Kliničke i molekularno-epidemiološke karakteristike infekcije humanim metapneumovirusom u Hrvatskoj

Ljubin Sternak, Sunčanica

Doctoral thesis / Disertacija

2008

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:389728

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository







Središnja medicinska knjižnica

Ljubin Sternak, Sunčanica (2008) ***Kliničke i molekularno-epidemiološke karakteristike infekcije humanim metapneumovirusom u Hrvatskoj*****. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/568

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Sunčanica Ljubin Sternak

Kliničke i molekularno-epidemiološke karakteristike infekcije humanim metapneumovirusom u Hrvatskoj

DISERTACIJA

Zagreb, 2008.

Ovaj rad je izrađen u Odjelu za virologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo i Odsjeku za molekularnu biologiju Imunološkog zavoda d.o.o. u Zagrebu

Istraživanje je u potpunosti financirano iz sredstava projekta br. 0005 002 Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH pod naslovom: „Uzročnici bolesti koji se šire kapljičnim putem“ voditeljice prof. dr. sc. Gordane Mlinarić-Galinović

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Gordana Mlinarić-Galinović

ZAHVALA

Najveća hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Gordani Mlinarić-Galinović, na neprocijenjivim savjetima i nesebičnoj pomoći tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem dr. Guy Boivinu (Centre de Recherche en Infectologie, Ste-Foy - Quebec, Kanada) i dr. Ann R. Falsey (Infectious Diseases Unit, Rochester General Hospital, University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester, NY, SAD) što su mi za ovo istraživanje ustupili referalne HMPV sojeve i specifična monoklonska protutijela.

Zahvaljujem na podršci i požrtvovnom radu dr.sc. Maji Šantak i dr. sc. Dubravku Forčiću zaposlenicima Imunološkog zavoda, d.o.o.

Također se zahvaljujem prim. dr. Jasni Čepin-Bogović iz Klinke za dječje bolesti Zagreb i prim. mr. sc. Ani Baće iz Klinike za infektivne bolesti na pomoći pri obradi podataka kliničkog dijela studije.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Službe za mikrobiologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo na pomoći koju su mi pružali tijekom izrade ovoga rada: dipl. inž. Gordani Vojnović na pomoći pri uvođenju i tehničkoj izvedbi novih dijagnostičkih metoda, prof. dr. sc. Gordani Mlinarić-Galinović na dijagnostici respiratornih virusa, dr. med. Vladimiru Draženoviću na dijagnostici virusa influence, te dr. vet. med. Renati Sim, inž. med. lab. Nevenki Mihaličeк i lab. tehn. Mireli Josipović na tehničkoj pomoći pri izvođenju dijagnostičkih metoda.

Na kraju se želim zahvaliti svojoj obitelji: roditeljima na podršci, djeci na strpljivosti tijekom izrade ovog rada, i suprugu na pomoći u tehničkoj izvedbi tijekom pisanja disertacije.

SADRŽAJ

SADRŽAJ **1**

POPIS KRATICA **3**

1. UVOD **5**

1.1. Humani metapneumovirus **5**
1.1.1. Povijest i klasifikacija 5
1.1.2. Građa i umnažanje virusa 6
1.1.3. Tipovi i podtipovi humanog metapneumovirusa 10

1.2. Epidemiologija infekcije humanim metapneumovirusom **12**
1.2.1. Učestalost infekcije humanim metapneumovirusom u svijetu 12
1.2.2. Seroprevalencija na humani metapneumovirus 15
1.2.3. Molekularna epidemiologija infekcije humanim metapneumovirusom 16

1.3. Klinička slika infekcije humanim metapneumovirusom **18**

1.4. Patogeneza infekcije i imuni odgovor na humani metapneumovirus **21**

1.5. Mikrobiološka dijagnostika infekcije humanim metapneumovirusom **23**
1.5.1. Izravna virološka dijagnostika 23
1.5.1.1. Izolacija humanog metapneumovirusa 23
1.5.1.2. Molekularna dijagnostika 25
1.5.1.3. Detekcija antigena 25
1.5.2. Neizravna virološka dijagnostika 26

1.6. Liječenje i prevencija infekcije humanim metapneumovirusom **27**
1.6.1. Liječenje 27
1.6.2. Razvoj cjepiva 27

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE **29**

2.1. Ciljevi istraživanja i obrazloženje **29**

2.2. Hipoteze **30**

3. MATERIJALI I METODE **31**

3.1. Ispitanici i klinički materijal **31**
3.1.1. Ispitanici 31
3.1.2. Klinički materijal za dijagnostiku virusnih infekcija 31

3.2. Mikrobiološka dijagnostika infekcije humanim metapneumovirusom **32**
3.2.1. Molekularna dijagnostika 32
3.2.1.1. Izolacija virusne RNK 32
3.2.1.2. RT-PCR u stvarnom vremenu 33
3.2.2. Sekvenciranje i genska analiza sojeva 34
3.2.2.1. Konvencionalni RT-PCR 34

3.2.2.2. Detekcija PCR produkata i pročišćavanje DNK odsječka 35
3.2.2.3. Sekvenciranje 36
3.2.2.4. Analiza nukleotidnih odsječaka (sekvenca) F gena 36
3.2.3. Izolacija 37

3.3. Laboratorijska dijagnostika drugih respiratornih virusa **40**

3.4. Kliničko-laboratorijske metode **40**

3.5. Statistička analiza podataka **42**

4. REZULTATI **43**

4.1. Ispitanici **43**

4.2. Učestalost infekcije humanim metapneumovirusom i drugih virusnih respiratornih infekcija **46**

4.3. Kliničko–laboratorijski nalazi bolesnika s infekcijom humanim metapneumovirusom **54**
4.3.1. Simptomi, fizikalni i rendgenski nalaz u bolesnika s infekcijom humanim metapneumovirusom 54
4.3.2. Laboratorijski nalazi bolesnika s infekcijom humanim metapneumovirusom 59
4.3.3. Liječenje bolesnika s infekcijom humanim metapneumovirusom 62

4.4. Molekularna analiza sojeva humanog metapneumovirusa **66**

4.5. Izolacija humanog metapneumovirusa **76**

4.6. Testiranje hipoteza **77**

5. RASPRAVA **79**

6. ZAKLJUČCI **91**

7. SAŽETAK **93**

8. SUMMARY **95**

9. POPIS LITERATURE **97**

10. ŽIVOTOPIS **110**

POPIS KRATICA

AD	adenovirus
APV	ptičji metapneumovirus, virus rinotraheitisa purana
ARI	akutne respiratorne infekcije
B/HPIV3	goveđi/ljudski parainfluenca virus tip 3 (od engl. *bovine/human parainfluenzavirus type 3*)
BLAST	alat za uspoređivanje nukleotidnih ili proteinskih sekvenci (od engl. *Basic Local Alignment Search Tool*)
BRSV	goveđi respiratorni sincicijski virus
CC	kemokini s motivom C-C
cDNK	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
CIA	imunokromatografski test (od engl. *cromatographic immunoassay*)
CPU	citopatični učinak
CRP	C-reaktivni protein
CXC	kemokini s motivom C-X-C
DDS	donji dišni sustav
DFA	izravna imunofluorescencija (od engl. *direct immunofluorescence assay*)
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
dNTP	deoksinukleotid tri-fosfat
ECACC	European Collection of Cell Cultures
ELISA	imunoenzimni test (od engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)
gRNK	glasnička ribonukleinska kiselina
HEPES	2-(4-(2 hidroksietil)-1-piperazinil)-etansulfonska kiselina; organski pufer
HMPV	humani metapneumovirus
Hep-2	kontinuirana stanična linija humanog epidermoidnog karcinoma larinksa
HRD	heptadne ponavljajuće domene (od engl. *heptad repeat domains*)
HZJZ	Hrvatski zavod za javno zdravstvo
IFA	neizravna imunofluorescencija (od engl. *indirect immunofluorescence assay*)
IDDS	infekcija donjeg dijela dišnog sustava
IGDS	infekcija gornjeg dijela dišnog sustava
INF	interferon
INFL	influenca
IL	interleukin
IP-10	interferon inducibilni protein 10 (od engl. *interferon inducibile protein*)
IRF-3	čimbenik interferonskog odgovora 3 (od engl. *Interferon response factor*)
JIL	jedinica intenzivnog liječenja
LLC-MK2	kontinuirana stanična linija bubrega rhesus majmuna (*Macaca mulatto*)
MCP	kemotaktični protein monocita (od engl. *monocyte chemotactic protein*)
MEM	minimalni esencijalni medij (od engl. *minimum essential medium*)
MIP	makrofagni upalni protein (od engl. *macrophage inflammatory protein*)
NCBI	Nacionalni centar za biotehnološke informacije (od engl. *National Center for Biotechnology Information*)
NK	prirođenoubilačka stanica (od engl. *natural killer*)
NFS	nazofaringealni sekret
NF-κB	nuklearni čimbenik κB (od engl. *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*)

nt	nukleotid
ORF	otvoreni okvir čitanja (od engl. *open reading frame*)
OMA	upala srednjeg uha (od lat. *otitis media acuta*)
PBS	puferirana otopina soli (od engl. *phosphate buffered solution*)
PCR	polimeraza lančana reakcija (od engl. *polymerase chain reaction*)
PI	parainfluenca
PVM	virus mišje pneumonije
RANTES	kemokin RANTES (od engl. *regulated upon activation, normal T expressed and secreted*)
RNK	ribonukleinska kiselina
RSV	humani respiratorni sincicijski virus
RT-PCR	reverzna transkriptaza polimeraza lančana reakcija (od engl. *reverse transcriptase polymerase chain reaction*)
SAD	Sjedinjene Američke Države
SE	sedimentacija eritrocita
STAT	proteini STAT (od engl. *signal transducers and activator of transcription*)
tMK	tercijarne stanice kulture bubrega majmuna (od engl. *tertiary monkey kidney cells*)
TNF	čimbenik tumorske nekroze (od engl. *tumor necrosis factor*)
Vero	kontinuirana stanična linija bubrega afričkog zelenog majmuna (*Cercopithecus aethiops*) nazvana po akronimu od „Verda Reno“
vRNK	virusna ribonukleinska kiselina

1. UVOD

1.1. Humani metapneumovirus

1.1.1. Povijest i klasifikacija

Humani metapneumovirus (HMPV) prvi je put opisala Bernadete van den Hoogen sa suradnicima 2001. godine [1]. Virus su izolirali iz nazofaringealnog sekreta (NFS) male djece oboljele od akutne infekcije dišnog sustava (akutne respiratorne infekcije - ARI) u Nizozemskoj [1]. Iako je virus prvi put izoliran tek 2001. godine, retrospektivna serološka studija u Nizozemskoj pokazala je da u toj populaciji HMPV kruži već najmanje 50 godina [1]. Na osnovi morfoloških, biokemijskih i genetskih karakteristika HMPV je svrstan u rod *Metapneumovirus*, podobitelji *Pneumovirinae*, obitelji *Paramyxoviridae* (tablica 1) [2,3]. Iako je po svojim genetskim i epidemiološkim karakteristikama vrlo sličan humanom respiratornom sincicijskom virusu (RSV) koji je također član podobitelji *Pneumovirinae* HMPV je najsrodniji ptičjem metapneumovirusu serotipa C koji uzrokuje rinotraheitis u purana (APV, engl. *avian pneumovirus*) [4].

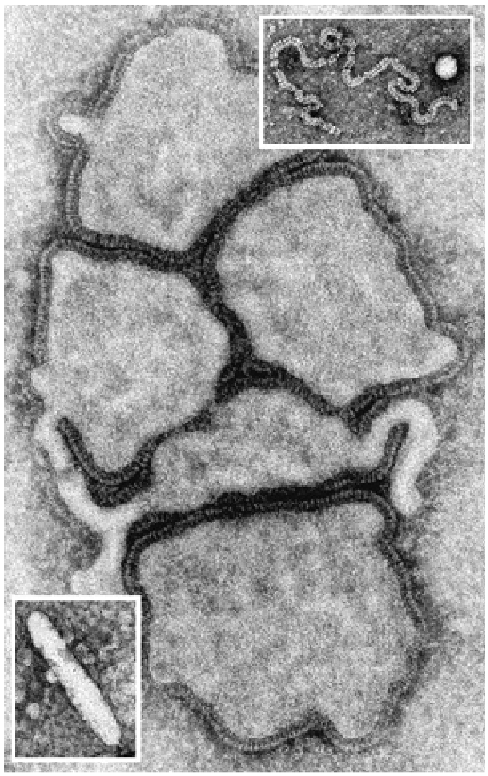
Tablica 1. Klasifikacija virusa podobitelji Pneumovirinae obitelji *Paramyxoviridae*

Obitelj	Podobitelj	Rod	Tip
Paramyxoviridae	*Pneumovirinae*	*Pneumovirus*	Humani respiratorni sincicijski virus (RSV)
			Goveđi respiratorni sincicijski virus (BRSV)
			Virus mišje pneumonije (PVM)
		Metapneumovirus	Humani metapneumovirus (HMPV)
			Ptičji metapneumovirus (APV)

Tablica priređena prema *ICTVdB - The Universal Virus Database* [3].

1.1.2. Građa i umnažanje virusa

HMPV je polimorfne građe, a kuglasti su oblici prosječnog promjera ~ 200 nm (slika 1) [5]. Posjeduje lipidnu ovojnicu.

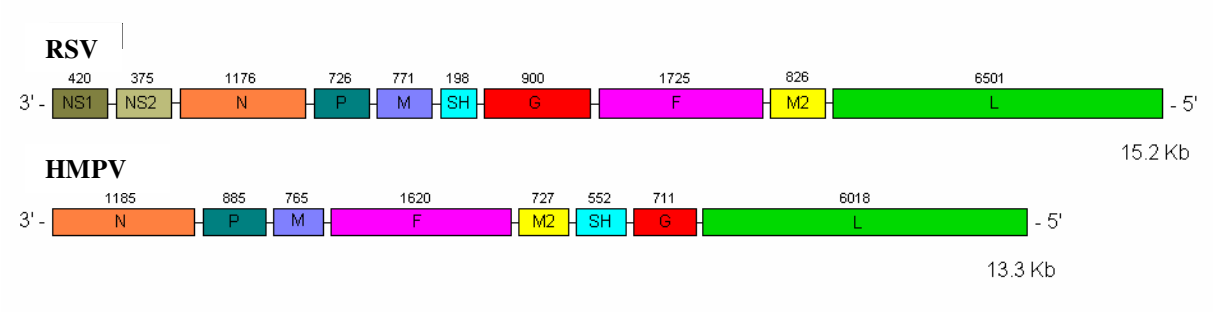


Izvor: http://www.public-health.uiowa.edu/ceid/Human_metapneumovirus.htm

Slika 1. Elektronska mikrografija humanog metapneumovirusa (HMPV); Sredina slike prikazuje 5 pleomorfnih HMPV čestica sa dobro vidljivim izdancima na površni virusa. U gornjem uglu desno prikazana je nukleokapsida a u donjem lijevo filamentozni oblik HMPV-a u obliku štapića. Negativno bojenje 2% fosfovolframovom kiselinom.

Na površini virusa nalaze se glikoproteinski izdanci prosječne duljine 15 nm [5]. Unutar ovojnice nalazi se nukleokapsida promjera 17 nm čija duljina varira od <200 do ~ 1000 nm. Genom virusa čini jednolančana, negativna ribonukleinska kiselina (RNK) veličine 13,3 Kb koja se sastoji od 8 gena (slika 2) koji kodiraju 9 proteina [2]. Gen M2 sadrži dva otvorena okvira čitanja (ORF, engl. *open reading frame*) koji se međusobno preklapaju i daju upute za sintezu dva proteina (M2-1 i M2-2). Dvije su

glavne razlike genoma HMPV-a u odnosu na RSV: poredak gena u genomu je različit, te HMPV ne posjeduje nestrukturne gene (NS1 i NS2) [6].



