-a za *S. pneumoniae* nisu se značajno razlikovali između bolesnika PSI skupine I-III i IV-V (16,7 % vs 15,4 %). Težina pneumonije nije utjecala na rezultate BAL PCR-a za *S. pneumoniae*, ali su njime dijagnosticirana dva dodatna slučaja pneumokokne pneumonije koja nisu otkrivena drugim mikrobiološkim metodama. Možemo zaključiti da težina bolesti nije čimbenik koji bi određivao da li BAL PCR treba uključiti u mikrobiološku obradu bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom. Ipak, kod bolesnika kod kojih je ova invazivna dijagnostička metoda opravdana, o čemu je u ovoj raspravi već bilo govora, ova metoda može doprinijeti postavljenju etiološke dijagnoze, a na taj način i adekvatnom liječenju bolesnika.

Za ostale bakterijske uzročnike zbog premalenog broja PCR-pozitivnih rezultata zaključke o utjecaju težine pneumonije na PCR nemoguće je donijeti. *M. pneumoniae* PCR bio je pozitivan samo kod jednog bolesnika PSI skupine III.

U ovom istraživanju antimikrobni lijek koji je najčešće primjenjen u empirijskom antimikrobnom liječenju bio je ko-amoksiklav. Primjenjen je u 40,0 % bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom. Po učestalosti primjene nakon njega sljedili su ceftriakson (26,3 %), makrolidi (20,0 %) i kinoloni (15,0 %).

Pitanje da li kod bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom primijeniti monoterapiju ili kombinirano antimikrobno liječenje još uvijek je kontroverzno. Monoterapija je pri tome definirana kao primjena samog beta-laktama ili fluorokinolona, a kombinirano antimikrobno

liječenje kao kombinacija koja uključuje beta-laktam s makrolidom ili fluorokinolonom<sup>171</sup>. U ovom istraživanju kombinirano antimikrobno liječenje prema navedenoj definiciji primjenjeno je kod 11 (13,8 %) bolesnika. Prema Loh i suradnicima između bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom liječenih bez i s dodavanjem makrolida nije bilo značajne razlike u mortalitetu<sup>172</sup>. Međutim, sve veći broj istraživanja pokazuje da je kod bolesnika s teškom pneumonijom primjena kombiniranog antimikrobnog liječenja povezana s nižim mortalitetom<sup>128,129,173,174</sup>. Stoga i trenutno važeće preporuke stručnih društava preporučuju kod bolesnika s teškom pneumonijom kombinirano antimikrobno liječenje<sup>52,54</sup>. Prednost kombiniranog anitmikrobnog liječenja kod bolesnika s teškom pneumonijom objašnjava se različitim čimbenicima kao što je djelovanje na atipične uzročnike, različite mehanizme djelovanja na bakterijsku stanicu (stanični zid za beta-laktame, sinteza proteina za makrolide), ali i antiinflamatornim djelovanjem makrolida<sup>171,175</sup>. U ovom istraživanju od ukupno 11 bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom kod kojih je primjenjeno kombinirano antimikrobno liječenje, njih 4 imalo je tešku pneumoniju (PSI skupina IV-V), a samo kod jednog od njih otkriven je atipični uzročnik, i to legionela.

Već je u uvodu navedeno da unatoč dobivenim nalazima, pa čak i onima pozitivnih hemokultura, kliničari vrlo rijetko mijenjaju započetu empirijsku terapiju u onu ciljanu, užeg spektra djelovanja, koja je usmjerena samo na otkrivenog bakterijskog uzročnika<sup>24,31</sup>. Nadalje, kod bolesnika kod kojih etiologija izvanbolničke pneumonije ostane neotkrivena, antimikrobno liječenje empirijsko je tijekom cijele bolesti. Iako se empirijska primjena lijekova i kod ovih bolesnika temelji na određenim podacima koji su dostupni kao što je učestalost bakterijskih uzročnika izvanbolničkih pneumonija i njihova osjetljivost na antimikrobne lijekove na određenom području, te težini pneumonije, ipak bi od velike pomoći za kliničare bilo da znaju primjenjuju li adekvatnu terapiju ako mikrobiološke pretrage koje su indicirali ostanu negativne i ne otkriju uzročnika pneumonije. Prema dostupnoj literaturi do sada je provedeno samo jedno istraživanje u kojem je na temelju rezultata mikrobioloških pretraga utvrđeno da je kod 78,9 % (15/19) bolesnika s

izvanbolničkom pneumonijom empirijsko antimikrobno liječenje bilo adekvatno<sup>23</sup>. Ono je provedeno na malom broju ispitanika, i što je još važnije, u njemu su korištene samo konvencionalne mikrobiološke metode. Naše istraživanje prvo je u kojem je empirijsko antimikrobno liječenje kod bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom evaluirano na temelju istodobno provedenih konvencionalnih i molekularnih pretraga.

U ovom istraživanju empirijsko antimikrobno liječenje bilo je adekvatno kod 73,7 % bolesnika s utvrđenom etiologijom izvanbolničke pneumonije. Nešto niži postotak bolesnika sa adekvatnim liječenjem u našem istraživanju u odnosu na ranije spomenuto, vjerojatno je posljedica primjene većeg broja mikrobioloških metoda, uključujući i one molekularne, kojima je etiološki razjašnjen veći broj pneumonija nego li u navedenom istraživanju, pa je i broj onih neadekvatno liječenih bio nešto veći. Možemo zaključiti da je na temelju istodobno primjenjenih konvencionalnih i molekularnih mikrobioloških pretraga utvrđeno da je kod većine bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom, njih gotovo tri četvrtine, empirijsko antimikrobno liječenje adekvatno.

To istovremeno znači i to da je 26,3 % bolesnika, u slučaju kad mikrobiološki nalazi ne otkriju uzročnika, neadekvatno liječeno. Bakterijski uzročnici utvrđeni kod bolesnika s neadekvatnim empirijskim antimikrobnim liječenjem bili su *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *P. aeruginosa* i *Legionella* spp.

Pneumonija uzrokovana s *M. pneumoniae* obično je karakterizirana dobrim ishodom, čak i kod slučajeva bez adekvatnog antimikrobnog liječenja<sup>46</sup>. U prilog ovome govori i činjenica da u ovom istraživanju niti jedan od bolesnika s dokazanom *M. pneumoniae* nije podvrgnut bronhoskopskoj pretrazi. Za zaključiti je da je kod ovih bolesnika pneumonija, iako uz neadekvatno antimikrobno liječenje, uspješno regresirala, te stoga nije bilo potrebe za daljnjim invazivnim dijagnostičkim pretragama i dobivanjem uzorka BAL-a. Veći problem predstavljaju ostala tri bakterijska uzročnika – *C. pneumoniae*, jer može biti uzročnik i teških slučajeva pneumonija kao kod ranije opisanog ispitanika, *Legionella* spp. također kao uzročnik teških pneumonija, te *P. aeruginosa* kao uzročnik pneumonija u bolesnika s različitim rizičnim čimbenicima.

Možemo zaključiti da je kod većine bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom empirijsko antimikrobno liječenje adekvatno, ali da su mikrobiološke pretrage kod bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom unatoč tome neophodne. Osobito su važne one za otkrivanje atipičnih uzročnika koji su prevladavali u neadekvatno liječenih bolesnika.



## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju postavljenih ciljeva i hipoteza, te dobivenih rezultata zaključci ovog istraživanja su sljedeći:

1. Čak i uz istodobno napravljene konvencionalne i molekularne mikrobiološke metode, gotovo 50 % izvanbolničkih pneumonija ostaje etiološki nerazjašnjeno. Etiologija kod bolesnika s prethodno primjenjenim antimikrobnim lijekovima nije bila značajno rjeđe otkrivena, pa je i kod njih mikrobiološka obrada opravdana.
2. Utvrđivanje učestalosti bakterijskih uzročnika pokazalo je da:
  - Najčešći bakterijski uzročnik izvanbolničkih pneumonija je *S. pneumoniae*. Atipični bakterijski uzročnici utvrđeni su kod 16,3 % ispitanika, a na trećem mjestu po učestalosti nalazio se *H. influenzae*. Miješane infekcije, kod kojih je najčešća bila kombinacija *S. pneumoniae* i *H. influenzae*, bile su prisutne kod 8,8 % ispitanika.
  - Učestalost pojedinih bakterijskih uzročnika između ispitanika mlađih i starijih od 60 godina ne razlikuje se, pa empirijski primjenjeno antimikrobno liječenje, bez obzira na dob, obavezno mora djelovati na pneumokok.
  - *M. pneumoniae* može biti uzročnik izvanbolničkih pneumonija i kod starijih dobnih skupina.
  - Prevalencija *C. pneumoniae* IgG utvrđena je kod 62,0 % ispitanika i bila je statistički značajno veća kod bolesnika s KOPB-om, nego li kod bolesnika bez KOPB-a. Ulogu *C. pneumoniae* u KOPB-u još treba istraživati.

3. Usporedba rezultata konvencionalnih i molekularnih mikrobioloških metoda pokazala je da:

- Najbolja metoda za dijagnostiku izvanbolničke pneumonije uzrokovane sa *S. pneumoniae* je otkrivanje pneumokoknog antigena u urinu. Njome se može otkriti najveći broj slučajeva, čak i onda kada su sve ostale mikrobiološke pretrage negativne.
- Kultura sputuma statistički značajno je rjeđe pozitivna kod bolesnika kod kojih je prethodno primjenjeno antimikrobno liječenje. Preparat po Gramu i kultura sputuma u dijagnostici izvanbolničke pneumonije mogu biti korisni samo dobivanjem adekvatnog uzorka sputuma kod bolesnika koji prethodno nisu liječeni antimikrobnim lijekovima.
- Kultura BAL-a ima ograničenu vrijednost kod bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom koji su prethodno liječeni antimikrobnim lijekovima jer je bila pozitivna samo kod 31,6 % bronhoskopiranih ispitanika.
- PCR za *S. pneumoniae* na uzorcima seruma nije koristan u dijagnostici pneumokokne pneumonije. BAL PCR-om za *S. pneumoniae*, čak i ako je već primjenjeno antimikrobno liječenje, mogu se otkriti dodatni slučajevi pneumokokne pneumonije koje nije moguće dijagnosticirati konvencionalnim metodama.
- PCR za *M. pneumoniae* nema prednost pred serološkim pretragama, ali može biti koristan kod bolesnika kod koji ne stvaraju serološki odgovor kao što su osobe starije životne dobi i imunokompromitirani bolesnici uopće.
- Otkrivanje legionela antigena u urinu najkorisnija je metoda za dijagnostiku legioneloza. PCR na uzorcima sputuma i BAL-a nije omogućio dijagnozu dodatnih slučajeva legioneloze, pa ga treba evaluirati na drugim vrstama kliničkih uzoraka, kao što su uzorci seruma.

- Serologija je najprihvatljivija metoda za dijagnostiku *C. pneumoniae*. PCR treba dalje evaluirati, osobito na uzorcima BAL-a, i standardizirati ili pak tražiti druge brze metode za dijagnostiku ovog bakterijskog uzročnika koji može uzrokovati i teške pneumonije.

4. Usporedba rezultata konvencionalnih i molekularnih metoda kod bolesnika s različitom težinom pneumonije pokazala je da:

- Težina pneumonije ne utječe na broj etiološki razjašnjenih izvanbolničkih pneumonija, učestalost pojedinih bakterijskih uzročnika, kao niti na rezultate konvencionalnih mikrobioloških metoda.
- Utjecaj težine pneumonije na molekularne metode bilo je moguće utvrditi samo u odnosu na PCR za *S. pneumoniae* na uzorcima BAL-a, pri čemu je odbačena hipoteza postavljena na početku istraživanja. Težina pneumonije ne utječe na rezultate ove molekularne pretrage i nije čimbenik koji određuje da li uključiti ovu pretragu u mikrobiološku obradu bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom. Ipak, kod bolesnika kod kojih je invazivna bronhoskopska pretraga opravdana, ova molekularna metoda može doprinijeti postavljenju etiološke dijagnoze, a na taj način i adekvatnom liječenju bolesnika.

5. Evaluacija empirijskog antimikrobnog liječenja u odnosu na rezultate konvencionalnih i molekularnih mikrobioloških metoda pokazala je da:

- Evaluacijom empirijskog antimikrobnog liječenja prihvaćena je hipoteza postavljena na početku istraživanja. Istodobno primjenjenim konvencionalnim i molekularnim metodama uspjelo se znanstveno dokazati da je kod većine bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom, njih gotovo tri četvrtine (73,7 %), empirijsko antimikrobno liječenje adekvatno. Ovo je prvo takvo provedeno istraživanje.

- To istovremeno znači i da je 26,3 % bolesnika, u slučaju kad mikrobiološki nalazi ne otkriju uzročnika, neadekvatno liječeno. Zbog toga su postojeće mikrobiološke pretrage, kao i razvoj novih metoda, kod bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom još uvijek neophodne i opravdane, osobito one za otkrivanje atipičnih uzročnika koji prevladavaju kod neadekvatno liječenih bolesnika, a neki od njih kao *C. pneumoniae* i *Legionella* spp mogu uzrokovati i teške pneumonije.

## 7. SAŽETAK

Etiologija izvanbolničkih pneumonija se uz primjenu konvencionalnih mikrobioloških metoda utvrdi kod 50-75 % bolesnika, a kod onih s neutvrđenom etiologijom antimikrobno liječenje ostaje empirijsko i kasnije tijekom bolesti. Zbog toga se sve češće nastoje primijeniti molekularne metode, prije svega lančana reakcija polimerazom (PCR, prema engl. polymerase chain reaction). Do sada provedenim istraživanjima nije utvrđeno kod kojih bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom bi izvođenje ovih skupih i tehnički zahtjevnih dijagnostičkih metoda bilo opravdano u svakodnevnom radu. Cilj istraživanja bio je utvrditi utječe li težina pneumonije na rezultate molekularnih metoda i evaluirati empirijski primjenjeno antimikrobno liječenje u odnosu na rezultate konvencionalnih i molekularnih mikrobioloških pretraga.

U ovo prospektivno istraživanje uključeno je 80 ispitanika s izvanbolničkom pneumonijom kod kojih su napravljene konvencionalne i molekularne mikrobiološke pretrage za *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae* i *Legionella* species, te određena težina pneumonije pomoću indeksa PSI (prema engl. Pneumonia severity index).