Slika prema *Hamelin i sur.* [6]

Slika 2. Shematski prikaz genoma humanog respiratornog sincicijskog virusa (RSV) i humanog metapneumovirusa (HMPV); Duljina gena je označena brojem nukleotida iznad shematskog prikaza pojedinog gena. Preklapanje između M2 i L gena kod RSV-a nije prikazano.

HMPV ima osam strukturnih proteina i M2-2 protein za koji nije utvrđeno pripada li strukturnim ili nestrukturnim proteinima virusa [7]. Četiri su proteina nukleokapside (nukleoprotein N, fosfoprotein P, transkripcijski elongacijski čimbenik M2-1 i polimeraza L), zatim protein matriksa M, te tri glikoproteina ovojnice (G, F i mali hidrofobni protein SH). Broj aminokiselina od kojeg su sastavljeni pojedini proteini HMPV-a i nekih članova podobitelji *Pneumovirinae* prikazan je u tablici 2 [2].

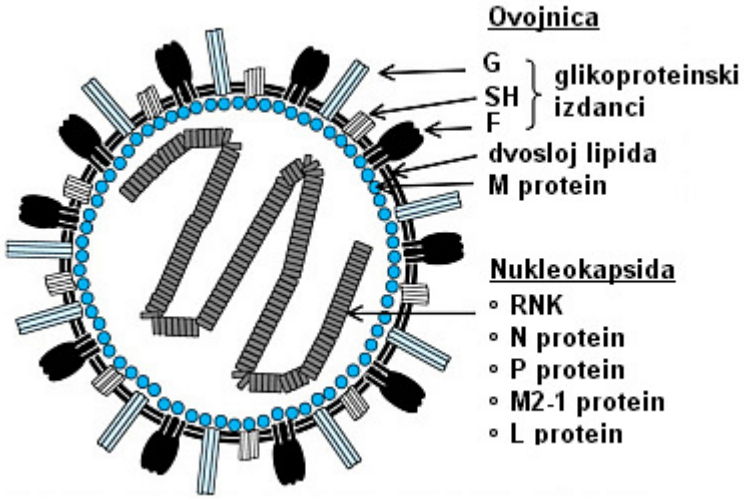
Tablica 2. Veličina proteina humanog metapneumovirusa tipa A (HMPV A), ptičjeg metapneumovirusa grupe C (APV C) i humanog respiratornog sincicijskog virusa tipa A (RSV A) prikazana brojem aminokiselina; *sekvence nisu dostupne

	N	P	M	F	M2-1	M2-2	SH	G	L
HMPV A	394	294	254	539	187	71	183	236	2005
APV C	394	294	254	537	184	71	-*	-*	-*
RSV A	391	241	256	574	194	90	64	298	2165

Tablica priređena prema *van den Hoogen i sur.* [2]

Proteini nukleokapside HMPV-a, N, P, L i M2-1 slične su veličine i odgovarajuće uloge kao i proteini nukleokapside RSV-a s kojim se najčešće uspoređuje. N protein čvrsto je vezan na virusnu RNK (vRNK). Protein L tj. glavna komponenta polimeraze zajedno sa fosfoproteinom P čini veliki polimeraza kompleks. N, P i L protein neophodni su i dovoljni za replikaciju vRNK. Osim što djeluju kao replikaza, ova tri proteina zajedno imaju ulogu transkriptaze u procesu prijepisa vRNK u glasničke RNK (gRNK) [7]. Za uspješnu transkripciju RSV-a neophodan je M2-1 protein, budući da u njegovu odsustvu polimeraza nespecifično i prerano završava proces prepisivanja [8]. Za razliku od RSV-a rekombinante HMPV-a bez M2-1 proteina umnažale su se *in vitro* sa vrlo malo smanjenom učinkovitošću [9]. Čini se da ovaj protein nije neophodan za proces transkripcije HMPV-a iako na životinjskom modelu nije dokazana replikacija rekombinante HMPV-a kojemu nedostaje M2-1 protein [9].

M2-2 protein ima ulogu regulatora sinteze RNK; delecija ORF 2 M2 gena kod HMPV-a jednako kao i kod RSV-a rezultira oslabljenim virusom u kojem je povećana transkripcija, a smanjena RNK replikacija [9,10].



Slika prema *Collins PL i sur.* [7]

Slika 3. Pojednostavljeni prikaz HMPV čestice
Prikaz nije proporcionalan prirodnim veličinama. Proteini nukleokapside nisu pojedinačno označeni.

Protein matriksa M priliježe uz unutarnju stranu virusne ovojnice i ima važnu ulogu u morfogenezi virusne čestice (slika 3) [7].

Glikoprotein ovojnice F odgovoran je za fuziju virusne ovojnice i stanične membrane stanice domaćina. F protein članova obitelji *Paramyxoviridae* se sintetizira kao inaktivni prekursor (F0) koji se aktivira razgradnjom pomoću proteaza stanice domaćina u dvije disulfidnim vezama povezane podjedinice NH_2-F2-F1-COOH. Za razliku od RSV-a čiji se F0 protein proteolitički razgrađuje na dva mjesta (engl. *cleavage site*) te se uz F1 i F2 podjedinicu stvara i mali peptid p27, HMPV se razgrađuje samo na jednom mjestu [2,7]. F1 podjedinica nastala proteolitičkom razgradnjom sadrži hidrofobnu domenu tzv. fuzijski peptid koji se spaja na ciljno mjesto u staničnoj membrani kako bi započeo proces fuzije, i heptadne ponavljajuće sekvence (HRD, od engl. *heptad repeat domains*) koje su odgovorne za konformacijske promjene kako bi virusna i stanična ovojnica stupile u što bliži kontakt [11]. Zbog svega navedenog kultivacija HMPV-a *in vitro* ovisna je o dodatku tripsina (iako su dugotrajnim pasažama umjetno stvorene mutante virusa kojima nije potreban tripsin) dok *in vivo* razgradnja F proteina ovisi o proteazama prisutnim u lumenu dišnog sustava [12,13,14].

Glikoprotein ovojnice G strukturni je protein koji pokazuje najveće razlike među sojevima HMPV-a [15,16]. Uloga G proteina HMPV-a još je nepoznata, a studije sa rekombinantama virusa kojima nedostaje G protein pokazale su da ovaj protein nije neophodan za replikaciju virusa kako *in vitro* tako i in *vivo* [17]. Slične je strukture G proteinu RSV-a [18], iako nešto kraći (tablica 2), te se pretpostavlja da bi mogao imati ulogu u pričvršćivanju virusa na stanicu domaćina.

SH glikoprotein HMPV-a je skoro tri puta dulji od SH proteina RSV-a (tablica 2). Delecija SH gena ima mali ili nikakav utjecaj na replikaciju virusa, a njegova funkcija je kao i kod RSV-a nepoznata [10,17].

Od svih glikoproteina ovojnice HMPV-a F glikoprotein ima najznačajniju ulogu u patogenezi imunoga odgovora organizma domaćina na infekciju potičući ga na stvaranje dugotrajnih neutralizirajućih protutijela [19,20]. Čini se da su G i SH glikoproteini HMPV-a vrlo slabi imunogeni i ne potiču stvaranje neutralizirajućih, odnosno zaštitnih protutijela [21].

Replikacijski ciklus HMPV-a do sada nije detaljno proučen. Čini se da je najsličniji replikacijskom ciklusu RSV-a, od kojeg se bitno razlikuje po kinetici infekcije koja je sporija od kinetike RSV infekcije [7]. Kao i svi paramiksovirusi umnaža se u citoplazmi inficirane stanice. Nakon prvotnog spajanja s nepoznatim staničnim receptorom koje je vjerojatno posredovano G glikoproteinom dolazi do stapanja virusne ovojnice sa staničnom membranom uz pomoć F glikoproteina, te se u citoplazmu oslobađa nukleokapsida. Virusni genom se pomoću virusnih enzima prepisuje u 9 gRNK koje služe kao osnova za tvorbu virusnih proteina i komplementarnu RNK koja služi kao kalup za tvorbu nove vRNK. Nukleokapsida virusa oblikuje se u citoplazmi, a ovojnica virusa na površini stanice. Novi virion napušta stanicu domaćina pupanjem na staničnoj opni [22].

1.1.3. Tipovi i podtipovi humanog metapneumovirusa

Na temelju analiza nukleotidnih sekvenca N, P, M, F, G, SH, L i M-2 gena pojedinih sojeva HMPV-a, od kojih je najčešće analiziran F gen, razlikujemo dva glavna genotipa (A i B) i najmanje četiri podtipa (A1, A2, B1 i B2) [5,16,23-28]. Nadalje, sojevi koji pripadaju podtipu A2 mogu se još preciznije raščlaniti na tzv. A2a i A2b varijante podtipa [29,30,31]. Podjelu podtipa A2 na A2a i A2b varijante po prvi puta uvode Huck i sur. 2006. god. na HMPV sojevima iz Njemačke [29]. Genetska raznolikost najizraženija je kod dva površinska glikoproteina, glikoproteina G i malog

hidrofobnog SH proteina, dok je treći glikoprotein F relativno konzerviran [16,32]. Istovjetnost slijeda niza nukleotida između članova dvije glavne genetske grupe (A i B) iznosi 80%, odnosno istovjetnost slijeda aminokiselina 90% (tablica 3) [32].

Tablica 3. Postotak istovjetnosti aminokiselinskog i nukleotidnog slijeda između HMPV-a tipa A i B i podtipa A1 i A2 ; Predstavnici određenog tipa HMPV-a uspoređivani u ovoj studiji: NL-001=A1; CAN97-83=A2, CAN98-75=B2

Uspoređeni virusi	**% istovjetnosti slijeda aminokiselina za naznačeni protein (% istovjetnosti slijeda nukleotida za naznačeni ORF)**								
	N	**P**	**M**	**F**	**M2-1**	**M2-2**	**SH**	**G**	**L**
HMPV A vs HMPV B	96 (84)	85 (81)	97 (85)	95 (84)	96 (85)	89 (87)	59 (69)	37 (59)	94 (84)
HMPV A1 vs HMPV A2	99 (94)	95 (92)	99 (94)	98 (94)	98 (94)	96 (95)	85 (88)	70 (77)	99 (95)

Tablica priređena prema *Biacchesi i sur.* [32]

Van den Hoogen i *sur.* izvješćuju o postojanju dva serotipa HMPV-a koji antigenski odgovaraju dvjema glavnim genetskim grupama [33]. Ovi su izvještaji temeljeni na *in vitro* neutralizacijskom testu (NT) provedenom na tMK staničnoj kulturi bubrega majmuna (engl. *tertiary monkey kidney cells*) u kojem su korišteni serumi tvorova inficiranih određenim genotipom HMPV-a. Prema najnovijim izvještajima, temeljenim na životinjskom eksperimentalnom modelu, čini se da HMPV ima samo jedan serotip sa dvije genetske grupe (A i B) koje pokazuju vrlo veliku unakrsnu reaktivnost i unakrsnu zaštitu nakon infekcije [7,19,20]. Neutralizirajuća protutijela usmjerena na F glikoprotein HMPV-a stečena imunizacijom ili pasivno unesena u životinju, štite životinju od infekcije kako homolognim tako i heterolognim sojem HMPV-a [19,20,34,35].

1.2. Epidemiologija infekcije humanim metapneumovirusom

1.2.1. Učestalost infekcije humanim metapneumovirusom u svijetu

Nakon što je prvi puta opisana 2001. godine u Nizozemskoj [1], HMPV infekcija dokazana je u velikom broju zemalja na svim naseljenim kontinentima, što ukazuje na proširenost HMPV-a u cijelom svijetu [6,36,37]. HMPV infekcija dokazana je u Europi (Njemačka, Velika Britanija, Španjolska, Francuska, Finska, Norveška, Italija) [38-44], Sjevernoj i Južnoj Americi (Sjedinjene Američke Države - SAD, Kanada, Meksiko, Argentina, Brazil, Peru) [45-50], Aziji (Japan, Kina, Bangladeš, Singapur, Tajland, Koreja) [51-56], Australiji [57] i Africi [58]. Učestalost HMPV-a prema studijama koje su proučavale različite skupine bolesnika kreće se od 1,5% do 54,4% (tablica 4) [1,29,38,45,46,51,57,59-68].

Tablica 4. Učestalost infekcije humanim metapneumovirusom (HMPV) u svijetu
*u studiju uključeni samo uzorci negativni na druge respiratorne viruse

Zemlja [br. literaturnog navoda]	HMPV učestalost (%)	Populacija	Tip studije / trajanje istraživanja
Nizozemska [1]	10	bolnička djeca (nespecificirane dobi) s ARI	retrospektivna, selektivna* / 1 zimska sezona
Njemačka [38]	17,5	bolnička djeca ≤ 2 god. s ARI;	retrospektivna / 1 sezona zima-proljeće;
[29]	4,9	bolnička i izvanbolnička djeca ≤16 god. s ARI	prospektivna / 1,5 god.
Francuska [59]	8,5	bolnička djeca ≤ 5 god. s ARI	prospektivna / 1 god.
Finska [60]	3,5	izvanbolnička djeca < 13 god. s ARI	Prospektivna / 1 sezona zima-proljeće
Italija [61]	25,0	bolnička djeca ≤ 2 god. s ARI	retrospektivna / 3 zimske sezone

Nastavak tablice 4.

Španjolska	[62]	10,8	bolnička djeca ≤ 2 god. s ARI	prospektivna / 5 god.
Izrael	[63]	10,8	bolnička djeca ≤ 5 god. s ARI	prospektivna, djelomično selektivna* / 2 zimske sezone
Australija	[57]	1,5	bolnička djeca s ARI;	retrospektivna, selektivna* / 1 god.;
	[64]	7,4	bolnička djeca <18 god. s ARI	prospektivna / 4 god.
SAD	[45]	6,4	bolnička djeca ≤ 5 god. s ARI;	retrospektivna, selektivna* /1 zimska sezona;
	[65]	3,9	bolnička djeca ≤ 5 god. s ARI;	prospektivna / 1 god.;
	[66]	8,1	izvanbolnička i bolnička djeca s ARI ≤ 5 god.	retrospektivna, selektivna* / 1 god.
Kanada	[46]	15,2	izvanbolnička i bolnička djeca s ARI ≤ 5 god.;	retrospektivna / 1 zimska sezona;
	[67]	6,0	bolnička djeca ≤ 3 god. s ARI	prospektivna /1 zimska sezona
Iran	[68]	54,4	izvanbolnička i bolnička djeca s ARI ≤ 2 god.	tip studije nespecificiran / 1 sezona jesen-zima
Japan	[51]	8,9	izvanbolnička i bolnička djeca s ARI ≤ 13 god.	retrospektivna, djelomično selektivna* / 3 god.
Koreja	[31]	8,4	bolnička djeca <16 god. s ARI	prospektivna / 1,5 god.

Iako HMPV uzrokuje ARI u svim dobnim skupinama [23,69] učestalost HMPV infekcije veća je u male djece [46,60,61,64,68,70]. Učestalost HMPV-a dobivena u retrospektivnim istraživanjima nešto je veća u odnosu na onu iz prospektivnih studija [1,38,45,46,51,61,66]. HMPV je uzročnik ARI u 3,9 % do 8,5% bolničke (hospitalizirane) djece mlađe od 5 god. u istraživanjima koja su trajala tijekom cijele kalendarske godine [59,65], odnosno u 6,4 -15,2% u istoj populacijskoj skupini, ali kada je istraživanje provedeno tijekom jedne zimske sezone [45,46,63].

Prema studijama koje su uspoređivale učestalost HMPV-a i drugih respiratornih virusa (RSV, virusi influence (INFL), virusi parainfluence (PI) i adenovirusi (AD)) HMPV je drugi po učestalosti uzročnik virusnih ARI u male djece, odmah nakon RSV-a [40,47,54,56,59,70,71], a rjeđe treći nakon RSV-a i virusa influence [48,67] ili RSV-a i virusa parainfluence [65]. Postoje istraživanja u kojima je HMPV najčešći dokazani uzročnik virusnih ARI u djece do 10 odnosno 13 god. starosti s najvećom učestalosti u dobnoj skupini do 2 god. [53,72]. Neke studije koje uključuju detekciju rinovirusa stavljaju HMPV na treće mjesto po učestalosti nakon rinovirusa i RSV-a u hospitalizirane djece do 2 god. starosti s ARI, odnosno bronhiolitisom [27,62].