Etiologija izvanbolničkih pneumonija utvrđena je kod 52,5 % ispitanika. Najčešći bakterijski uzročnik bio je *S. pneumoniae* (31,3 %). Atipični bakterijski uzročnici utvrđeni su kod 16,3 %, a miješane infekcije kod 8,8 % ispitanika. Učestalost pojedinih bakterijskih uzročnika nije se statistički značajno razlikovala s obzirom na dob ispitanika, a *M. pneumoniae* bila je uzročnik bolesti i u starijoj dobi. Prevalencija *C. pneumoniae* IgG bila je češća kod bolesnika s kroničnom opstruktivnom plućnom bolesti (KOPB). Najveći broj pneumokoknih infekcija (64 %) otkriven je pneumokoknim antigenom u urinu. Kulture sputuma bile su statistički značajno rjeđe pozitivne kod bolesnika s prethodno primjenjenim antimikrobnim liječenjem (22,2 % vs 72,2 %;  $p=0,003$ ). PCR za *S. pneumoniae* bio je pozitivan u uzorku bronhoalveolarnog ispirka (BAL) kod tri, a PCR za *M. pneumoniae* u uzorku sputuma kod jednog ispitanika. Broj etiološki razjašnjenih pneumonija, učestalost pojedinih bakterijskih uzročnika i rezultati konvencionalnih

mikrobioloških metoda nisu se razlikovali u odnosu na težinu pneumonije. Rezultati BAL PCR-a za *S. pneumoniae* nisu se statistički značajno razlikovali između bolesnika PSI skupine I-III i IV-V (16,7 % vs 15,4 %;  $p=0,422$ ). Empirijsko antimikrobno liječenje evaluirano na temelju rezultata konvencionalnih i molekularnih mikrobioloških metoda bilo je adekvatno kod 73,7 % (28/38) ispitanika.

Težina pneumonije ne utječe na rezultate PCR-a za *S. pneumoniae* u uzorcima BAL-a, te stoga nije čimbenik koji određuje da li ovu molekularnu pretragu uključiti u mikrobiološku obradu bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom. Ipak, kod bolesnika kod kojih je invazivna bronhoskopska pretraga opravdana, BAL PCR-om za *S. pneumoniae* mogu se otkriti dodatni slučajevi pneumokokne pneumonije koje nije moguće dijagnosticirati konvencionalnim metodama. Ovo je prvo istraživanje u kojem je znanstveno dokazano da je kod većine bolesnika s izvanbolničkom pneumonijom, njih gotovo tri četvrtine, empirijsko antimikrobno liječenje adekvatno.

## 8. SUMMARY

When conventional methods applied, etiology of community-acquired pneumonia (CAP) can be determined in 50-75 % of patients, and in those with unknown etiology antimicrobial treatment remains empirical. Polymerase chain reaction (PCR) is extensively being evaluated for diagnostic purpose. However, it is still not determined in which patients with CAP this expensive and technically demanding method should be performed in a routine practice. The aim of study was to determine if results of molecular methods are influenced by the severity of pneumonia and to evaluate empirical antimicrobial treatment with regard to results of conventional and molecular methods.

This prospective study included 80 patients with CAP in which conventional and molecular microbiological methods for *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* and *Legionella* species were performed, and the severity of pneumonia was determined with Pneumonia severity index (PSI).

Etiology of CAP was determined in 52, 5 % of patients. The most common bacterial pathogen was *S. pneumoniae* (31, 3 %). Atypical bacterial pathogens were determined in 16, 3 %, and mixed infections in 8, 8 % of patients. The frequency of bacterial pathogens was not significantly different according to patients' age, and *M. pneumoniae* was also a cause of pneumonia in elderly patients. The prevalence of *C. pneumoniae* IgG was higher in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The majority of pneumococcal infections (64 %) were determined with pneumococcal urinary antigen. Sputum cultures were significantly less positive in patients with previously administered antimicrobial treatment (22,2 % vs 72,2 %;  $p=0,003$ ). PCR for *S. pneumoniae* was positive in bronchoalveolar lavage fluid in three, and PCR for *M. pneumoniae* in sputum specimen in one patient. The number of etiologically diagnosed pneumonias, the frequency of bacterial pathogens and results of conventional microbiological methods were not different according to severity of pneumonia. BAL PCR results for *S. pneumoniae* were not significantly different between patients in PSI class I-III

and IV-V (16,7 % vs 15,4 %;  $p=0,422$ ). Empirical antimicrobial treatment evaluated according to results of conventional and molecular methods was adequate in 73, 7 % (28/38) of patients.

Diagnostic yield of BAL PCR for *S. pneumoniae* is not influenced by the severity of pneumonia. Therefore, severity of disease is not a factor that determines whether BAL PCR should be included in microbiological work-up in patients with CAP. However, PCR applied to BAL specimens can give an additional diagnosis of pneumococcal pneumonia in patients in whom an invasive procedure for obtaining specimen is justified. This is the first study which provided scientific proof that empirical antimicrobial treatment in majority of patients with CAP, almost three quarter of them, is adequate.



## LITERATURA

1. Bartlett JG, Dowell SF, Mandell LA, File TM, Musher DM, Fine MJ. Practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 347-82.
2. Woodhead MA, Macfarlane JT, McCracken JS, Rose DH, Finch RG. Prospective study of the aetiology and outcome of pneumonia in the community. *Lancet* 1987; 1 (8534): 671-4.
3. Bohte R, van Furth R, van der Broek PJ. Aetiology of community-acquired pneumonia: a prospective study among adults requiring admission to hospital. *Thorax* 1995; 50 (5): 543-7.
4. Luna CM, Famiglietti A, Absi R, Videla AJ, Nogueira FJ, Fuenzalida AD, Gene RJ. Community-acquired pneumonia. Etiology, epidemiology, and outcome at a teaching hospital in Argentina. *Chest* 2000; 118: 1344-54.
5. Ishida T, Hashimoto T, Arita M, Ito I, Osawa M. Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized patients. A 3-year prospective study in Japan. *Chest* 1998; 114(6): 1588-93.
6. Apisarnthanarak A, Mundy LM. Etiology of community-acquired pneumonia. *Clin Chest Med* 2005; 26: 47-55.
7. Blasi F. The pathogenesis of community-acquired pneumonia. *Eur Respir Rev* 2004; 13: 80-84.
8. Woodhead M. Community-acquired pneumonia guidelines – an international comparison: a view from Europe. *Chest* 1998; 113: 183S-187S.
9. Lode HM. Managing community-acquired pneumonia: A European perspective. *Resp Med* 2007; 101: 1864-1873.
10. Allewelt M, Steinhoff D, Rahlwes M, Vogel-Hartmann H, Hoffken G, Schaberg T, Lode H. Changes in the spectrum of the causative agents of community-acquired

- pneumonias (1982-1992). Dtsch Med Wochenschr 1997; 122: 1027-32.
11. File TM Jr, Tan JS, Plouffe JF. The role of atypical pathogens: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Legionella pneumophila* in respiratory infection. Infect Dis Clin North Am 1998; 12 (3): 59-92.
  12. Marrie TJ, Peeling RW, Fine MJ, Singer DE, Coley C, Kapoor WN. Ambulatory patients with community-acquired pneumonia: the frequency of atypical agents and clinical course. Am J Med 1996; 101(5): 508-15.
  13. Fang GD, Fine M, Orloff J, Arisumi D, Yu VL, Kapoor W, Grayston JT, Wang SP, Kohler R, Muder RR. New and emerging etiologies for community-acquired pneumonia with implications for therapy. A prospective multicenter study of 359 cases. Medicine 1990; 69(5): 307-16.
  14. Almirall J, Morato I, Riera F, Verdaguer A, Priu R, Coll P, Vidal J, Murgui L, Vallis , Catalan F. Incidence of community-acquired pneumonia and *Chlamydia pneumoniae* infection: a prospective multicentre study. Eur Respir J 1993; 6(1): 14-18.
  15. Almirall J, Bolibar I, Vidal J, Sauca G, Coll P, Niklasson B, Bartolome M, Balanzo X. Epidemiology of community-acquired pneumonia in adults: a population based study. Eur Respir J 2000; 15: 757-63.
  16. Jokinen C, Heiskanen L, Juvonen H, Kallinen S, Kleemola M, Koskela M, Leinonen M, Rönneberg PR, Saikku P, Sten M, Tarkiainen A, Tukiainen H, Pyörälä K, Mäkelä PH. Microbial etiology of community-acquired pneumonia in the adult population of 4 municipalities in Eastern Finland. Clin Infect Dis 2001; 32: 1141-54.
  17. Almirall J, Boixeda R, Bolibar I, Bassa J, Sauca G, Vidal J, Serra-Prat M, Balanzo X. Differences in the etiology of community-acquired pneumonia according to site of care: A population-based study. Resp Med 2007; 101: 2168-75.
  18. Lim WS, Macfarlane JT, Boswell TCJ, Harrison TG, Rose D, Leinonen M, Saikku P. Study of community acquired pneumonia aetiology (SCAPA) in adults admitted to hospital: implications for management guidelines. Thorax

2001; 56: 296-301.

19. Sopena N, Sabria M, Pedro-Botet ML, Manterola JM, Matas L, Dominguez J, Modol JM, Tudela P, Ausina V, Foz M. Prospective study of community-acquired pneumonia of bacterial etiology in adults. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 852-58.
20. Fernandez Alvarez R, Suarez Toste I, Rubinos Cuadrado G, Torres Lana A, Gullon Blanco JA, Jimenez A, Gonzalez Martin I. Community-acquired pneumonia: aetiologic changes in a limited geographic area. An 11-year prospective study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 495-99.
21. de Roux A, Ewig S, Garcia E, Marcos MA, Mensa J, Lode H, Torres A. Mixed community-acquired pneumonia in hospitalised patients. *Eur Respir J* 2006; 27(4): 795-800.
22. Ruiz-Gonzalez A, Falguera M, Nogues A, Rubio-Caballero M. Is *Streptococcus pneumoniae* the leading cause of pneumonia of unknown etiology? A microbiologic study of lung aspirates in consecutive patients with community-acquired pneumonia. *Am J Med* 1999; 106(4): 385-90.
23. Ewig S, Bauer T, Hasper E, Marklein G, Kubini R, Lüderitz B. Value of routine microbiological investigation in community-acquired pneumonia treated in tertiary care center. *Respiration* 1996; 63(3): 164-9.
24. Ewig S, Schlochtermeyer M, Göke N, Niederman MS. Applying sputum as a diagnostic tool in pneumonia. Limited yield, minimal impact on treatment decisions. *Chest* 2002; 121: 1486-92.
25. Theerthakarai R, El-Halees W, Ismail M, Solis RA, Khan MA. Nonvalue of the initial microbiological studies in the management of nonsevere community-acquired pneumonia. *Chest* 2001; 119: 181-4.
26. Sanyal S, Smith PR, Saha AC, Gupta S, Berkowitz L, Homel P. Initial microbiologic studies did not affect outcome in adults hospitalized with community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 346-8.

27. Roson B, Carratala J, Verdaguer R, Dorca J, Manresa F, Gudiol F. Prospective study of the usefulness of sputum Gram stain in the initial approach to community-acquired pneumonia requiring hospitalization. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 869-74.
28. Red WW, Byrd GS, Gates RH Jr, Howard RS, Weaver MJ. Sputum Gram stain in community-acquired pneumococcal pneumonia: a meta-analysis. *West J Med* 1996; 165: 197-204.
29. Musher DM, Montoya R, Wanahita A. Diagnostic value of microscopic examination of gram-stained sputum and sputum cultures in patients with bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 165-9.
30. Campbell SG, Marrie TJ, Anstey R, Dickinson G, Ackroyd-Stolarz S. The contribution of blood cultures to clinical management of adult patients admitted to the hospital with community-acquired pneumonia. *Chest* 2003; 123: 1142-50.
31. Waterer GW, Jennings SG, Wunderink RG. The impact of blood cultures on antibiotic therapy in pneumococcal pneumonia. *Chest* 1999; 116: 1278-81.
32. Campbell SG, Marrie TJ, Anstey R, Ackroyd-Stolarz S, Dickinson G. Utility of blood cultures in the management of adults with community-acquired pneumonia discharged from the emergency department. *Emerg Med J* 2003; 20: 520-23.
33. Chalasani NP, Valdecanas MAL, Gopal AK, McGowan JE, Jurado RL. Clinical utility of blood cultures in adult patients with community-acquired pneumonia without defined underlying risks. *Chest* 1995; 108: 932-36.
34. Hohenthal U, Sipilä J, Vainionpää R, Meurman O, Rantakokko-Jalava K, Nikoskelainen J, Kotilainen P. Diagnostic value of bronchoalveolar lavage in community-acquired pneumonia in a routine setting: A study on patients treated in a Finnish University Hospital. *Scand J Infect Dis* 2004; 36: 198-203.
35. Ramirez P, Valencia M, Torres A. Bronchoalveolar lavage to diagnose respiratory infections. *Semin Respir Crit Care Med* 2007; 28: 525-33.
36. Smith MD, Derrington P, Evans R, Creek M, Morris R, Dance DA, Cartwright K. Rapid diagnosis of bacteremic pneumococcal infections in adults by using the Binax

NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test: a prospective, controlled evaluation. *J Clin Microbiol* 2003; 41(7): 2810-3.

37. Coonrod JD. Urine as an antigen reservoir for diagnosis of infectious diseases. *Am J Med* 1983; 75(1B): 85-92.
38. Gutierrez F, Masia M, Rodriguez JC, Ayelo A, Soldan B, Cebrian L, Mirete C, Royo G, Hidalgo AM. Evaluation of the immunochromatographic Binax NOW assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen in a prospective study of community-acquired pneumonia in Spain. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 286-92.
39. Murdoch DR, Laing RTR, Mills GD, Karalus NC, Town GI, Mirrett S, Reller BL. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in urine samples from adults with community-acquired pneumonia. *J Clin Microbiol* 2001; 39 (10): 3495-8.
40. Dominguez J, Gali N, Blanco S, Pedroso P, Prat C, Matas L, Ausina V. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen by a rapid immunochromatographic assay in urine samples. *Chest* 2001; 119 243-9.
41. Barker CE, Sillis M, Wreghitt TG. Evaluation of Serodia Myco II particle agglutination test for detecting *Mycoplasma pneumoniae* antibody: comparison with  $\mu$ -capture ELISA and indirect immunofluorescence. *J Clin Pathol* 1990; 43: 163-5.
42. Lieberman D, Schlaeffer F, Horowitz S, Porath A. *Mycoplasma pneumoniae* community-acquired pneumonia: a review of 101 hospitalized adult patients. *Respiration* 1996; 63(5): 261-6.
43. Foy HM, Kenny GE, Sefi R, Ochs HD, Allan ID. Second attacks of pneumonia due to *Mycoplasma pneumoniae*. *J Infect Dis* 1977; 135(4): 673-7.
44. Marrie TJ. *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia requiring hospitalization, with emphasis on infection in the elderly. *Arch Intern Med* 1993; 153(4): 488-94.
45. Sillis M. The limitations of IgM assays in the serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *J Med Microbiol* 1990; 33(4): 253-8.
46. Daxboeck F, Krause R, Wenisch C. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma*

*pneumoniae* infection. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 263-73.