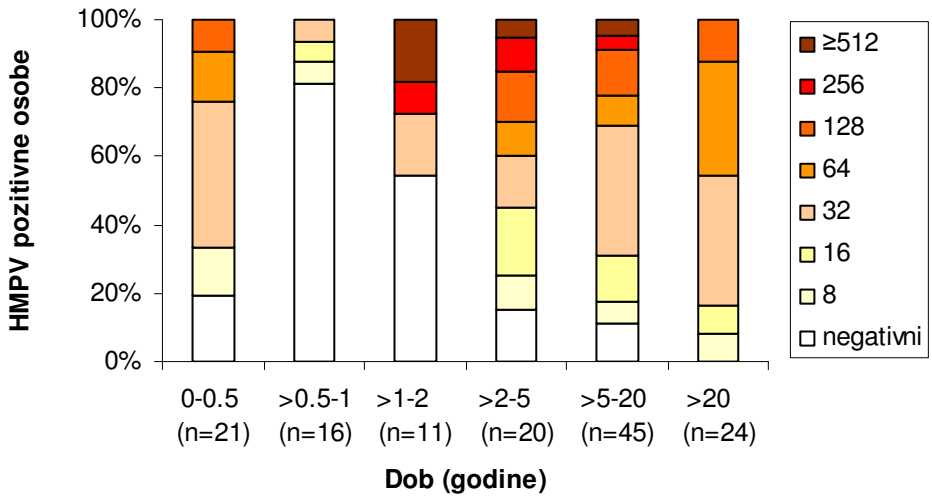
U zemljama sa umjerenom klimom HMPV se javlja sezonski, s najvećim brojem slučajeva u kasnim zimskim i ranim proljetnim mjesecima [66,70,73-78], iako se sporadični slučajevi mogu detektirati tijekom cijele godine [76,78]. Njegov se ciklus može, ali i ne mora preklapati s ciklusom RSV-a [27,47,74,78,79].

Učestalost HMPV-a ne ovisi samo o značajkama ispitivane populacije (dob, hospitalizacija), obliku studije i sezoni detekcije nego, vjerojatno, i o nekim drugim čimbenicima. Neki autori opazili su izrazitu razliku u incidenciji HMPV infekcije tijekom dviju uzastopnih zimskih sezona te upućuju na moguću pojavnost ove infekcije u obliku dvogodišnjeg ciklusa [61,69,75], dok drugi ne opisuju promjene u učestalosti HMPV-a praćene tijekom četverogodišnjeg perioda [72]. S obzirom na relativno kratko vrijeme koje je prošlo od prvotnog opisa HMPV infekcije potreban je dulji vremenski period kako bi se utvrdilo postoje li određene pravilnosti u pojavi HMPV infekcije kao što je to slučaj s RSV infekcijom [80].

Do sada nisu objavljene studije o učestalosti HMPV infekcije u osoba s ARI u Hrvatskoj.

1.2.2. Seroprevalencija na humani metapneumovirus

Nekoliko seroepidemioloških studija je pokazalo da praktički sva djeca u dobi od 5 do 10 godina posjeduju protutijela za HMPV, odnosno da su se do te dobi već susreli (inficirali) s ovim virusom [1,81-83]. Studija o seroprevalenciji HMPV-a u Hrvatskoj u kojoj su testom neizravne imunofluorescencije (IFA, engl. *indirect immunofluorescence assay*) pregledani serumi 137 osoba starosti od 6 dana do 51 god. bez simptoma ARI, pokazala je da su sve osobe iznad dvadesete godine života već bile inficirane HMPV-om [84]. Seroprevalencija na HMPV raste sa dobi, a najveći udio visokih titrova (≥512) HMPV specifičnih protutijela opažen je u dobnoj skupini od 1 do 2 godine što ukazuje na činjenicu da se većina primarnih infekcija događa u ranom djetinjstvu (slika 4) [84].



Slika prema *Ljubin Sternak i sur.* [84].

Slika 4. Seroprevalencija s prikazom titra protutijela na humani metapneumovirus (HMPV) prema dobi u Hrvatskoj

Usprkos uobičajene HMPV infekcije u djetinjstvu, opisane su klinički značajne reinfekcije tijekom života koje se javljaju ili zbog nedostatnog zaštitnog imunog odgovora ili zbog infekcije novim genotipom [39,62,78,85,86].

1.2.3. Molekularna epidemiologija infekcije humanim metapneumovirusom

Primjenom molekularnih metoda genotipizacije i detaljnom analizom sekvenca pojedinih sojeva HMPV-a, ustanovljena je prisutnost oba glavna genotipa HMPV-a širom svijeta. Pojavnost pojedinih podtipova prema geografskom području i vremenu istraživanja prikazana je u tablici 5. Pojava jednog podtipa na određenom području ne isključuje istovremenu pojavu drugih podtipova. U istoj sezoni na jednome području može biti opažen samo jedan podtip [49,78], a mogu istovremeno kružiti i sva četiri podtipa virusa [30,64,72,75].

Tako je retrospektivna, višegodišnja studija iz SAD-a detektirala pojavu samo jednog podtipa tijekom nekih sezona (npr. pojava samo B2 podtipa u sezonama 1983., 1990., 1993., 1996. i 2001. god.), ali i istovermenu pojavu triju podtipova (npr. pojava podtipova A1, A2 i B2 u sezonama 1982., 1985., i 1995. god.) [78]. Četverogodišnje studije iz Australije izvještavaju o istovremenom kruženju svih četiriju podtipa tijekom svake sezone [64,72].

Kada je prisutno više podtipova istovremeno najčešće jedan od podtipova dominira tijekom određenog vremenskog perioda [26,29,30,59,63,75].

Novija istraživanja ukazuju na mogućnost cikličke pojave HMPV-a sa izmjenom genotipa u pojedinim sezonama [87], odnosno pojave različitih ili sličnih podtipova na raznim geografskim područjima [88].

Do sada nisu objavljena istraživanja koja opisuju pojavu određenih genotipova i podtipova HMPV-a u Hrvatskoj.

Tablica 5. Pojava pojedinih podtipova i varijanti podtipa A2 humanog metapneumovirusa (HMPV) u odnosu na geografsko područje i vrijeme istraživanja

Zemlja [br. literaturnog navoda]	Opaženi podtipovi (prevladavajući podtipovi i/ili varijante podtipa A2 označeni su podebljanim slovima)	Vrijeme obuhvaćeno istraživanjem / napomena o kruženju podtipova
Nizozemska [33]	A1, A2, B1, B2	1983-2002
Njemačka [29]	A1, **A2a, A2b, B1**, B2	2002-2004
Francuska [59]	**A1**, A2, B1, B2	2003/2004
Italija [30]	A1, A2a, **A2b,** B1, B2	2004-2006
[75]	A1, **A2a**, A2b, B1, B2	2005-2006
Izrael [63]	A1, **B1**, B2	2002-2004
Australija [64,72]	A1, **A2, B1,** B2	2001-2004 / Izmjena prevladavajućeg podtipa svake godine; svake godine prisutna sva četiri podtipa
SAD [78]	A1, A2, B1, **B2**	1982-2001/ Izmjena prevladavajućeg podtipa tijekom godina; pojava samo jednog odnosno do tri podtipa istovremeno
Kanada [26]	A1, **A2**, B1, B2	1993-2002/ Izmjena prevladavajućeg podtipa; istovremena pojava A i B genotipa
Japan [73]	**A1**, A2, B1, B2	2004/2005
Koreja [31]	**A2a, A2b**, B1, B2	2005-2007/ Izmjena prevladavajuće varijante podtipa A2
Peru [50]	**B1**, B2	2002/2003
Brazil [49]	B1	2004
Argentina [28]	A1, A2, **B1**	1998-2003

1.3. Klinička slika infekcije humanim metapneumovirusom

Humani metapneumovirus uzročnik je ARI u svim dobnim skupinama [23,39]. Iako su opisane asimptomatske infekcije u djece i odraslih, asimptomatsko vironoštvo HMPV-a nije uobičajeno [89]. U odraslih osoba koje su u neposrednom, stalnom kontaktu s malom djecom dokazan je nešto veći broj (4,1%) asimptomatskih infekcija [69] dok su u dobi malog djeteta asimptomatske infekcije uzrokovane HMPV-om vrlo rijetke (<1% vs. 6%) [67].

Inkubacijski period HMPV infekcije procjenjuje se na 4-6 dana [51].

Klinička slika HMPV infekcije je vrlo slična onoj uzrokovanoj RSV-om [36,67,79].

U djece se HMPV infekcija očituje simptomima ARI (tablica 6), odnosno u obliku raznih kliničkih sindroma: respiratornog katara, upale srednjeg uha, krupa, sindroma pertusisa, bronhitisa, bronhiolitisa sa ili bez pneumonitisa, pneumonije te egzacerbacije astme [41,67,79,90,91].

Tablica 6. Najčešći simptomi i fizikalni nalaz infekcije humanim metapneumovirusom (HMPV); IGDS=infekcija gornjeg dijela dišnog sustava; IDDS=infekcija donjeg dijela dišnog sustava

Simptomi / fizikalni nalaz		IGDS (%)	IDDS (%)
Vrućica		54	52
Kašalj		66	90
Iscjedak iz nosa		79	77
Bolno ždrijelo		44	39
Patološki nalaz na bubnjiću		63	51
Auskultacijski nalaz na plućima	**zviždanje**	-	52
	hropci	-	20
	krepitacije	-	8

Tablica priređena prema *Williams i sur.* [78,79]

Prema Williamsu i sur. HMPV u djece uzrokuje 5% svih virusnih infekcija gornjeg dišnog sustava (IGDS) praćenih akutnom upalom srednjeg uha u više od 50% slučajeva [78] i 20% svih virusnih infekcija donjeg dišnog sustava (IDDS) [79]. Upala srednjeg uha može biti primarno uzrokovana HMPV-om ili se, što je češće, pojavljuje kao sekundarna bakterijska infekcija u tijeku infekcije HMPV-om [90]. Prema istom autoru IDDS uzrokovane HMPV-om javljaju se u obliku bronhiolitisa u 59% slučajeva, pneumonije u 8% i egzacerbacije astme u 14% slučajeva [79]. I druge studije pokazale su da je HMPV odmah nakon RSV-a vodeći uzročnik bronhiolitisa [41,42,67]. Dijagnoza bronhiolitisa označava tešku kliničku sliku u dojenčeta uzrokovanu opstrukcijom bronhiola. Bolest obično počinje simptomima IGDS-a da bi se na to nadovezala opstruktivna dispneja. Simptomi bronhiolitisa su zviždanje (engl. *wheezing*), kašalj, dispneja, tahipneja (>60/min), dok je na rendgenogramu uočljiva hiperinflacija pluća [92]. U osnovi je teško razgraničiti i strogo odijeliti bronhiolitis, recidivni opstruktivni bronhitis sa zviždanjem i astmu [93]. Autori iz SAD-a preporučuju dijagnozu bronhitisa sa zviždanjem za one pacijente koji prvi napadaj bolesti imaju u dobi iznad 11 mjeseci starosti i to nakon već jednog preboljelog bronhiolitisa [94]. Dijagnoza pneumonije se u pravilu postavlja na temelju fizikalnog i rendgenskog nalaza pluća. Kod HMPV-om uzrokovane pnumonije najčešći je nalaz difuznih perihilarnih infiltrata [79].

Kod mlađih odraslih osoba HMPV najčešće uzrokuje blage infekcije koje se manifestiraju kao prehlada [39]. Prema Johnstone i sur. HMPV uzrokuje 4% pneumonija u odraslih osoba hospitaliziranih zbog pneumonije [95], a prema Williamsu i sur. odgovoran je za 6,9% akutnih epizoda egzacerbacija astme u odraslih koje su zahtijevale hospitalizaciju oboljelih osoba [96].

Infekcije s težom kliničkom slikom javljaju se u male djece [41,43,67], starijih osoba [69,76] i imunokompromitiranih pacijenata [86]. Iako HMPV infekcije obično imaju

povoljnu prognozu i završavaju izlječenjem opisani su i smrtni slučajevi, osobito u imunokompromitiranih pacijenata [86,97,98]. Također su kod potonjih pacijenata opisane simptomatske i asimptomatske perzistentne HMPV infekcije [99,100].

Osim što uzrokuje ARI, HMPV se povezuje s akutnom infekcijom središnjeg živčanog sustava budući je vRNK dokazana u uzorcima mozga i pluća [101], odnosno u respiratornom sekretu [73,102] pacijenata s kliničkom slikom encefalitisa. U skorije vrijeme opisana je HMPV infekcija koja se manifestirala oblikom bolesti sličnim infektivnoj mononukleozi [103].

Vincente i sur. našli su povezanost težeg oblika infekcije s određenim genotipom HMPV-a [104]. Uspoređivali su objektivne laboratorijske parametre (npr. stupanj hipoksemije) izmjerene u osoba inficiranih HMPV genotipom A i genotipom B i našli da se u malom broju djece oboljelih od genotipa A bolest manifestira težom kliničkom slikom u odnosu na osobe oboljele od infekcije uzrokovane genotipom B [104]. Naznake da je teža klinička slika povezana s genotipom A objavili su i neki drugi istraživači [54,66], ali jednak je broj objavljenih studija koje nisu našle povezanost između težine kliničke slike i infekcije određenim genotipom [78,79,87].

Težina kliničke slike povezuje se i s istodobnom infekcijom (koinfekcijom) s nekim drugim virusom, osobito RSV-om [59]. Greensill i sur. izvjestili su da je 70% djece s teškim oblikom RSV bronhiolitisa istodobno bilo inficirano s HMPV-om [105]. Nadalje König i sur. su našli da je 60% HMPV inficirane djece koja su zahtijevala povećanu njegu u jedinici intenzivnog liječenja (JIL) istodobno bilo inficirano sa RSV-om [106]. Za razliku od ovih studija, neki drugi autori nisu našli da je koinfekcija RSV/HMPV uobičajena u pacijenata s teškim oblikom bronhiolitisa [108], ili da se teža klinička slika nalazi u koinficiranih RSV/HMPV pacijenata [75]. Klinička slika koinfekcije HMPV-a i adenovirusa ne razlikuje se od kliničke slike pacijenata inficiranih samo s HMPV-om [107].

1.4. Patogeneza infekcije i imuni odgovor na humani metapneumovirus

HMPV primarno inficira stanice dišnog epitela [37,109], i to najčešće trepetljikave stanice, a nešto rjeđe pneumocite [110]. Istraživanja na životinjskom modelu opisala su histopatološke promjene u dišnom sustavu uzrokovane HMPV infekcijom koje su prema težini promjena varirale od blagih (gubitak trepetljika) do težih (jaka infiltracija neutrofilima i makrofazima uz gubitak normalne arhitekture malih dišnih puteva i alveola) [110,111]. U miševa su opisane promjene u smislu alveolitisa, upalnih promjena u intersticiju pluća te izrazite produkcije sluzi, dok u štakora u obliku peribronhiolitisa [111]. Vrh virusne replikacije u plućima miševa i štakora bio je 5-og dana od infekcije HMPV-om što je odgovaralo vremenu najizraženije dispneje. Opisane upalne promjene u miševa praćene značajnom opstrukcijom dišnih puteva dugotrajno su prisutne, kao i mogućnost detekcije virusne RNK u plućima (154 i 180 dana od infekcije) [112,113]. U usporedbi s RSV infekcijom, čini se da se HMPV sporije replicira u plućima i DDS-u od RSV-a, ali i sporije eliminira u odnosu na RSV.

Najnovija istraživanja provedena na staničnoj kulturi A549 (ljudske, alveolarnom epitelu slične stanice) su pokazala da je HMPV snažan induktor CXC i CC kemokina kao i proupalnih citokina. Od CXC kemokina u vrlo ranoj fazi infekcije (već nakon 6 sati) HMPV potiče produkciju IL-8 (interleukin 8; aktivator neutrofila), a nešto kasnije IP-10 (interferon induktivni protein). Od CC kemokina potiče produkciju RANTES kemokina (RANTES; od engl. *regulated upon activation, normal T expressed and secreted*), kemotaktičnog proteina monocita 1 (MCP-1; engl. *monocyte chemotactic protein*) i upalnog proteina makrofaga 1α/ β (MIP1α/ β; engl. *macrophage inflammatory protein*), a od proupalnih citokina IL-6 [114].

Istraživanje na miševima je pokazalo da je u početku infekcije pojačana produkcija citokina i kemokina Th1 tipa imunog odgovora tj. IL-2, interferona γ (IFN-γ) i

čimbenika tumorske nekroze (TNF-α; engl. *tumor necrosis factor*), ali da nakon sedmog dana od infekcije prevladavaju citokini Th2 tipa imunog odgovora, točnije IL-10 [115].

Iako se sva do sada objavljena istraživanja slažu s nalazom sporije kinetike HMPV infekcije u odnosu na RSV infekciju, postoje razlike u nalazima istraživanja provedenim na životinjama s obzirom na HMPV-om izazvani stupanj produkcije citokina. Huck i sur. izvještavaju da se kod HMPV inficiranih miševa može naći veći broj neutrofila i aktiviranih NK stanica u dišnim putevima nego u RSV inficiranih miševa odnosno veća produkcija proupalnih citokina i kemokina (IL-6, TNF-α i MCP-1) [116]. U suprotnosti s ovim nalazom Guerrero-Plata i sur. izvjestili su da je HMPV slabiji induktor citokina u odnosu na RSV [117].

Neka istraživanja su pokazala da je HMPV, za razliku od RSV-a, snažan induktor INF-α, što se povezuje sa nepostojanjem dvaju nestrukturalnih proteina kod HMPV-a (NS1 i NS2) [114,118]. Ova dva nestrukturalna proteina kod RSV-a djelomično inhibiraju aktivaciju nuklearnog čimbenika κB (NF-κB; engl. *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*) i transkripcijske čimbenike interferonskog odgovora (IRF-3; engl. *interferon response factor*) te na taj način prekidaju signalni put posredovan tzv. STAT-2 proteinima (engl. *signal transducers and activator of transcription*) koji je važan za produkciju IFN-α.

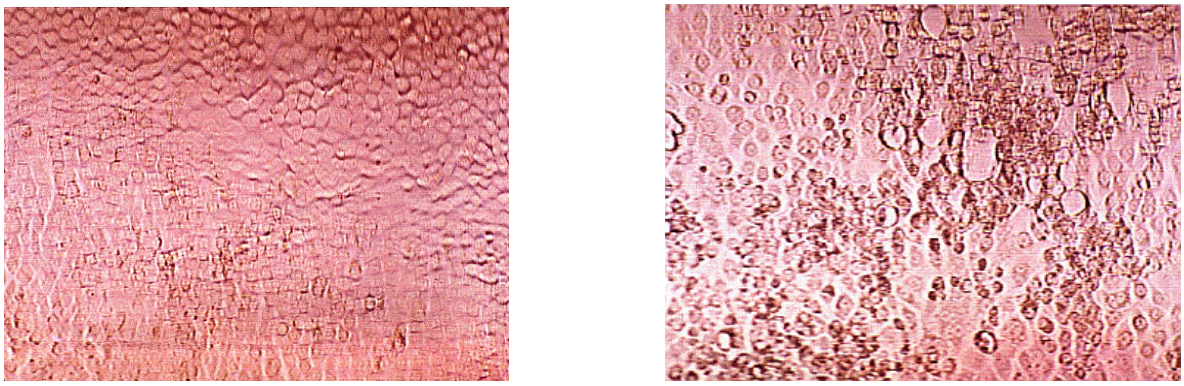
U ljudi, HMPV infekcija je udružena s povišenim razinama IL-8 u sekretu gornjih dišnih puteva [42], te kroničnim upalnim promjenama kao što je nalaz intraalveolarnih pjenušavih i hemosiderinom ispunjenih makrofaga [109]. U usporedbi s RSV infekcijom, čini se da se u tijeku HMPV infekcije u ljudi oslobađa manja količina proupalnih citokina kao što su: IL-12, TNF-α, IL-6 i IL-1β [119], te da u manjoj mjeri potiču i aktiviraju antigen prezentirajuće stanice - dendritičke stanice [120].

1.5. Mikrobiološka dijagnostika infekcije humanim metapneumovirusom

1.5.1. Izravna virološka dijagnostika

1.5.1.1. Izolacija humanog metapneumovirusa

Izolacija HMPV-a je veoma dugotrajan, zahtjevan i u odnosu na molekularnu dijagnostiku neosjetljiv postupak, što je jedan od mogućih razloga kasnog otkrića ovog virusa. HMPV dobro raste na staničnim kulturama bubrega majmuna tMK i LLC-MK2 (kontinuirana stanična linija bubrega Rhesus majmuna), a nešto slabije u Vero stanicama (kontinuirana stanična linija bubrega afričkog zelenog majmuna) [23,121].

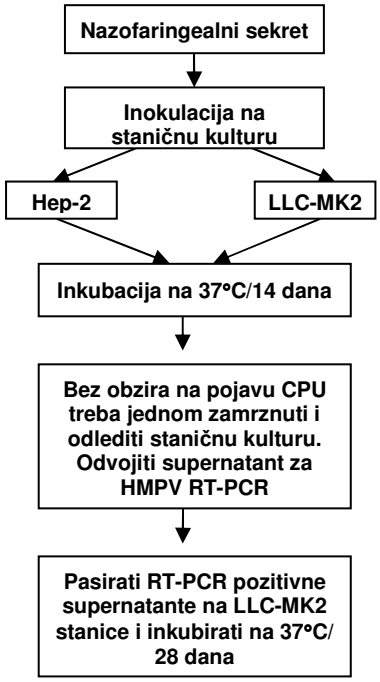


Slike dobivene ljubaznošću Dr Ann R. Falsey, Infectious Diseases Unit, Rochester General Hospital, University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester, NY, SAD

Slika 5. Neinficirana LLC-MK2 stanična kultura (lijevo) i citopatični učinak HMPV-a u LLC-MK2 stanicama (desno)

Citopatični učinak (CPU) javlja se vrlo kasno (najranije 10-14 dana nakon inokulacije virusa) u obliku formiranja malih sincicija, pojave granulacije i zaokružavanja te propadanja stanica (slika 5) [6,122]. Bez pojave CPU-a HMPV se umnaža u Hep-2 stanicama (kontinuirana stanična linija karcinoma larinksa čovjeka), pa se za

detekciju virusa na staničnoj kulturi služimo dodatnim dijagnostičkim postupcima kao što je neizravna imunofluorescencija (IFA; engl. *indirect immunofluorescence assay*) i/ili reverzna transkriptaza polimeraza lančana reakcija (RT-PCR) u supernatantu stanične kulture (slika 6) [122].



Slika prema *Chan P.K.S. i sur.* [122].

Slika 6. Shematski prikaz kombinacije konvencionalne metode izolacije virusa i molekularne detekcije HMPV infekcije; Detekcija virusa bazirana samo na pojavi citopatičnog učinka tijekom primoinokulacije kliničkog uzorka na staničnu kulturu nije dovoljno osjetljiva. Produžena inkubacija na 28 dana povećava osjetljivost metode te se preporučuje u svrhu dobivanja izolata

U skorije vrijeme opisan je vrlo učinkovit posupak izolacije ovog virusa na staničnoj kulturi ljudskih bronhalnih stanica 16HBE140 koji ne zahtijeva dodatak tripsina tijekom postupka inokulacije kliničkog materijala [123], kao i izolacija HMPV-a poboljšana ″tehnikom centrifugiranja uzorka na staničnu kulturu″ (engl. *shell vial technique*)[124].

1.5.1.2. Molekularna dijagnostika

RT-PCR metoda za detekciju HMPV RNK u kliničkom uzorku metoda je izbora za dijagnostiku HMPV infekcije. Ova metoda pokazuje najveću osjetljivost i specifičnost i smatra se zlatnim standardom za dijagnostiku HMPV infekcije [1,2,124-127]. RT-PCR reakcija bazirana na metodi polimeraza lančane reakcije u stvarnom vremenu (engl. *real-time RT-PCR*), omogućava amplifikaciju određenih virusnih gena (najčešće N, L ili F) i njihovu detekciju unutar nekoliko sati [126]. S ozirom na genetsku različitost HMPV sojeva potreban je veliki oprez prilikom izbora početnica kako ne bi došlo do nemogućnosti detekcije pojedinih HMPV podtipova, te tako do propuštanja određenog broja HMPV infekcija. Metoda opisana od Maertzdorfa i sur. kojom se detektira N gen preporučuje se za dijagnostiku HMPV infekcije jer omogućava vrlo osjetljivu detekciju sve četiri podgrupe HMPV-a [127]. Osjetljivost ove metode procijenjena je na mogućnost detekcije 50 HMPV RNK kopija svih četiriju podtipa i od 5 do 10 HMPV RNK kopija A1 i B1 podtipa u uzorku [127].

1.5.1.3. Detekcija antigena

U svrhu brze i relativno jeftine dijagnostike HMPV infekcije razvile su se metode detekcije HMPV antigena u kliničkom uzorku koje su zasnovane na upotrebi specifičnih monoklonskih protutijela [128-133]. Tako su najprije razvijeni IFA testovi, a zatim testovi izravne imunofluorescencije (DFA; engl. *direct immunofluorescence assay*) i imunokromatografski testovi (CIA; engl. *cromatographic immunoassay*). Brzina izvođenja pojedinih testova zavisi od primjenjene metode, a iznosi od 10-60 minuta za CIA testove te 30-105 minuta za DFA testove [131]. Osjetljivost i specifičnost ovih testova mjeri se u odnosu na RT-PCR metodu. Tako se osjetljivost

IFA testova kreće od 73,3%-100%, a specifičnost od 97,0%-100% [128-130]. Osjetljivost komercijalno dostupnih DFA testova za dijagnostiku HMPV infekcije nešto je manja i iznosi 62,5%-63,2%, a specifičnost od 99,8%-100% [131]. Osjetljivost ICA testa iznosi 70,6% a specifičnost 95,5% [133]. Iako je osjetljivost ovih testova manja u odnosu na RT-PCR smatramo ih važnim napretkom u dijagnostici HMPV infekcije zbog lakoće i jednostavnosti njihove primjene te brzini postavljanja etiološke dijagnoze.

1.5.2. Neizravna virološka dijagnostika

Zbog visoke učestalosti HMPV infekcije u ranom djetinjstvu, serološka dijagnostika zasniva se na nalazu serokonverzije ili četverostrukog porasta titra IgG protutijela u parnom uzorku seruma [23,53,69]. Budući je ovakva dijagnoza HMPV infekcije retrospektivna, ova metoda je od malog kliničkog značaja. Nalaz IgM protutijela u jednom uzorku seruma u literaturi je rijetko korišten dijagnostički pokazatelj akutne HMPV infekcije [51]. U upotrebi su testovi neutralizacije na staničnoj kulturi [1,134], zatim IFA testovi koji koriste HMPV inficirane stanice [1,23,51,81,83,84] i imunoenzimni test (ELISA; engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) koji koristi HMPV inficirane stanice [69] ili rekombinantne virusne proteine [135].

1.6. Liječenje i prevencija infekcije humanim metapneumovirusom

1.6.1. Liječenje

Za sada nema registrirane specifične terapije niti specifične profilakse za infekciju HMPV-om, te se liječi lijekovima za ublažavanje simptoma i nadomjesnim terapijskim postupcima. Čini se da ribavirin i intravenski imunoglobulin pokazuju sličan, *in vitro* i na životinjskom modelu, protuvirusni učinak kako za RSV tako i za HMPV [36,136].

Najnoviji radovi Hamelin i sur. dokazali su profilaktički učinak monoklonskih protutijela protiv HMPV-a u miševa [137]. Također je identificiran jedan peptid, tzv. HRA2, dobiven iz heptadnih ponavljajućih domena fuzijskog protina HMPV-a (HRD; engl. *heptad repeat domains*) koji pokazuje jaki inhibitorni učinak na HMPV i umjereni inhibitorni učinak na RSV *in vitro* i *in vivo* [138]. Rezultati ove studije otvaraju mogućnost razvoja moćnih antivirusnih lijekova koji potiču iz HRD fuzijskog proteina HMPV-a.

1.6.2. Razvoj cjepiva

Objavljeno je više studija provedenih na životinjskim modelima koje se intenzivno bave razvojem HMPV cjepiva, te je predstavljeno više mogućih kandidata za HMPV cjepivo.

Istraživanja s cjepivom pripravljenim od inaktiviranog virusa u miševa, štakora i majmuna pokazala su da se u cijepljenih životinja javlja hipersenzitivnost na HMPV infekciju odnosno izmijenjen imunološki odgovor s posljedičnom težom kliničkom slikom bolesti [139-141]. Ova su istraživanja u skladu s primjećenim posljedicama primjene formalinom inaktiviranog RSV cjepiva tijekom 60-tih god. prošlog stoljeća

kada je kod cijepljene djece, kasnije inficirane RSV-om, došlo do pojave težih kliničkih slika bolesti [142,143]. Stoga je daljnji razvoj HMPV cjepiva usmjeren na razvoj živog atenuiranog i podjediničnog cjepiva. Razvoj metoda reverzne genetike za HMPV pruža velike mogućnosti u razvoju živih atenuiranih cjepiva [144,145]. U tablici 7 prikazana su do sada opisana živa atenuirana i podjedinična cjepiva testirana na životinjskim modelima.

Tablica 7. Živa atenuirana, rekombinantna i podjedinična HMPV cjepiva u istraživanju
B/HPIV3= goveđi/ljudski parainfluenca virus tip 3, HMPV/APV= Humani metapneumovirus/ptičji metapneumovirus, DDS= donji dišni sustav

Vrsta cjepiva [br. literaturnog navoda]	**Životinjski model**	**Rezultat istraživanja**
HMPV mutante sa delecijom G i M2-2 gena [9,10,17]	hrčci, majmuni	Nedetektabilna prisutnost virusa u DDS
B/HPIV3 sa ekspresijom HMPV F protina [20,146]	hrčci, majmuni	Potpuna zaštita od infekcija DDS
Himerični HMPV/APV virus [147]	hrčci, majmuni	Zaštitna učinkovitost odgovara divljem tipu HMPV-a
Topivi F protein [35]	hrčci, štakori	Potpuna zaštita od infekcija DDS
Topivi F protein i F DNK cjepivo [148]	štakori	Virusna replikacija u DDS 10-terostruko umanjena

Tablica priređena prema Herfst S *i sur.* [143]

Za sada nije objavljena niti jedna klinička studija koja bi potvrdila učinkovitost i sigurnost primjene mogućih kandidata za HMPV cjepivo na ljudima [143].

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

2.1. Ciljevi istraživanja i obrazloženje

Iako su ARI vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta u djece u svijetu, etiologija mnogih za sada još uvijek ostaje nepoznata. Od otkrića HMPV-a 2001. god. pokazalo se da je ovaj virus jedan od važnih uzročnika virusnih ARI u cijelom svijetu. Do sada u Hrvatskoj nije provedeno istraživanje o učestalosti infekcije HMPV-om u hospitalizirane djece zbog ARI. Također nema podataka o molekularnim karakteristikama sojeva HMPV-a dokazanih u Hrvatskoj. Određivanje učestalosti ove infekcije i pojavnosti genotipova HMPV-a bio bi izvorni doprinos spoznajama o molekularnoj epidemiologiji HMPV-a u ovom dijelu Europe. Detekcija i/ili izolacija autohtonih sojeva virusa doprinijela bi raznolikosti „poola“ postojećih sojeva HMPV-a u svijetu, što bi mogao biti koristan podatak za istraživanja koja se bave razvojem i mogućom primjenom vakcine.