47. Watkins-Riedel T, Stanek G, Daxboeck F. Comparison of SeroMP IgA with four other commercial assays for serodiagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Diagn Microbiol Infect* 2001; 40: 21-5.
48. Dowell SF, Peeling RW, Boman J, Carlone GM, Fields BS, Guarner J, Hammerschlag MR, Jackson LA, Kuo CC, Maass M, Messmer TO, Talkington DF, Tondella ML, Zaki SR, *C. pneumoniae* Workshop participants. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: Recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory for Disease Control (Canada). *Clin Infect Dis* 2001; 33: 492-503.
49. Dominguez J, Gali N, Matas L, Pedroso P, Hernandez A, Padilla E, Ausina V. Evaluation of a rapid immunochromatographic assay for the detection of *Legionella* antigen in urine samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 896-98.
50. Yzerman EP, den Boer JW, Lettinga KD, Schellekens J, Dankert J, Peeters M. Sensitivity of three urinary antigen tests associated with clinical severity in a large outbreak of Legionnaires' disease in The Netherlands. *J Clin Microbiol* 2002; 40(9): 3232-6.
51. Murdoch DR. Diagnosis of *Legionella* infection. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 64-9
52. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, Dowell SF, File TM, Musher DM, Niederman MS, Torres A, Whitney CG. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 2007; 44: S27-72.
53. Macfarlane JT, Boldy D. 2004 update of BTS pneumonia guidelines: what's new? *Thorax* 2004; 59: 364-6.
54. Woodhead M, Blasi F, Ewig S, Huchon G, Ieven M, Ortquist A, Schaberg T, Torres A, van der Heijden G, Verheij TJM. Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections. *Eur Respir J* 2005; 26: 1138-80.

55. Sertić J, Stavljenić-Rukavina A. Molekularna DNA analitika; nasljedne bolesti. U: Šerman D, Stavljenić-Rukavina A, Setrić J, Bulić-Jakuš F. Metode molekularne biologije u medicini, 1. izd. Zagreb:Medicinska naklada; 2002: 115-125.
56. Saunders NA, Clewley JP. DNA Amplification. General Concepts and Methods. U: Woodford N, Johnson AP. Molecular bacteriology: Protocols and Clinical Applications, 1. izd. New Jersey: Humana Press; 1998: 63-82.
57. Roche Applied Science. Real-Time PCR Systems. [ <http://www.roche-applied-science.com> ]
58. Ieven M, Goossens H. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 242-256.
59. Murdoch DR. Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections. AMPIS 2004; 112: 713-727.
60. Murdoch DR. Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pneumonia. Clin Infect Dis 2003; 36: 1162-1170.
61. Walker JA, Allen RL, Falmagne P, Johnson MK, Boulnois GJ. Molecular cloning, characterization, and complete nucleotide sequence of the gene for pneumolysin, the sulfhydryl-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. Infection and Immunity 1987; 55(5): 1184-1189.
62. Mims C, Nash A, Stephen J. Mechanisms of cell and tissue damage. U: Mims C, Nash A, Stephen J. Mims' pathogenesis of infectious disease, 5. izd. London: Academic Press; 2001: 216-306.
63. Gillespie SH, Ullman C, Smith MD, Emery V. Detection of *Streptococcus pneumoniae* in sputum samples by PCR. J Clin Microbiol 1994; 32(5): 1308-11.
64. Rudolph KM, Parkinson AJ, Black CM, Mayer LW. Evaluation of polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia. J Clin Microbiol 1993; 31(10): 2661-6.
65. Zhang Y, Isaacman DJ, Wadowsky RM, Rydquist-White J, Post JC, Ehrlich GD.

- Detection of *Streptococcus pneumoniae* in whole blood by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33(3): 596-601.
66. Dagan R, Shriker O, Hazan I, Leibovitz E, Greenberg D, Schlaeffer F, Levy R. Prospective study to determine clinical relevance of detection of pneumococcal DNA in sera of children by PCR. *J Clin Microbiol* 1998; 36(3): 669-73.
67. Salo P, Ortvist A, Leinonen M. Diagnosis of bacteremic pneumococcal pneumonia by amplification of pneumolysin gene fragment in serum. *J Infect Dis* 1995; 171(2): 479-82.
68. Toikka P, Nikkari S, Ruuskanen O, Leinonen M, Mertsola J. Pneumolysin PCR-based diagnosis of invasive pneumococcal infection in children. *J Clin Microbiol* 1999; 37(3): 633-7.
69. Hassan-King M, Baldeh I, Secka O, Falade A, Greenwood B. Detection of *Streptococcus pneumoniae* in blood cultures by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32(7): 1721-4.
70. Menendez R, Cordoba J, de la Cuarda P, Cremades MJ, Lopez-Hontagas JL, Salavert M, Gobernado M. Value of the polymerase chain reaction assay in noninvasive respiratory samples for diagnosis of community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1868-73.
71. Lorente MLL, Falguera M, Nogues A, Ruiz Gonzalez A, Merino MT, Rubio Caballero M. Diagnosis of pneumococcal pneumonia by polymerase chain reaction (PCR) in whole blood: a prospective clinical study. *Thorax* 2000; 55: 133-7.
72. Dominguez J, Gali N, Matas L, Pedroso P, Blanco S, Gimenez M, Prat C, Sopena N, Sabria M. PCR detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in serum samples from pneumococcal pneumonia diagnosis. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7(3): 164-6.
73. Murdoch DR, Anderson TP, Beynon KA, Chua A, Fleming AM, Laing RTR, Town GI, Mills GD, Chambers ST, Jennings LC. Evaluation of a PCR assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in respiratory and nonrespiratory samples from adults with community-acquired pneumonia. *J Clin Microbiol* 2003; 41(1): 63-6.



74. Yang S, Lin S, Khalil A, Gaydos C, Nuemberger E, Juan G, Hardick J, Bartlett JG, Auwaerter PG, Rothman RE. Quantitative PCR assay using sputum samples for rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia in adult emergency department patients. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7): 3221-6.
75. Greiner O, Day PJR, Bosshard PP, Imeri F, Altwegg M, Nadal D. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal secretions by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39(9): 3129-34.
76. McAvin J, Reilly PA, Roudabush RM, Barnes WJ, Salmen A, Jackson GW, Beninga KK, Astorga A, McCleskey FK, Huff WB, Niemeyer D, Lohman KL. Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39(10): 3446-51.
77. Wheeler J, Freeman R, Steward M, Henderson K, Lee MJ, Pigott NH, Eltringham GJ, Galloway A. Detection of pneumolysin in sputum. *J Med Microbiol* 1999; 48(9): 863-6.
78. Strålin K, Korsgaard J, Olcen P. Evaluation of a multiplex PCR for bacterial pathogens applied to bronchoalveolar lavage. *Eur Respir J* 2006; 28: 568-75.
79. Blackmore TK, Reznikov M, Gordon DL. Clinical utility of the polymerase chain reaction to diagnose *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Pathology* 1995; 27(2): 177-81.
80. Abele-Horn M, Busch U, Nitschko H, Jacobs E, Bax R, Pfaff F, Schaffer B, Heesemann J. Molecular approaches to diagnosis of pulmonary diseases due to *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1998; 36(2): 548-51.
81. Waring AL, Halse TA, Csiza CK, Carlyn CJ, Musser KA, Limberger RJ. Development of a genomics-based PCR assay for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in a large outbreak in New York State. *J Clin Microbiol* 2001; 39(4): 1385-90.
82. Dorigo-Zetsma JW, Verkooyen RP, van Helden HP, van der Nat H, van den Bosch JM. Molecular detection of *Mycoplasma pneumoniae* in adults with community-acquired pneumonia requiring hospitalization. *J Clin Microbiol* 2001; 39(3): 1184-6.

83. Rätty R, Rönkkö E, Kleemola M. Sample type is crucial to the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia by PCR. J Med Microbiol 2005; 54: 287-91.
84. Reznikov M, Blackmore TK, Finlay-Jones JJ, Gordon DL. Comparison of nasopharyngeal aspirates and throat swab specimens in a polymerase chain reaction-based test for *Mycoplasma pneumoniae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995; 14(1): 58-61.
85. Dorigo-Zetsma JW, Zaat SA, Wertheim-van Dillen PM, Spanjaard L, Rijntjes J, van Waveren G, Jensen JS, Angulo AF, Dankert J. Comparison of PCR, culture, and serological tests for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infection in children. J Clin Microbiol 1999; 37(1): 14-7.
86. Waris ME, Toikka P, Saarinen T et al. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children. J Clin Microbiol 1998; 36: 3155-9.
87. Skakni L, Sardet A, Just J et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples from pediatric patients by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30: 2638-43.
88. Tjhie JHT, van Kuppefeld FJM, Roosendaal R, Melchers WJ, Gordin R, MacLaren DM, Walboomers JM, Meijer CJ, van den Brule AJ. Direct PCR enables detection of *Mycoplasma pneumoniae* in patients with respiratory tract infections. J Clin Microbiol 1994; 32: 11-16.
89. Razin S. DNA probes and PCR in diagnosis of mycoplasma infections. Mol Cell Probes 1994; 8(6): 497-511.
90. Campbell LA, Melgosa MP, Hamilton DJ, Kuo CC, Grayston JT. Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30(2): 434-0.
91. Gaydos CA, Quinn TC, Eiden JJ. Identification of *Chlamydia pneumoniae* by DNA amplification of the 16S rRNA gene. J Clin Microbiol 1992; 30(4): 796-800.
92. Tong CYW, Sillis M. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci* in sputum samples by PCR. J Clin Path 1993; 46: 313-7.

93. Madico G, Quinn TC, Boman J, Gaydos CA. Touchdown enzyme time release-PCR for detection and identification of *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae*, and *C. psittaci* using the 16S and 16S-23S spacer rRNA genes. *J Clin Microbiol* 2000; 38(3): 1085-93.
94. Kuoppa Z, Boman J, Scott L, Kumlin U, Eriksson I, Allard A. Quantitative detection of respiratory *Chlamydia pneumoniae* infection by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 2273-4.
95. Reischl U, Lehn N, Simnacher U, Marre R, Essig A. Rapid and standardized detection of *Chlamydia pneumoniae* using Lightcycler real-time fluorescence PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22(1): 54-57.
96. Hardick J, Maldeis N, Theodore M, Wood BJ, Yang S, Lin S, Quinn T, Gaydos C. Real-time PCR for *Chlamydia pneumoniae* utilizing the Roche Lightcycler and a 16S rRNA gene target.
97. Tondella MLC, Talkington DF, Holloway BP, Dowell SF, Cowley K, Soriano-Gabarro M, Elkind MS, Fields BS. Development and evaluation of real-time PCR-based fluorescence assays for detection of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2002; 575-83.
98. Apfalter P, Barousch W, Nehr M, Makristathis A, Willinger B, Rotter M, Hirschl A. Comparison of a new quantitative *ompA*-based real-time PCR TaqMan assay for detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in respiratory specimens with four conventional PCR assays. *J Clin Microbiol* 2003; 592-600.
99. Chernesky M, Smieja M, Schachter J, Summersgill J, Schindler L, Solomon N, et al. Comparison of an industry-derived LCx *Chlamydia pneumoniae* PCR research kit to in-house assays performed in five laboratories. *J Clin Microbiol* 2002; 2357-2362.
100. Ginevra C, Barranger C, Ros A, Mory O, Stephen J.-L., Freymuth F, Joannes M, Pozzetto B, Grattard F. Development and evaluation of Chlamylege, a new commercial test allowing simultaneous detection and identification of *Legionella*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Mycoplasma pneumoniae* in clinical respiratory

- specimens by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7): 3247-54.
101. Kuo CC, Shor A, Campbell LA, Fukushi H, Patton DL, Grayston JT. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *J Infect Dis* 1993; 167: 841-9.
102. Campbell LA, O'Brien ER, Cappuccio AL, et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* TWAR in human coronary atherectomy tissues. *J Infect Dis* 1995; 172: 585-8.
103. Grayston JT, Kuo CC, Coulson AS, et al. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation* 1995; 92: 3397-400.
104. Jackson LA, Campbell LA, Kuo CC, Rodriguez DI, Lee A, Grayston JT. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from a carotid endarterectomy specimen. *J Infect Dis* 1997; 176: 292-5.
105. Naidu BR, Ngeow YF, Kannan P, et al. Evidence of *Chlamydia pneumoniae* infection obtained by the polymerase chain reaction (PCR) in patients with acute myocardial infarction and coronary heart disease. *J Infect* 1997; 35: 199-200.
106. Boman J, Soderberg S, Forsberg J, et al. High prevalence of *Chlamydia pneumoniae* DNA in peripheral blood mononuclear cells in patients with cardiovascular disease and middle-aged blood donors. *J Infect Dis* 1998; 178: 274-7.
107. Boman J, Allard A, Persson K, Lundborg M, Juto P, Wadell G. Rapid diagnosis of respiratory *Chlamydia pneumoniae* infection by nested touchdown polymerase chain reaction compared with culture and antigen detection by EIA. *J Infect Dis* 1997; 175:1523-6.
108. Boman J, Gaydos C, Quinn T. Molecular diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (12): 3791-99.
109. Dalhoff K, Maass M. *Chlamydia pneumoniae* pneumonia in hospitalized patients. Clinical characteristics and diagnostic value of polymerase chain reaction detection in BAL. *Chest* 1996; 110: 351-6.

110. Jaulhac B, Nowicki M, Bornstein N, Meunier O, Prevost G, Piemont Y, et al.  
Detection of *Legionella* spp. in bronchoalveolar lavage fluids by DNA amplification.  
J Clin Microbiol 1992; 30: 920-4.
111. Murdoch DR, Walford EJ, Jennings LC, Light GJ, Schousboe MI, Chereshsky AY,  
et al. Use of polymerase chain reaction to detect *Legionella* DNA in urine and  
serum samples from patients with pneumonia. Clin Infect Dis 1996; 23: 475-80.
- 112 Helbig JH, Engelstädter T, Maiwald M, Uldum S, Witzleb W, Lück PC. Diagnostic  
relevance of the detection of *Legionella* DNA in urine samples by the polymerase  
chain reaction. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18: 716-22.
113. Ramirez JA, Ahkee S, Tolentino A, Miller RD, Summersgill JT. Diagnosis of  
*Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, or *Chlamydia pneumoniae*  
lower respiratory infection using the polymerase chain reaction on a single throat  
swab specimen. Diagn Microbiol Infect Dis; 24: 7-14.
114. Ivičević A. Pristup liječenju bolesnika s vanbolničkom pneumonijom. Knjiga  
sažetaka. 3. Kongres hrvatskih pulmologa; 2002. listopad; Opatija, Hrvatska.
115. Kuzman I. Akutne respiratorne infekcije: uvijek aktualne bolesti. Knjiga sažetaka.  
Respiratorne infekcije: epidemiološka i klinička slika, dijagnostika, terapija i  
prevencija. Poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I kategorije;  
2004 ožujak 29-31; Zagreb, Hrvatska.
116. Templeton KE, Scheltinga SA, van den Eeden CJFM, Graffelman AW, van den  
Broek PJ, Claas ECJ. Improved diagnosis of the etiology of community-acquired  
pneumonia with real-time polymerase chain reaction. Clin Infect Dis 2005; 41: 345-  
51.
117. Hohenthal U, Vainionpää R, Meurman O, Vahtera A, Katiskalahti T, Nikoskelainen  
J, Kotilainen P. Aetiological diagnosis of community acquired pneumonia: Utility of  
rapid microbiological methods with respect to diseases severity. Scand J Infect Dis  
2008; 40: 131-138.
118. Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, Hanusa BH, Weissfeld LA, Singer DE, Coley CM,