Stoga su postavljeni slijedeći ciljevi ovoga istraživanja:

1. Utvrditi učestalost HMPV infekcije u djece mlađe od 5 godina hospitalizirane zbog ARI u sjeverozapadnoj Hrvatskoj (Zagrebačka županija i okolica);
2. Usporediti učestalost HMPV infekcije s učestalosti drugih virusnih respiratornih infekcija (uzrokovanim RSV-om, adenovirusima, virusima influence i parainfluence) u djece mlađe od 5 godina hospitalizirane zbog ARI;
3. Opisati kliničke karakteristike infekcije uzrokovane HMPV-om u djece mlađe od 5 godina hospitalizirane zbog ARI;

4. Istražiti genetičku različitost sojeva HMPV-a dokazanih u Hrvatskoj tj. klasificirati sojeve HMPV-a u dvije glavne genogrupe, odnosno četiri podgrupe;
5. Opisati kliničke karakteristike infekcije uzrokovane HMPV-om u odnosu na genotip;
6. U cilju uzgoja autohtonih sojeva HMPV-a pokušati izolirati ovaj virus iz kliničkih uzoraka.

2.2. Hipoteze

Glavne hipoteze ovoga rada jesu:

Hipoteza broj 1:

Učestalost HMPV infekcije u Hrvatskoj (Zagrebačka županija i okolica) ne razlikuju se od učestalosti ove infekcije na drugim područjima u svijetu (što u prema do sada objavljenim istraživanjima koja su provođena tijekom jedne zimske sezone, u hospitalizirane djece do 5 godina starosti sa ARI iznosi od 6,4% do 15,2%).

Hipoteza broj 2:

Gensko ustrojstvo HMPV-a koji kruže u Hrvatskoj podudara se s dokazanim genotipovima ovog virusa nađenim drugdje u svijetu.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici i klinički materijal

3.1.1. Ispitanici

Istraživanje je obuhvatilo 402 djece mlađe od 5 godina s ARI koja su bila hospitalizirana u Klinici za dječje bolesti Zagreb i Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u razdoblju od 01. prosinca 2005. god. do 31. ožujka 2006. god. Istraživanje se provelo u sklopu projekta MZOS br. 0005 002 pod naslovom: „Uzročnici bolesti koji se šire kapljičnim putem“ voditeljice prof. dr. sc. Gordane Mlinarić-Galinović i odobreno je od Etičkih povjerenstava HZJZ-a, Klinike za dječje bolesti Zagreb i Klinike za zarazne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“.

Tijekom istraživanja za svako dijete prikupili su se osnovni podaci (dob, spol), klinička dijagnoza i vrsta uzetog kliničkog materijal. Prema dobroj kliničkoj praksi, u studiju nisu bila uključena djeca kod kojih je ARI trajala duže od 10 dana jer je kod istih smanjena mogućnost izravne virološke dijagnostike iz NFS-a [110]. Niti jedna od navedenih ustanova nije tijekom navedenog studijskog razdoblja liječila djecu ribavirinom, čija primjena bi mogla utjecati na rezultate izravne virološke dijagnostike.

3.1.2. Klinički materijal za dijagnostiku virusnih infekcija

U svih ispitanika prikupljeni klinički materijal za dijagnostiku virusnih infekcija bio je NFS dobiven aspiracijom prema postupku opisanom od Mlinarić-Galinović i sur. [149]. Kako bi se virus sačuvao NFS se transportirao na +4ºC u Odjel za virologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ) u roku od 24 h. Nakon prispijeća

uzorka u HZJZ, odmah se pristupilo obradi uzorka s ciljem brze dijagnostike standardne palete respiratornih virusa (RSV, AD, PI i INFL virusi). Dio materijala namijenjen dijagnostici HMPV-a razrijeđen je s jednakom količinom virusnog transportnog medija (Hanksova otopina soli) i pohranjen na -70˚C do izvođenja molekularne detekcije HMPV-a, odnosno do inokulacije na staničnu kulturu.

3.2. Mikrobiološka dijagnostika infekcije humanim metapneumovirusom

Kao pozitivne kontrole koristili smo HMPV sojeve CAN97-83 (tip A) i CAN98-75 (tip B) dobivene ljubaznošću Dr Guy Boivina, Centre de Recherche en Infectologie, Ste-Foy (Quebec), Kanada.

3.2.1. Molekularna dijagnostika

Molekularna detekcija HMPV-a iz NFS-a radila se je u Odsjeku za molekularnu dijagnostiku Službe za mikrobiologiju HZJZ-a, metodom RT-PCR-a u stvarnom vremenu za dokaz N gena.

Djelovi NFS-a čuvani na -70ºC odmrznuti su te se pristupilo izolaciji virusne RNK.

3.2.1.1. Izolacija virusne RNK

Nukleinska kiselina (RNK) je izolirana pomoću High Pure PCR Template Preparation kita (Roche Diagnostics, Penzberg, Njemačka) prema uputama proizvođača. U 200 µl uzorka, dodano je 40 µl Proteinaze K i 200 µl pufera (komercijalna otopina u kitu, sastav nepoznat) te inkubirano na 70ºC kroz 10 minuta. Zatim se dodalo 100 µl isopropanola te se cijela smjesa prebacila u filter kolonu (engl. *column,* sastavni dio

kita). Izolacija se sastoji od 5 koraka koji se obavljaju prebacivanjem uzorka u kolone i dodavanjem 500 µl pufera za ispiranje. Po svakom koraku uzorak se centrufugira 1-3 minute na brzini od 8000 do 13000 okretaja/minuti u mikrocentrifugi. Nukleinska kiselina se adsorbira za silika-gel kolone dok se proteini i ostali debris odvoji tijekom višestrukih ispiranja. U zadnjem koraku se ispire nukleinska kiselina pomoću 200 µl elucijskog pufera (komercijalna otopina u kitu, sastav nepozant). Tako izolirana nukleinska kiselina pročišćena je od proteina, nukleaza i drugih onečišćivača te se do daljnje obrade čuva na -20 ºC.

3.2.1.2. RT-PCR u stvarnom vremenu

Koristili smo se metodom RT-PCR- a u stvarnom vremenu koja se izvodi u jednom koraku (engl. *one-step*). Za izvođenje ove reakcije koristili smo *single-tube RT-PCR kit TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit* (Applied Biosystems, New Jersey, SAD). U reakciji smo se služili početnicama za detekciju N gena opisanim od Maertzdorf i sur. [127] koje smo minimalno modificirali tj. produžili za jedan nukleotid (nt). To su slijedeći oligonukleotidi i proba označena FAM fluorescentnom bojom:

1. Prednja početnica (engl. *forward primer*):

   5'-CATATAAGCATGCTATATTAAAAGAGTCTCA-3'

2. Stražnja početnica (engl. *reverse primer*):

   5'-CCTATTTCTGCAGCATATTTGTAATCAG-3'

3. Proba:

   5'-FAM-TGYAATGATGAGGGTGTCACTGCGGTTG-TAMRA-3'

Y u probi označava **C** ili **T** nukleotid što znači da polovica količine probe u reakcijskoj mješavini ima citozin na **Y** mjestu, a polovica timidin na **Y** mjestu.

Početnice se vežu na dio N gena od 94-og do 251-og nt (određeno prema referalnom soju Can 97-83; pristupni broj banci gena=NC 004148) što daje sekvencu duljine 157 nt. Reakcijska smjesa ukupne količine 25 µl sadržavala je 1µl izolirane RNK, 0,8 µM prednjih početnica, 0,8 µM stražnjih početnica i 0,25 µM probe. Reakcija reverzne transkriptaze odvijala se na 48ºC kroz 30 minuta, nakon čega je slijedila denaturacija i aktivacija na 95ºC kroz 10 minuta, a nakon toga 50 ciklusa PCR-a na temperaturama od 95ºC kroz 15 sekundi i 60ºC kroz 60 sekundi. Amplifikacija i detekcija učinjena je pomoću aparata ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, SAD).

3.2.2. Sekvenciranje i genska analiza sojeva

Pozitivni uzorci dobiveni metodom RT-PCR u stvarnom vremenu, testirani su konvencionalnom RT-PCR metodom za dokaz F gena, uz detekciju PCR produkata na gelu, te im je određen slijed nukleotida (uobičajen stručni naziv sekvenciranje) u Odjelu za molekularnu biomedicinu Imunološkog zavoda d.o.o. Zagreb.

3.2.2.1. Konvencionalni RT-PCR

Nakon ekstrakcije RNK učinjene po prethodno opisanoj metodi komplementarna DNK (cDNK) je sintetizirana iz RNK uz pomoć nasumičnih heksanukleotida (engl. *random hexamers*) koji imaju ulogu početnica i reverzne transkriptaze. Reakcijska mješavina sadržavala je 10 µl RNK, 50 U MuLV reverzne transkriptaze (Applied Biosystems, SAD), 10 U inhibitora Rnaze, 50 µM nasumičnih heksanukleotida (Applied Biosystems,SAD), 5 mM $MgCl_2$ i 10 mM svakog dNTP i 1x PCR pufera do volumena 20 µl. Reakcija se odvija ne temperaturi od 42ºC kroz 60 minuta, nakon čega slijedi temperatura od 99ºC kroz 5 minuta i hlađenje na 4ºC.

Tako sintetizirana cDNK je zatim podvrgnuta PCR reakciji. U reakciji smo se služili početnicama za detekciju F gena opisanim od Huck i sur. [29]. To su slijedeći oligonukleotidi:

4. Prednja početnica (engl. *forward primer*):

   5'-GTYAGCTTCAGTCAATTCAACAGAAG-3'

5. Stražnja početnica (engl. *reverse primer*):

   5'-CCTGTGCTGACTTTGCATGGG-3'

Početnice se vežu na dio F gena od 3626-og do 4152-og nt što daje sekvencu duljine 526 nt.

Reakcijska mješavina sastojala se od 1x PCR pufera (GE Healthcare, Švedska), 10 µM svakog pojedinog deoksinukleotida (dNTP), 0,25 mM $MgCl_2$, 0,25 µM od svake početnice i 5 U Taq polimeraze (GE Healthcare, Švedska). Uvjeti PCR reakcije su bili: 94ºC kroz 3 minute, zatim 40 ciklusa na temperaturama od 94ºC tijekom 30 sekundi, 56ºC kroz 30 sekundi i 72ºC kroz 2 minute, nakon čega je slijedila završna ekstenzija na temperaturi od 72ºC kroz 10 minuta. Korišten je aparat GenAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems).

3.2.2.2. Detekcija PCR produkata i pročišćavanje DNK odsječka

PCR produkti detektirani su elektroforezom u 1,5% gelu agaroze s Tris-boratnim puferom. Za to je korišteno 50µl svakog produkta PCR. Jakost napona koji smo koristili za elektroforezu iznosila je 5V po 1 cm duljine gela. Kao boju za vizualizaciju DNK odsječka u gelu koristili smo etidij bromid (fluorescentna boja koja se umeće između parova baza) te gel izložili UV osvjetljenju. Veličina odsječka određena je usporedbom sa standardiziranim DNK markerima (GE Healthcare, Švedska) koji su sadržavali DNK fragmente u istom rangu veličine prema onima koje smo očekivali.

Nakon toga smo dobivene odsječke izrezali iz gela te pročistili pomoću QIAQuick Gel Extraction Kit (Qiagen, Njemačka). Ukratko, izrezani odsječak smo stavili u epruvetu sa QB otopinom (komercijalna otopina u kitu, sastav nepoznat) te inkubirali na 50ºC kroz 10 minuta kako bi se agar otopio. Suspenzija sa otopljenim agarom prenešena je u filter tubicu nakon čega slijedi nekoliko koraka ispiranja i precipitacije. U zadnjem koraku DNK se eluira pomoću 50 µl vode. Ovako pročišćeni PCR produkti podvrgnuti su sekvenciranju.

3.2.2.3. Sekvenciranje

Sekvencijska reakcija postavljena je koristeći pročišćeni odsječak DNK, specifične početnice za F gen koje smo koristili i u konvencionalnoj RT-PCR metodi, i BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kita (Applied Biosystems, Foster City, Kanada) prema uputama proizvođača. Sekvenciranje i analiza dobivenih sekvenci učinjena je pomoću 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems) aparata. Budući se prvih 20-tak početnih nukleotida dobivenih sekvenciranjem ne može sa sigurnošću odrediti za filogenetsku analizu uzet je dio unutar našeg umnoženog odsječka duljine 471 nt koja se nalazi između 3673-og i 4143-og nt.

3.2.2.4. Analiza nukleotidnih odsječaka (sekvenca) F gena

Dobiveni podaci o nukleotidnim odsječcima pojedinih HMPV sojeva pohranjeni su u banci gena (engl. *GenBank*) Nacionalnog centra za biotehnološke informacije (NCBI, engl. *National Center for Biotechnology Information*) pod pristupnim brojevima od EU262947 do EU262976. Naše sekvence usporedili smo sa sekvencama koje se nalaze pohranjene u banci gena pomoću BLAST (engl. *Basic Local Alignment*

Search Tool) alata za analizu sekvenci (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). Svrstavanje sekvenci učinjeno je pomoću Clone Manager programskog paketa (Scientific&Educational Software). Sekvence pojedinih HMPV sojeva koje su uključene u detaljnije svrstavanje su (pristupni brojevi banci gena dani u zagradama): CAN98-75 (AY297748), CAN97-82 (AY145295), NL99-1 (AY525843), JPS03-240 (AY530095), CAN97-83 (AY297749), CAN00-14 (AY145299), NL00-1 (AF371337) i APV-C (AF36810). Filogenetska analiza učinjena je pomoću ClustalX 1.81 programa služeći se metodom združivanja genetski najsličnijih sojeva (engl. *neighbor-joining method*), filogenetsko stablo je izrađeno pomoću TreeView grafičkog programa.

3.2.3. Izolacija

Izolacija HMPV-a vršila se na LLC-MK2 staničnoj kulturi (kontinuirana stanična linija bubrega rhesus majmuna; ECACC 85062804, Feltham, Velika Britanija), uz dodatak tripsina u CO_2 inkubatoru TG 150 (Jouan, Španjolska) s rotirajućim bubnjem. Uzgoj i infekcija stanica rađena je u laboratoriju drugog stupnja zaštite (BSL-2, engl. Biosafety level 2) na Odjelu za virologiju HZJZ-a. LLC-MK2 stanice smo kultivirali u hranilištu za uzgoj stanica s 10% fetalnog telećeg seruma pripravljenog prema slijedećoj recepturi:

<u>Hranilište za uzgoj LLC-MK2 stanica:</u>

88 ml Earlovog minimalnog esencijalnog medija (MEM, engl. *minimum essential medium*)

10 ml fetalnog telećeg seruma

1 ml 2M HEPES-a

1 ml antibiotika (penicilin/streptomicin)

Kada su stanice postigle 90%-100% konfluentnost sloja (obično treći dan od nasađivanja) odbacili smo hranilište za uzgoj stanica, isprali smo stanice 3 X s puferiranom otopinom soli (PBS; engl. *phosphate buffered solution*) i inokulirali u staničnu kulturu klinički materijal u kojem smo dokazali HMPV metodom RT-PCR u stvarnom vremenu. Inokulum je iznosio 0,2 ml po epruveti ili 1 ml po „25 cm^2-bočici". Svaki uzorak inokuliran je u 3 epruvete. Inokuliranu staničnu kulturu smo stavili u CO_2 inkubator na 37ºC kroz 2 sata u rotirajući bubanj kako bi omogućili što bolju adsorpciju virusa na stanice. Nakon 2 sata u epruvete s inokuliranom staničnom kulturom smo dodali hranilište za rast virusa (1 ml hranilišta po epruveti, odnosno 6 ml po „25 cm^2 –bočici"). Nakon toga smo inokuliranu staničnu kulturu inkubirali na 37ºC kroz 14 dana u običnom termostatu, te dnevno mikroskopirali na pojavu CPU. Svaka tri do četiri dana kada bi došlo do zakiseljenja hranilišta (žuta boja), ono bi se promijenilo hranilištem za rast virusa.

Hranilište za rast virusa:

88 ml Earlovog MEM-a

10 ml 1% goveđeg serumskog albumina

1 ml 2M HEPES -a

1 ml antibiotika (penicilin/streptomicin)

0,5 ml 40% glukoze

0, 1 ml tripsina (iz svinjskog pankreasa za staničnu kulturu)

Nakon 14 dana inkubacije stanične kulture bi se zamrznule na -70ºC kroz dva sata te se odmrznuti supernatant inokulirao na svježe pripravljenu staničnu kulturu (1. pasaža). Svi uzorci praćeni su tijekom dvije pasaže na staničnoj kulturi. Supernatante inokuliranih staničnih kultura provjeravali smo na prisutnost HMPV-a pomoću metode

RT-PCR u stvarnom vremenu, 7-14 dana inkubacije stanične kulture tijekom svake pasaže. Za potvrdu HMPV infekcije u staničnoj kulturi koristili smo se IFA metodom za dokaz HMPV antigena.

IFA za dokaz HMPV antigena u staničnoj kulturi:

Nakon 14 dana inkubacije iz jedne od inficiranih epruveta odbacili smo hranilište, tijekom 3 minute stanice izložili tripsinu te ih resuspendirali u 2-3 ml PBS-a. Ovu suspenziju centrifugirali smo na 1500 okretaja/min 10 minuta kako bi dobili sediment koji smo onda resuspendirali u maloj količini PBS-a te nakapali na predmetno stakalce. Nakon što su se stanice osušile fiksirane su hladnim acetonom tijekom 10 minuta. Fiksirane stanice inkubirali smo na 37ºC kroz 30 minuta s monoklonskim protutijelima (25 µl po jažici) za N protein HMPV-a (monoklonska protutijela dobivena ljubaznošću Dr Ann R. Falsey, Infectious Diseases Unit, Rochester General Hospital, University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester, NY, SAD). Slijedilo je ispiranje (3 x 5 minuta u PBS-u) te inkubacija s antimišjim protutijelima konjugiranim s fluoresceinom (Light Diagnostics, Chemicon International, Inc., Temecula, SAD), zatim ponovo faza ispiranja te nakon toga sušenje stakalca i uklapanje s pokrovnim staklacem i glicerolom. Ovako pripremljen preparat pregledavao se pomoću fluorescentnog mikroskopa (Olympus) koristeći povećanje od 400 X. Pozitivan nalaz bile su barem dvije neoštećene stanice s vidljivim intracitoplazmatskim inkluzijama.

3.3. Laboratorijska dijagnostika drugih respiratornih virusa

Detekcija RSV-a, adenovirusa, virusa influence (tip A i B) i parainfluence (tip 1, 2 i 3) izvodila se je na Odjelu za virologiju HZJZ-a iz sedimenta kliničkog materijala pomoću komercijalnih monoklonskih protutijela u DFA testu prema uputama proizvođača (Light Diagnostics, Chemicon International, Inc., Temecula, SAD).

3.4. Kliničko-laboratorijske metode

Za ispitanike sa dokazanom HMPV infekcijom, iz povijesti bolesti i dnevnih lista bolesnika, prikupili su se klinički parametri prema obrascu prikazanom u tablici 8. Vitalne funkcije (respiratorna frekvencija i puls) mjereni su u snu djeteta, a ako je dijete dobivalo kisik, vitalne funkcije mjerene su nakon što je bilo 10 minuta bez kisika. Elementi kompletne krvne slike određeni su u automatskom brojaču Sysmex XT-1800 i Sysmex XT-2000. Brzina sedimentacije eritrocita određena je prema Westergren metodi. CRP je određen imunoprecipitacijski, mjeren turbidimetrijskom ili nefelometrijskom metodom (Olympus i Dade Behring). Saturacija kisika u perifernoj arterijskoj krvi mjerena je perkutanim pulsoksimetrom. Vrijednosti vitalnih funkcija i krvne slike uspoređene su sa standardnim vrijednostima za dob djeteta [150,151]. Izolacija bakterija iz brisa ždrijela i nazofarinksa učinjena je standardnim mikrobiološkim postupcima na obogaćenim hranjivim podlogama [152,153]. Izolacija *Streptococcus pyogenes* učinjena je na krvnom agaru s dodatkom 5% konjske krvi, a identifikacija prema testu inhibicije rasta u odnosu na glukozni odnosno bacitracinski disk i /ili koaglutinacijom. Bakterije iz nazofarinksa izolirane su na krvnom agaru s dodatkom 5% konjske ili ljudske krvi uz dodatak kolistin/vankomicin diska i stafilokokne crte.

Tablica 8. Obrazac za prikupljanje kliničkih podataka za HMPV inficiranu djecu

PROJEKT MZOS BR. 0005 002 – HMPV INFEKCIJE	
A) OPĆI I ANAMNESTIČKI PODACI	
1.	Ime i prezime
2.	Datum rođenja
3.	Spol
4.	Prvi dan bolesti (ARI)
5.	Dan primitka u bolnicu
6.	Dan otpusta
7.	Izvor infekcije
8.	Atopijska osobna i obiteljska anamneza
9.	Predliježeće bolesti
10.	Dan uzimanja NFS-a za virološku pretragu u odnosu na početak bolesti
B) SIMPTOMI I NALAZI ARI	
1.	Kašalj (Intenzitet: slabi+, srednji ++, jaki+++)
2.	Iscjedak iz nosa (nema, sluz, gnoj)
3.	Otežano disanje
4.	Maksimalna temperatura ˚C
5.	Maksimalna respiratorna frekvencija / min
6.	Maksimalni puls / min
7.	Saturacija kisika u perifernoj arterijskoj krvi / %
8.	Nalaz na ždrijelu (b.o., kataralno, crveno)
9.	Nalaz na tonzilama (b.o., kataralno, crveno, eksudat)
10.	Nalaz na bubnjiću (b.o., crven, skraćenog refleksa)
11.	Auskultacijski nalaz nad plućima: uredan hropci zviždanje (sipnja, engl. *wheezing*) – trajanje / dani krepitacije slabije čujno disanje
12.	Rendgenski nalaz pluća: uredan bronhi ispunjeni sekretom zadebljana stijenka bronha peribronhalni infiltrat hiperinflacija atelektaza inhomogeni pneumonični infiltrat intersticijska pneumonija lobarna pneumonija
13.	Leukociti (ukupni, neutrofili, limfociti)
14.	Sedimentacija
15.	C- reaktivni protein
16.	Bakteriološki nalaz brisa ždrijela
17.	Bakteriološki nalaz brisa nazofarinksa

nastavak tablice 8.

C) LIJEČENJE	
1.	Samo antipiretik
2.	Antibiotik
3.	Selektivni agonisti beta-2 receptora (bronhodilatatori)
4.	Racemični epinefrin
5.	Kortikosteroidi
6.	Nadoknada kisika (trajnje / dani)
7.	Umjetna respiracija
D) KONAČNA DIJAGNOZA ARI	
1.	IGDS: respiratorni febrilni katar (rhinitis, pharingitis, rhinopharingitis, tonsilitis rhinopharingotracheitis) sindrom krupa (laryngitis, rhinolaryngotracheitis) upala srednjeg uha (otitis media acuta)
2.	IDDS: bronhitis bronhiolitis pneumonija

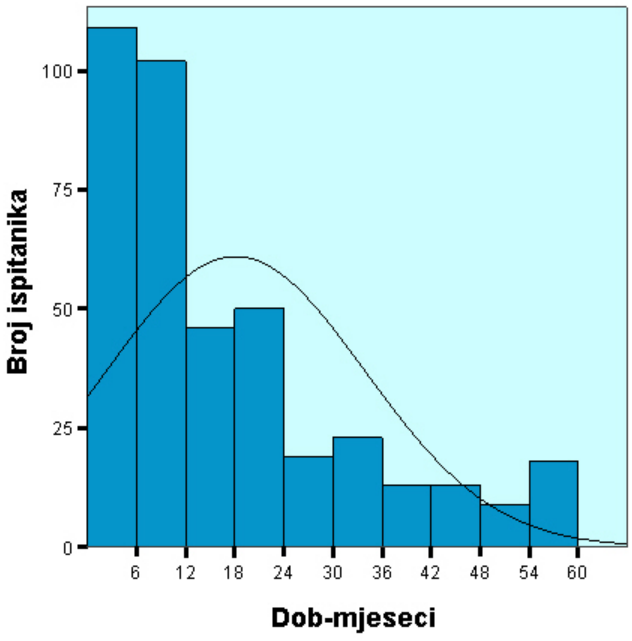
3.5. Statistička analiza podataka

Učestalost HMPV i drugih virusnih respiratornih infekcija prikazana je s pripadajućim granicama pouzdanosti računatih Waldovom metodom. Osnovne značajke ispitivane populacije, distribucije kao i klinički pokazatelji HMPV infekcije prikazani su grafički i tablično. Statistička značajnost određena je Mann-Whitney, Kruskall Wallis, χ^2 testom i testom razlike između proporcija na razini značajnosti od 95% [154]. Hipoteza je testirana pomoću dva jednosmjerna (engl. *one-tailed*) Z-test-a kao normalna aproksimacija binomijalne, odnosno Poisson-ove distribucije [155]. Unos i obrada podataka provedeni su pomoću dva programska paketa: SPSS ver.14.01(licenca HZJZ, Branko Kolarić, SPSS ID:729038) i STATISTICA for Windows (StatSoft, Inc. Tulsa, OK, SAD).

4. REZULTATI

4.1. Ispitanici

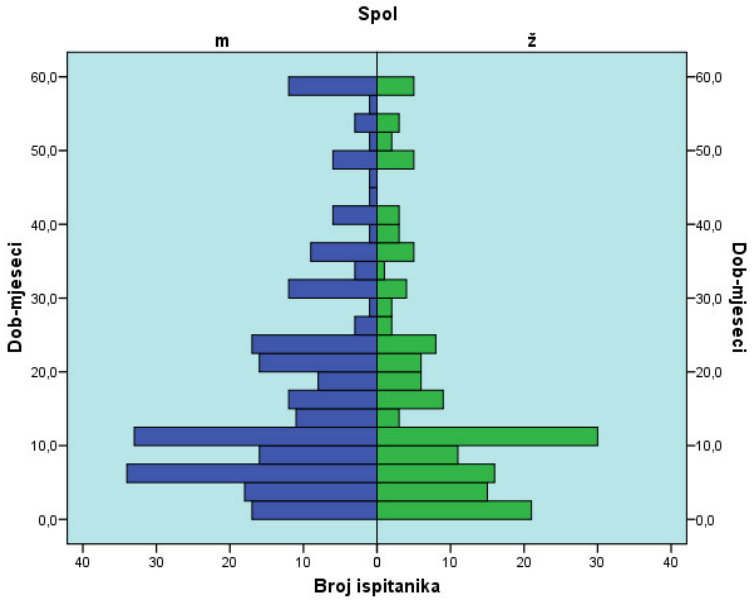
U razdoblju od 01. 12. 2005. god do 31. 3. 2006. god. prikupljeni su klinički uzorci - NFS od 402 hospitalizirane djece mlađe od 5 godina s ARI iz dvije zdravstvene ustanove od čega je 219 bolesnika (54%) bilo iz Klinike za dječje bolesti Zagreb, a 183 (46%) iz Klinike za infektivne bolesti „Dr Fran Mihaljević“. Od 402 djece 242 (60%) bilo je muškog spola i 160 (40%) ženskog spola. Srednja vrijednost dobi svih ispitanika bila je 18,1 ± 15,8 mjeseci, medijan 12 mjeseci, a raspon dobi 59,5 mjeseci. Najmlađe dijete bilo je staro 0,5 mjeseci, a najstarije 60 mjeseci (slika 7).



Slika 7. Distribucija prema dobi ispitanika (hospitalizirana djeca ≤ 5 god. s ARI)

U dobi do 6 mjeseci starosti bilo je 79/402 (19,7%) bolesnika, od 6 mjeseci do 1 god. starosti 95/402 (23,6%), od 1-2 god. 111/402 (27,6%) i od 2-5 god. 117/402 (29,1%) bolesnika. Dobna distribucija odstupala je značajno od normalne distribucije

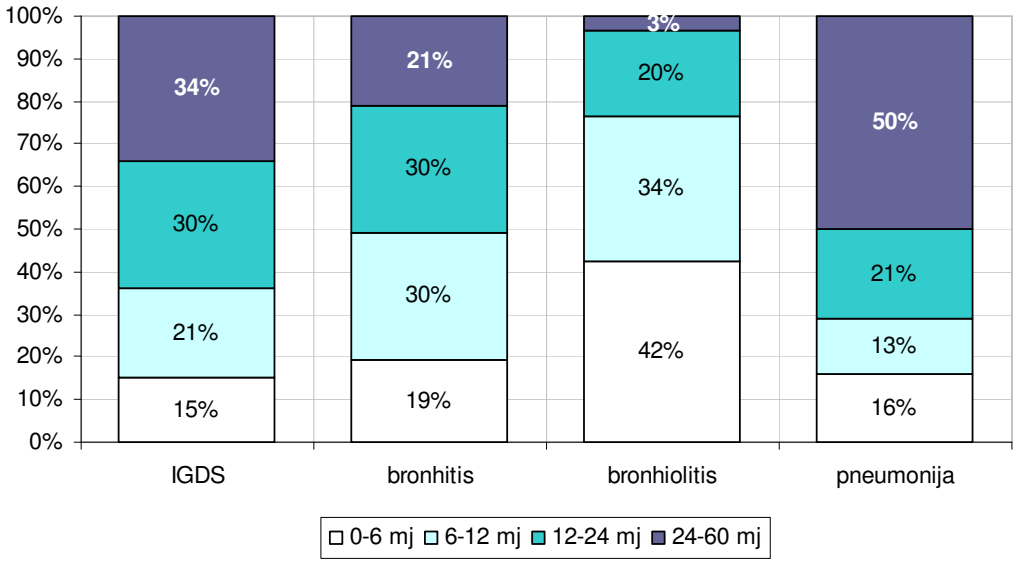
(Kolmogorov-Smirnovljev Z=3,521, P<0,001). Distribucija prema dobi i spolu prikazana je na slici 8.