- Marrie TJ, Kapoor WN. A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. *N Engl J Med* 1997; 336: 243-50.
119. Roson B, Carratala J, Dorca J, Casanova A, Manresa F, Gudiol F. Etiology, reasons for hospitalization, risk classes, and outcomes of community-acquired pneumonia in patients hospitalized on the basis of conventional admission criteria. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 158-65.
120. Rello J, Quintana E, Ausina V, Net A, Prats G. A three-year study of severe community-acquired pneumonia with emphasis on outcome. *Chest* 1993; 103: 232-35.
121. Torres A, Serra-Batlles J, Ferrer A, Jimenez P, Celis R, Cobo E, Rodriguez-Roisin R. Severe community-acquired pneumonia. Epidemiology and prognostic factor. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 312-8.
122. Falcó V, Fernández de Sevilla T, Alegre J, Ferrer A, Martínez Vázquez JM. *Legionella pneumophila*. A cause of severe community-acquired pneumonia. *Chest* 1991; 100: 1007-11.
123. Koneman EW, Allen DS, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1997, str. 83, 122, 153, 577.
- 124 Sheppard CL, Harrison TG, Morris R, Hogan A, George RC. Autolysin-targeted LightCycler assay including internal process control for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in clinical samples. *J Med Microbiol* 2004; 53: 189-95.
125. Virolainen A, Salo P, Jero J, Karma P, Eskola J, Leinonen M. Comparison of PCR assay with bacterial culture for detecting *Streptococcus pneumoniae* in middle ear fluid of children with acute otitis media. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2667-70.
126. Gutiérrez F, Masiá M, Rodríguez JC, Mirete C, Soldán B, Padilla S, Hernández I, Royo G, Martín-Hidalgo A. Community-acquired pneumonia of mixed etiology: prevalence, clinical characteristics, and outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 377-83.

127. Lieberman D, Schlaeffer F, Boldur I, Lieberman D, Horowitz S, Friedman MG, Leiononen M, Horovitz O, Manor E, Porath A. Multiple pathogens in adult patients admitted with community-acquired pneumonia: a one year prospective study of 346 consecutive patients. *Thorax* 1996; 51: 179-84.
128. Martínez JA, Horcajada JP, Almela M, Marco F, Soriano A, García E, Marco MA, Torres A, Mensa J. Addition of a macrolide to beta-lactam-based empirical antibiotic regimen is associated with lower in-hospital mortality for patients with bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 396-98.
129. Waterer GW, Somes GW, Wunderink RG. Monotherapy may be suboptimal for severe bacteremic pneumococcal pneumonia. *Arch Intern Med* 2001; 161: 1837-42.
130. Cunha BA. Ambulatory community-acquired pneumonia: the predominance of atypical pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22: 579-583.
131. Bochud PY, Moser F, Erard P, Verdon F, Studer JP, Villard G, Cosendai A, Cotting M, Heim F, Tissot J, Strub Y, Pazeller M, Saghafi L, Wenger A, Germann D, Matter L, Bille J, Pfister L, Francioli P. Community-acquired pneumonia. A prospective outpatient study. *Medicine (Baltimore)* 2001; 80: 75-87.
132. Marrie TJ, Peeling RW, Reid T, De Carolis E, and the Canadian Community-Acquired Pneumonia Investigators. *Chlamydia* species as a cause of community-acquired pneumonia in Canada. *Eur Respir J* 2003; 21; 779-84.
133. McConnell CT, Plouffe JF, File TM, Mueller CF, Wong KH, Skelton SK, Marston BJ, Breiman RF. Radiographic appearance of *Chlamydia pneumoniae* (TWAR strain) respiratory infections CBPIS Study Group. Community-based Pneumonia Incidence Group.
134. Shemer-Avni Y, Lieberman D. *Chlamydia pneumoniae*-induced ciliostasis in ciliated bronchial epithelial cells. *J Infect Dis* 1995; 171: 1274-8.
135. Diederer BM, van der Valk PD, Kluytmans JA, Peeters MF, Hendrix R. The role of atypical respiratory pathogens in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2007; 30: 240-4.

136. Ruiz M, Ewig S, Angeles Marcos M, Martinez JA, Arancibia F, Mensa J, Torres A. Etiology of community-acquired pneumonia: Impact of age, comorbidity, and severity. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 397-405.
137. García-Vázquez E, Angeles Marcos M, Mensa J, de Roux A, Puig J, Font C, Francisco G, Torres A. Assessment of the usefulness of sputum culture for diagnosis of community-acquired pneumonia using the PORT predictive scoring system. *Arch Intern Med* 2004; 164: 1807-1811.
138. Miyashita N, Shimizu H, Ouchi K, Kawasaki K, Kawai Y, Obase Y, Kobashi Y, Oka M. Assessment of the usefulness of sputum Gram stain and culture for diagnosis of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. *Med Sci Monit* 2008; 14(4): CR171-176.
139. Korsgaard J, Rasmussen TR, Sommer T, Moller JK, Jensen JS, Kilian M. Intensified microbiological investigations in adult patients admitted to hospital with lower respiratory tract infections. *Respir Med* 2002; 96: 344-51.
140. Feinsilver SH, Fein AM, Niederman MS, Schultz DE, Faegenburg DH. Utility of fiberoptic bronchoscopy in nonresolving pneumonia. *Chest* 1990; 98: 1322-6.
141. Jiménez P, Saldias F, Meneses M, Silva ME, Wilson MG, Otth L. Diagnostic fiberoptic bronchoscopy in patients with community-acquired pneumonia. Comparison between bronchoalveolar lavage and telescoping plugged catheter cultures. *Chest* 1993; 103: 1023-7.
142. Dalhoff K, Braun J, Hollandt H, Lipp R, Wiessmann KJ, Marre R. Diagnostic value of bronchoalveolar lavage in patients with opportunistic and nonopportunistic bacterial pneumonia. *Infection* 1993; 21: 291-6.
143. Rasmussen TR, Korsgaard J, Moller JK, Sommer T, Kilian M. Quantitative culture of bronchoalveolar lavage fluid in community-acquired lower respiratory tract infections. *Respir Med* 2001; 95: 885-90.
144. Campbell SG, Marrie TJ, Anstey R, Ackroyd-Stolarz S, Dickonson G. Utility of blood cultures in the management of adults with community-acquired pneumonia