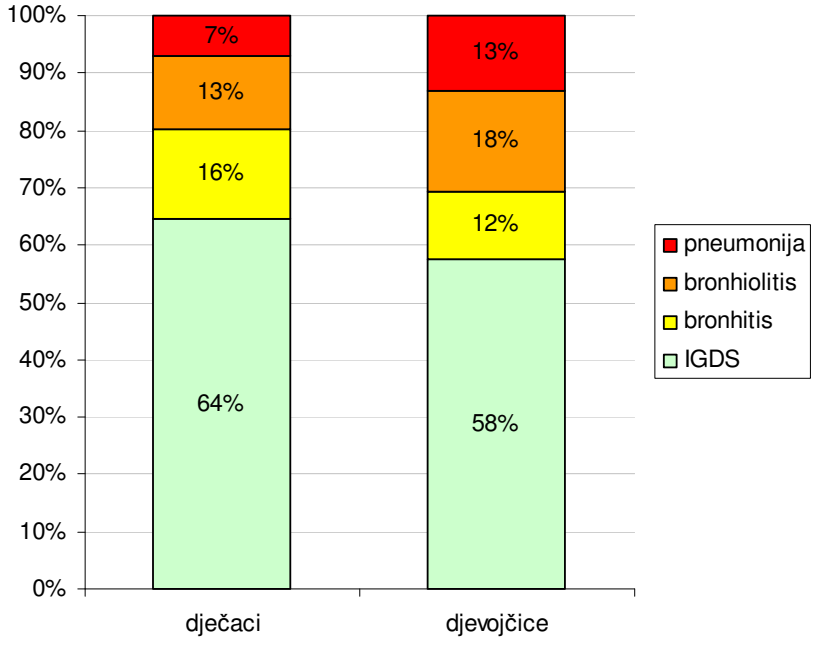
Slika 8. Distribucija prema spolu i dobi ispitanika (hospitalizirana djeca ≤ 5 god. s ARI)

S obzirom na dijagnozu 248/402 (62%) bolesnika imalo je IGDS, a 154/402 (38%) bolesnika IDDS. U skupini s IDDS 57/402 (14%) djece imalo je dijagnozu bronhitisa, 59/402 (15%) djece imalo je bronhiolitis i 38/402 (9%) djece imalo je dijagnozu pneumonije. Na slici 9 prikazana je raspodjela s obzirom na dijagnozu i dob ispitanika a na slici 10 s obzirom na dijagnozu i spol ispitanika. Ispitanici su se značajno razlikovali s obzirom na dob i dijagnozu bolesti (X^2=49,1,df=9,P<0,001). Dijagnoza pneumonije (19/38; 50%) i IGDS (84/248; 34%) je bila najzastupljenija u dobnoj skupini od 2 do 5 god., a bronhiolitis u dobnoj skupini do 6 mjeseci starosti (25/59, 42%). Najčešća dijagnoza kod oba spola bila je IGDS, nešto manje kod djevojčica (92/160; 58%), nego kod dječaka (156/242; 64%). Djevojčice su nešto češće oboljevale od pneumonije (21/60; 13% vs. 17/242; 7%) i bronhiolitisa

(28/160;18% vs 31/242;13%). Razlike u raspodjeli dijagnoza prema spolu nisu statistički značajne (X^2=6,99 df=3, P=0,07).



Slika 9. Hospitalizirana djeca ≤ 5 god. s ARI prema dijagnozi i dobi



Slika 10. Hospitalizirana djeca ≤ 5 god. s ARI prema spolu i dijagnozi

4.2. Učestalost infekcije humanim metapneumovirusom i drugih virusnih respiratornih infekcija

Od 402 bolesnika prikupljeno je 403 NFS-a od kojih su dva NFS-a pripadala jednom bolesniku prikupljena u razmaku od 7 dana. U oba NFS-a uzeta od istog bolesnika dokazan je HMPV te je ovaj bolesnik prilikom određivanja učestalosti virusa obrađen kao jedna HMPV infekcija. Učestalost HMPV-a dokazana je metodom RT-PCR u realnom vremenu, a učestalost drugih respiratornih virusa metodom DFA za dokaz antigena u kliničkom uzorku.

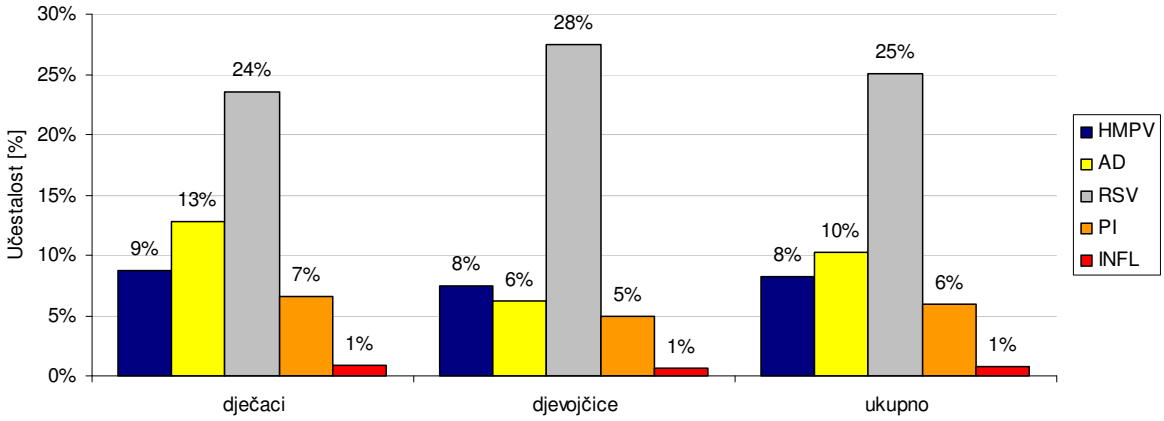
Virusna etiološka dijagnoza postavljena je u 195/402; 49% bolesnika, dok u 207/402; 51% bolesnika nije dokazan niti jedan od traženih virusa. Od toga infekciju uzrokovanu samo jednim virusom imalo je 188/402; 47% bolesnika, a 7/402; 2% bolesnika imalo je istodobnu infekciju (koinfekciju) uzrokovanu s dva virusa. Po jedan bolesnik imali su koinfekciju HMPV i PI-3, HMPV i RSV, HMPV i AD, RSV i PI-3, i tri bolesnika koinfekciju RSV i AD.

Tablica 9. Učestalost virusnih infekcija u hopitalizirane djece ≤ 5 god. s ARI (N=402) uz 95% interval pouzdanosti (95% CI); HMPV= humani metapnumovirus, RSV=respiratorni sincicijski virus, AD=adenovirus, PI=virusi parainfluence, INFL=virusi influence

Infekcija	Učestalost		95% CI	
	N	%		
HMPV	33	8,2	5,5	10,9
RSV	101	25,1	20,9	29,4
AD	41	10,2	7,2	13,2
PI-1	6	1,5	0,3	2,7
PI-2	2	0,5	0,0	1,2
PI-3	16	4,0	2,1	5,9
INFL A	3	0,7	0,0	1,6
INFL B	0	0,0	-	-
PI-1 + PI-2 + PI-3	24	6,0	3,7	8,3
INFL A + INFL B	3	0,7	0,0	1,6

Najčešće dokazan virus u naših bolesnika bio je RSV (101/402; 25,1%), slijedi AD (41/402; 10,2%), zatim HMPV (33/402; 8,2%), virusi parainfluence (24/402; 6%) i virus influence tip A (3/402; 0,7%). Virus influence tip B nije u navedenom razdoblju dokazan niti u jednog bolesnika. Učestalost virusnih infekcija prikazan je u tablici 9 i slici 11.

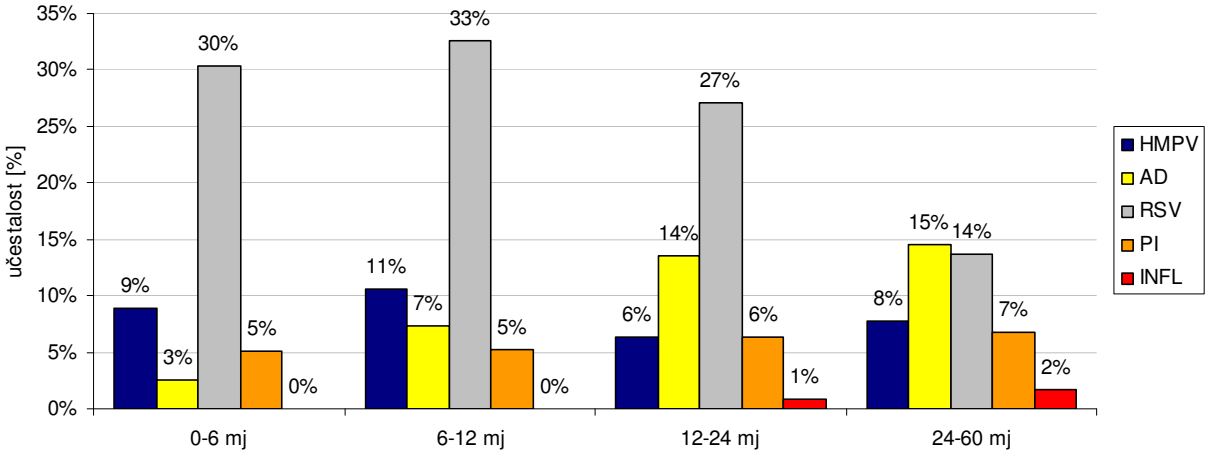
Spol. Od 101 RSV-om inficiranih bolesnika 57 ih je bilo muškog i 44 ženskog spola, AD-om je bilo inficirano 31 dječaka i 10 djevojčica, HMPV-om 21 dječaka i 12 djevojčica, PI virusima 16 dječaka i 8 djevojčica i INFL A virusom 2 dječaka i 1 djevojčica (slika 11). Grupe djece inficirane pojedinim virusom nisu se značajno razlikovale u odnosu na spol (X^2=3,760, df=4, P=0,439).



Slika 11. Učestalost virusnih infekcija prema spolu u hopitalizirane djece ≤ 5 god. s ARI

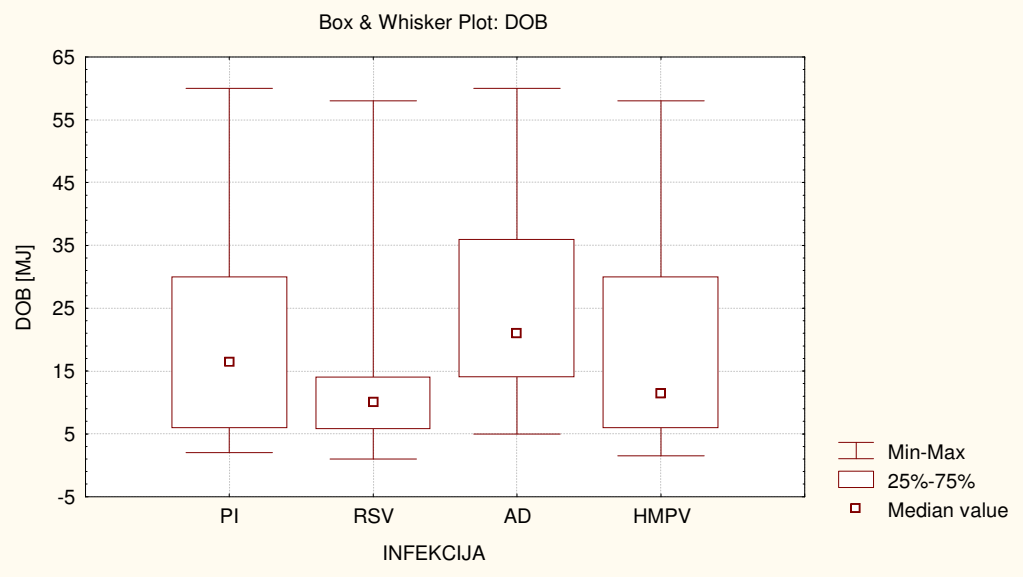
Dob. U djece stare do 1 god. života najčešće dokazan virus bio je RSV (55/174; 32%), zatim slijedi HMPV (17/174; 10%) te virusi AD (9/174; 5%) i virusi PI (9/174; 5%) sa podjedankom učestalosti. U dobnoj skupini od 1 do 2 god. života najčešći uzročnik virusnih ARI također je RSV (30/111; 27%), zatim slijedi AD (15/111; 14%)

te HMPV (7/111; 6%) i virusi PI (7/111; 6%) sa podjednakom učestalosti. U dobi od 2-5 god. najčešći uzročnik je AD (17/117; 15%), zatim RSV (16/117; 14%), a slijede redom HMPV (9/117; 8%), PI (8/117; 7%) i INFL A (2/117; 2%) (slika 12).



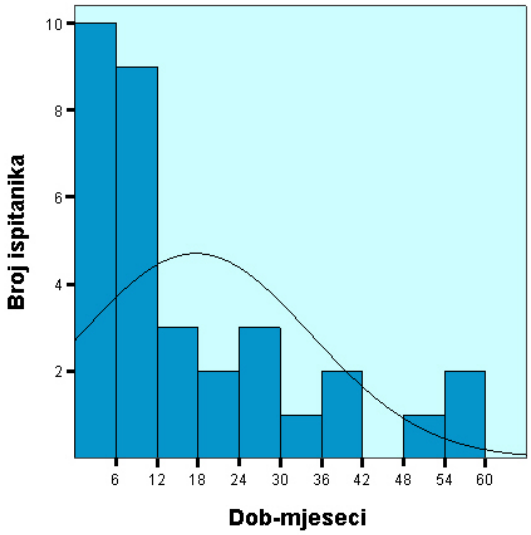
Slika 12. Učestalost virusnih infekcija u odnosu na dob u hopitalizirane djece ≤ 5 god. s ARI

S porastom dobi manje je RSV infekcija, dok raste broj infekcija uzrokovanih adenovirusom. Broj HMPV infekcija pokazuje sličnu učestalost u svim dobnim skupinama, dok broj infekcija uzrokovan virusima PI pokazuje lagani porast s dobi bolesnika. Grupe djece s pojedinom infekcijom značajno su se razlikovale po dobi (Kruskall Wallis H=25,423, df=4, P<001) (slika 13). Djeca inficirana AD-om bila su starija od djece oboljele od RSV-a i HMPV-a (Mann-Whitney U=816, P=0,001 i U=382, P=0,03). Djeca inficirana HMPV-om, RSV-om i PI virusima nisu se međusobno razlikovala po dobi (Mann-Whitney U=1288,5; P=0,242, U=553,0; P=0,48 i U =296,0; P=0,53).



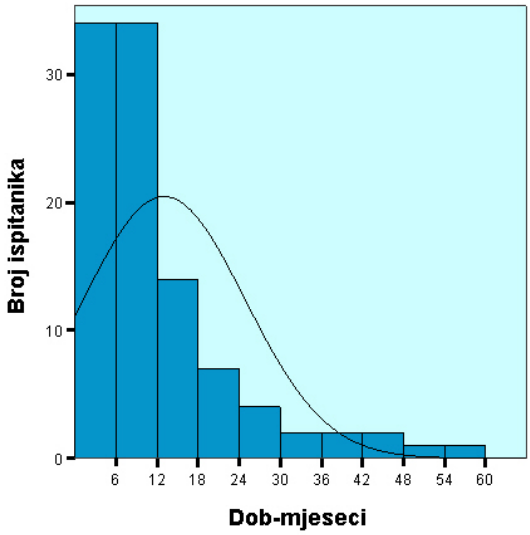
Slika 13. Box-plot prikaz virusnih infekcija u odnosu na dob bolesnika; zbog malog broja oboljelih od virusa INFL A u ispitivanom razdoblju, isti nisu uključeni u prikaz

Srednja vrijednost dobi HMPV-om inficirane djece iznosila je 18,4 ± 17,3 mjeseci, medijan 11,5 mjeseci, a raspon dobi 56,5 mjeseci. Najmlađe dijete inficirano HMPV-om bilo je staro 1,5 mjeseci, a najstarije 58 mjeseci (slika 14).



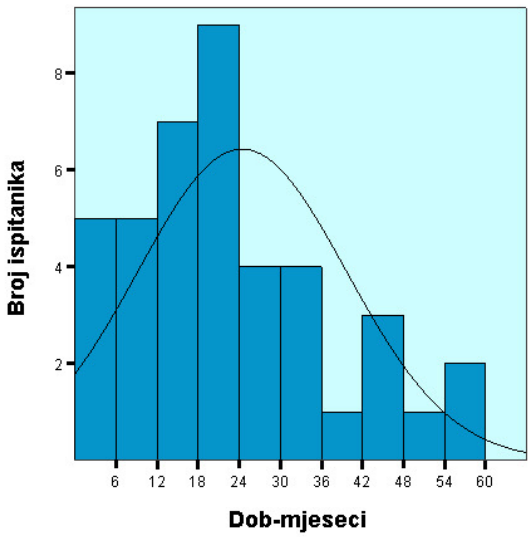
Slika 14. Distribucija po dobi djece s HMPV infekcijom

Srednja vrijednost dobi RSV-om inficirane djece iznosila je 13,0 ± 11,8 mjeseci, medijan 10,5 mjeseci, a raspon dobi 57 mjeseci. Najmlađe dijete inficirano RSV-om imalo je 1 mjesec, a najstarije 58 mjeseci (slika 15).