- discharged from the emergency department. *Emerg Med J* 2003; 20: 521-3.
145. Benenson RS, Kepner AM, Pyle DN 2nd, Cavanaugh S. Selective use of blood cultures in emergency department pneumonia patients. *J Emerg Med* 2007; 33: 1-8.
146. Waterer GW, Wunderink RG. The influence of the severity of community-acquired pneumonia on the usefulness of blood cultures. *Respir Med* 2001;95: 78-82.
147. Metersky ML, Ma A, Bratzler DW, Houck PM. Predicting bacteremia in patients with community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 342-7.
148. van der Eerden MM, Vlaspoolder F, de Graaff CS, Groot T, Jansen HM, Boersma WG. Value of intensive diagnostic microbiological investigation in low- and high-risk patients with community-acquired pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 241-9.
149. Lahti E, Mertsola J, Kontiokari T, Eerola E, Ruuskanen O, Jalava J. Pneumolysin polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia and empyema in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25:783-9.
150. Heininger A. PCR and blood culture for detection of *Escherichia coli* bacteremia in rats. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2479-82.
151. Wheeler H, Murphy OM, Kearns AM. PCR can add to detection of pneumococcal disease in pneumonic patients receiving antibiotics at admission. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3907.
152. Al-Soud WA, Rådström P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 485-93.
153. Al-Soud WA, Jönsson LJ, Rådström P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 345-50.
154. Chernesky MA, Jang D, Sellors J, Lunistra K, Chong S, Castriciano S, Mahony JB. Urinary inhibitors of polymerase chain reaction and ligase chain reaction and testing of multiple specimens may contribute to lower assay sensitivities for

diagnosing *Chlamydia trachomatis* infected women. *Mol Cell Probes* 1996; 11: 243-9.

155. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 3741-51.
156. Morata P, Quiapo-Ortuno MI, de Dios Colmenero J. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2443-6.
157. Kee C, Palladino S, Kay I, Pryce TM, Murray R, Rello J, Gallego M, Lujan M, Muñoz-Almagro C, Waterer GW. Feasibility of real-time polymerase chain reaction in whole blood to identify *Streptococcus pneumoniae* in patients with community-acquired pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 61: 72-5.
158. Vilibić-Čavlek T, Karlović-Martinković D, Mlinarić-Galinović G. Atipične pneumonije. U: Mlinarić-Galinović G, Katalinić-Janković V, Gjenero-Margan I, Vilibić-Čavlek T, ur. Respiratorne infekcije u starijoj dobi: epidemiološka i klinička slika, dijagnostika, terapija i prevencija. Zagreb: Medicinska naklada; 2005: 82-5.
159. Schneeberger PM, Dorigo-Zetsma JW, van der Zee A, van Bon M, van Opstal JL. Diagnosis of atypical pathogens in patients hospitalized with community-acquired respiratory infection. *Scand J Infect Dis* 2004; 36: 269-273.
160. Loens K, Ursi D, Goossens H, Ieven M. Molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4915-23.
161. von Baum H, Ewig S, Marre R, Suttorp N, Gonschior S, Welte T, Lück C. Community-acquired *Legionella* pneumonia: New insights from the German Competence Network for Community-Acquired Pneumonia. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 1356-64.
162. Lindsay DSJ, Abraham WH, Findlay W, Christie P, Johnston F, Edwards GFS. Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. *J Med Microbiol* 2004; 53: 183-7.

163. Strålin K. Usefulness of aetiological tests for guiding antibiotic therapy in community-acquired pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31: 3-11.
164. Diederens BMW, de Jong CMA, Kluytmans JAJW, van der Zee A, Peeters MF. Detection and quantification of *Legionella pneumophila* DNA in serum: case reports and review of the literature. *J Med Microbiol* 2006; 55: 639-42.
165. Diederens BM, de Jong CM, Marmouk F, Kluytmans JA, Peeters MF, van der Zee A. Evaluation of real-time PCR for the early detection of *Legionella pneumophila* DNA in serum samples. *J Med Microbiol* 2007; 56: 94-101.
166. Strålin K, Törnquist E, Staum Kalso M, Olcén P, Holmberg H. Etiologic diagnosis of adult bacterial pneumonia by culture and PCR applied to respiratory tract samples. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 643-5.
167. Hyman CL, Augenbraun MH, Roblin PM, Schachter J, Hammerschlag MR. Asymptomatic respiratory tract infection with *Chlamydia pneumoniae* TWAR. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2082-3.
168. Marton A, Károlzi A, Szalka A. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* antibodies in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11: 139-42.
168. Tuuminen T, Vario S, Ingman H, Weber T, Oksi J, Viljanen M. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* IgG and A antibodies in a healthy Finnish population as analyzed by quantitative enzyme immunoassays. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7: 734-8.
169. Park SJ, Lee YC, Rhee YK, Lee HB. Seroprevalence of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in stable asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 225-8.
170. Marton A, Károlyi A, Szalka A. Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* antibodies in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11: 139-42.
171. Weiss K, Tillotson GS. The controversy of combination vs monotherapy in the treatment of hospitalized community-acquired pneumonia. *Chest* 2005; 128: 940-6.
172. Loh LC, Quah SY, Khoo SK, Vijayasingham P, Thayaparan T. Addition of macrolide

in treating adult hospitalized community-acquired pneumonia. *Respirology* 2007; 10: 371-7.

173. Calzada SR, Tomas RM, Romero MJ, Moragón EM, Cataluña JJ, Villanueva RM. *Respir Med* 2007; 101: 1909-15.

174. Gleason PP, Meehan TP, Fine JM, Galusha DH, Fine MJ. Associations between initial antimicrobial therapy and medical outcomes for hospitalized elderly patients with pneumonia. *Arch Intern Med* 1999; 159: 2562-72.

175. Pineda L, El Solh AA. Severe community-acquired pneumonia: approach to therapy. *Expert Opin Pharmacother* 2007; 8: 593-606.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 8. svibnja 1971. godine u Sisku. Osnovnu školu i gimnaziju završila sam u Zagrebu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 1989. godine, a diplomirala sam 19. siječnja 1996. godine.

Pipravnički staž obavila sam u Kliničkoj bolnici Dubrava, a stručni ispit pri Ministarstvu zdravstva položila sam 26. ožujka 1998. godine.

Od 1. lipnja 1998. do 16. rujna 2001. godine radila sam na mjestu Product Manager-a za antibiotike u predstavništvu farmaceutske tvrtke Schering Plough.

Akademski stupanj magistra znanosti stekla sam 14. prosinca 2004. godine izradom i obranom rada pod naslovom "Kliničko značenje nalaza kvantitativnih i semikvantitativnih kultura *Ureaplasma urealyticum* i *Mycoplasma hominis* u uzorcima iz urogenitalnog sustava".

Specijalistički ispit iz medicinske mikrobiologije s parasitologijom položila sam 27. svibnja 2005. godine.

U studenom 2005.-te godine provela sam mjesec dana na edukaciji u Beču u laboratoriju za kliničku mikrobiologiju profesora M. Rottera (Allgemeines Krankenhaus der Stadt Wien – AKH).

Zaposlena sam u Klinici za plućne bolesti "Jordanovac" u Zagrebu kao specijalist medicinske mikrobiologije s parasitologijom.

**Osobni podaci:**

Ivana Mareković  
Barutanski breg 7  
10 000 Zagreb  
Tel: 01 23 10 915  
091 58 04 961  
E-mail: ivanamarekovic@yahoo.com