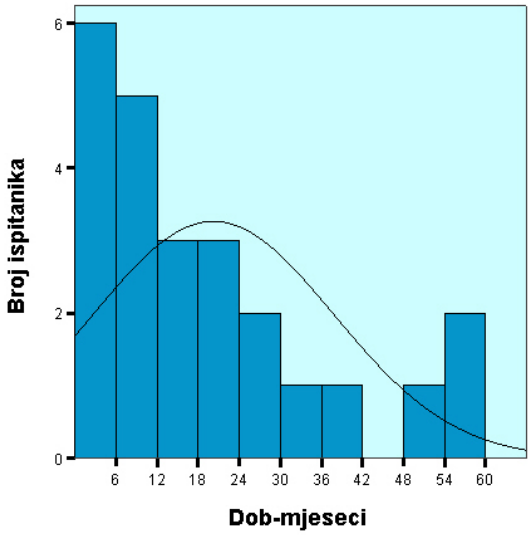
Slika 15. Distribucija po dobi djece s RSV infekcijom

Srednja vrijednost dobi AD virusom inficirane djece iznosila je 24,1 ± 15,6 mjeseci, medijan 20,5 mjeseci, a raspon dobi 57 mjeseci. Najmlađe dijete inficirano AD-om bilo je staro 3 mjeseca, a najstarije 60 mjeseci (slika 16).



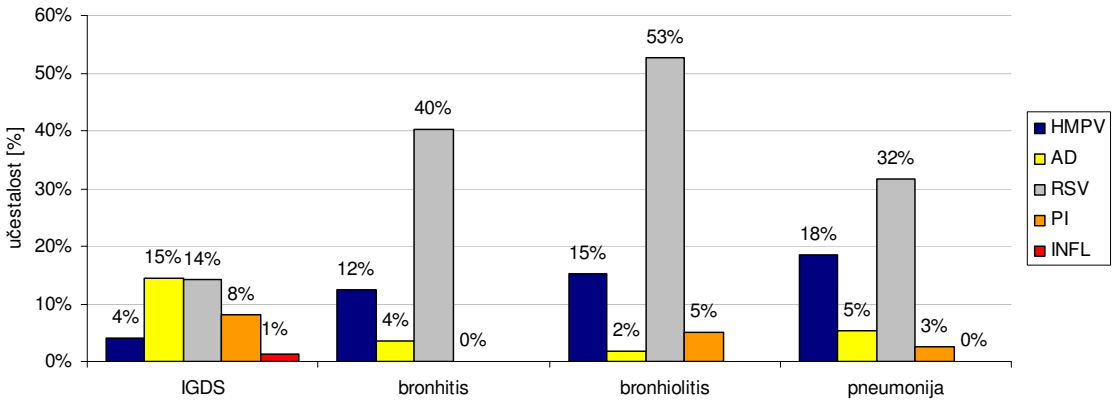
Slika 16. Distribucija po dobi djece s adenovirusnom infekcijom

Srednja vrijednost dobi djece inficirane PI virusima tip 1,2 i 3 iznosila je 20,2 ±17,6 mjeseci, medijan 14 mjeseci, a raspon dobi 58 mjeseci. Najmlađe dijete inficirano AD-om bilo je staro 3 mjeseca, a najstarije 60 mjeseci (slika 17).



Slika 17. Distribucija po dobi djece inficirane virusima parainfluence

Dijagnoza. Na slici 18 prikazana je učestalost virusnih infekcija prema dijagnozi (uključene dvojne virusne infekcije). RSV je uzrokovao 14,1% (35/248) IGDS-a i 42,8% (66/154) IDDS-a, AD 14,5% (36/248) IGDS-a i 3,2% (5/154) IDDS-a, HMPV 4% (10/248) IGDS-a i 15% (23/154) IDDS-a, PI virusi tipa 1,2 i 3 8% (20/248) IGDS-a i 2,6% (4/154) IDDS-a, i INFL A virus samo IGDS (3/248; 1,2%).



Slika 18. Učestalost virusnih infekcija u odnosu na dijagnozu bolesti u u hopitalizirane djece ≤ 5 god. s ARI

HMPV značajno češće uzrokuje IDDS u odnosu na AD i PI viruse (Mann-Whitney U=246, P<0,001) ali ne i u odnosu na RSV (Mann-Whitney U=1440, P=0,684). RSV i HMPV su značajni uzročnici IDDS-a, a AD i PI virusi IGDS-a.

U tablici 10 prikazani su rezultati testiranja razlike između dviju proporcija između HMPV i ostalih virusa prema pojedinom kliničkom sindromu odnosno dijagnozama.

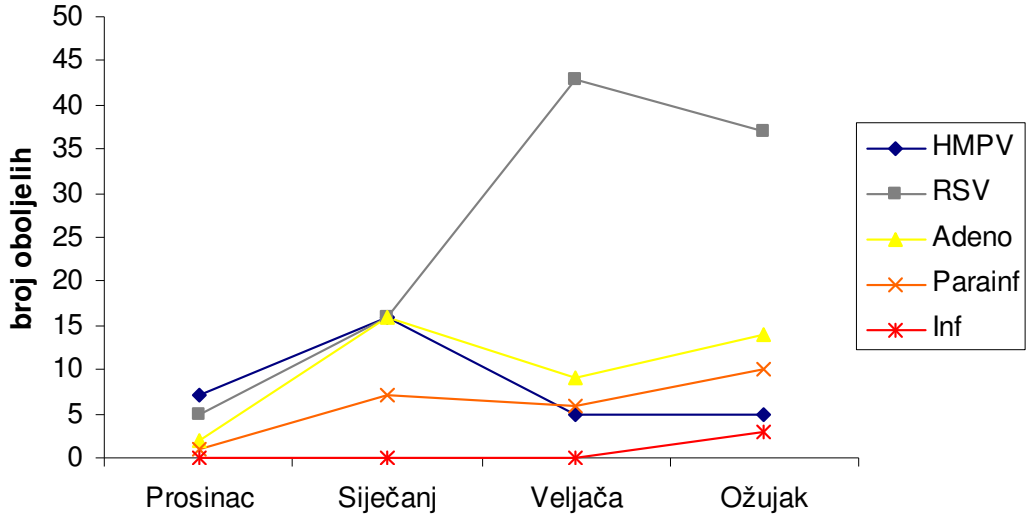
Tablica 10. Rezultati testa razlike između dviju proporcija sa pripadajućim P vrijednostima za pojedine infekcije u odnosu na klinički sindrom; prilikom izračuna izostavljeni slučajevi dvojnih virusnih infekcija - koinfekcija

Dijagnoza ARI	**HMPV pozitivni** N=30	**RSV pozitivni** N=96	**P**
IGDS	9 (30%)	31 (32%)	0,832
bronhitis	6 (20%)	22 (23%)	0,734
bronhiolitis	8 (27%)	31 (32%)	0,611
pneumonija	7 (23%)	12 (13%)	0,192

Dijagnoza ARI	**HMPV pozitivni** N=30	**AD pozitivni** N=37	**P**
IGDS	9 (30%)	32 (86%)	**<0,001**
bronhitis	6 (20%)	2(5%)	0,061
bronhiolitis	8 (27%)	1(3%)	**0,006**
pneumonija	7 (23%)	2(5%)	**0,033**

Dijagnoza ARI	**HMPV pozitivni** N=30	**PI pozitivni** N=22	**P**
IGDS	9 (30%)	19 (86%)	**<0,001**
bronhitis	6 (20%)	0(0%)	**0,031**
bronhiolitis	8 (27%)	2(9%)	0,111
pneumonija	7 (23%)	1(5%)	0,080

Pojavnost virusnih infekcija. Učestalost pojedinih infekcija prema vremenu pojavljivanja prikazana je na slici 19. Vršak pojavnosti RSV infekcije bio je u veljači (43/101; 42,6%) dok je vršak pojavnosti HMPV infekcije bio u siječnju (16/33; 48,5%). Virusi influence u zimskoj sezoni 2005/2006 dokazani su tek krajem ožujka, što objašnjava nisku učestalost ove infekcije u ispitivanom razdoblju. Pojavnost AD i PI virusa nije se značajno mijenjala tijekom navedenog razdoblja.



Slika 19. Učestalost virusnih infekcija po mjesecima u zimskoj sezoni 2005/2006

4.3. Kliničko–laboratorijski nalazi bolesnika s infekcijom humanim metapneumovirusom

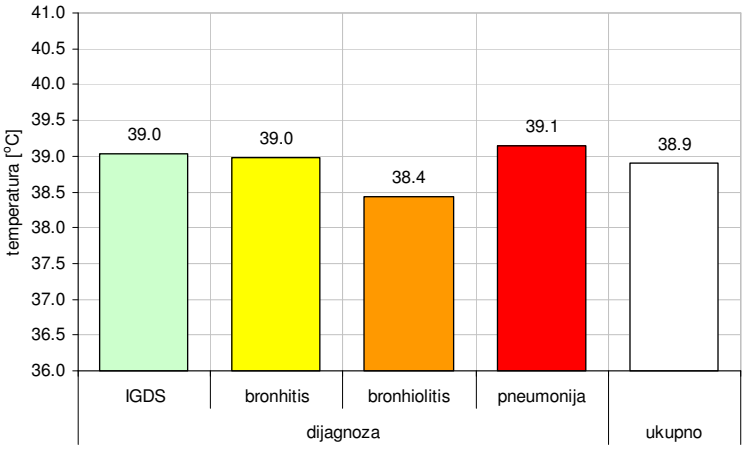
Kliničko laboratorijski nalazi HMPV infekcije prikazani su za 30 bolesnika inficiranih samo s HMPV-om. Troje bolesnika bilo je koinficirano HMPV-om i nekim drugim virusom i opisani su posebno.

Predliježeću bolest imalo je 13/30; 43% HMPV-om inficiranih pacijenata, od toga je prematurusa bilo 5/30; 17%, kroničnu neurološku bolest je imalo 4/30; 13%, anemiju 4/30; 13%, a po jedan bolesnik je imao vezikoureteralni odnosno gastroezofagealni refluks. Atopijska obiteljska anamneza bila je pozitivna u 3 (10%) bolesnika.

Od 30 bolesnika sa HMPV infekcijom 9/30; 30% imalo je IGDS, a 21/ 30; 70% IDDS, od čega 6/30; 20% bronhitis, 8/30; 27% bronhiolitis i 7/30; 23% pneumoniju.

4.3.1. Simptomi, fizikalni i rendgenski nalaz u bolesnika s infekcijom humanim metapneumovirusom

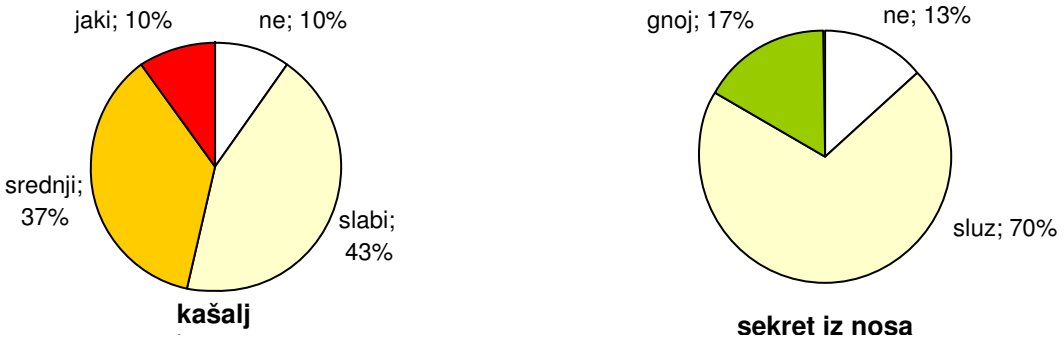
Temperatura. Povišenu temperaturu iznad 38,0ºC imalo je 23/30; 77% bolesnika. S IGDS povišenu temperaturu imalo je 8/9; 89% bolesnika, s bronhitisom 5/6; 83% bolesnika, s bronhiolitisom 4/8; 50% bolesnika i s pneumonijom 6/7; 86% bolesnika. Prosječna vrijednost temperature prema dijagnozama prikazana je na slici 20.



Slika 20. Prosječna vrijednost temperature u febrilnih bolesnika s HMPV infekcijom

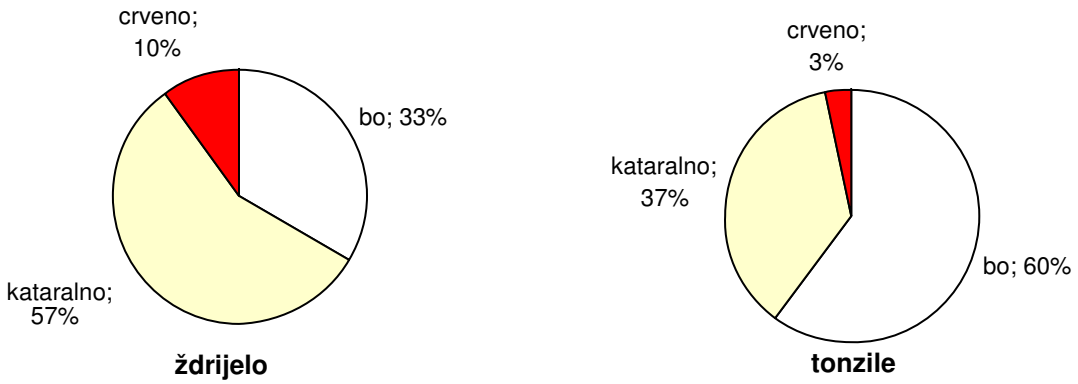
Kašalj. Najizraženiji simptom u naših bolesnika bio je kašalj koji je bio prisutan u 27/30; 90% HMPV –om inficiranih pacijenata.

Iscjedak iz nosa. Iscjedak iz nosa bio je prisutan u 26/30; 86% HMPV-om inficiranih pacijenata. Na slici 21 prikazana je izraženost kašlja kao i prisutnost sekreta iz nosa.



Slika 21. Izraženost kašlja i sekreta iz nosa u bolesnika s HMPV infekcijom

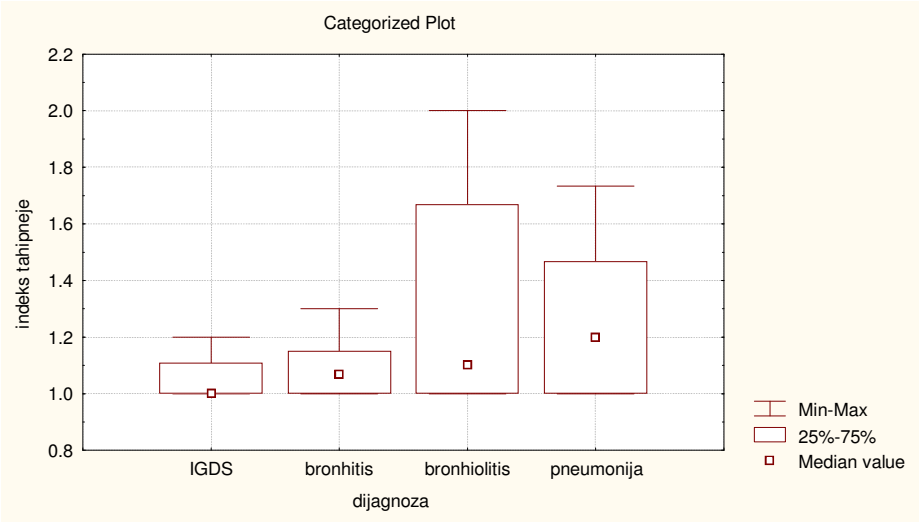
Ždrijelo i tonzile. U većine bolesnika ždrijelo je bilo kataralno promijenjeno (17/30;57%) dok je nalaz na tonzilama većinom bio uredan (slika 22).



Slika 22. Nalaz ždrijela i tonzila u bolesnika s HMPV infekcijom; bo=bez osobitosti

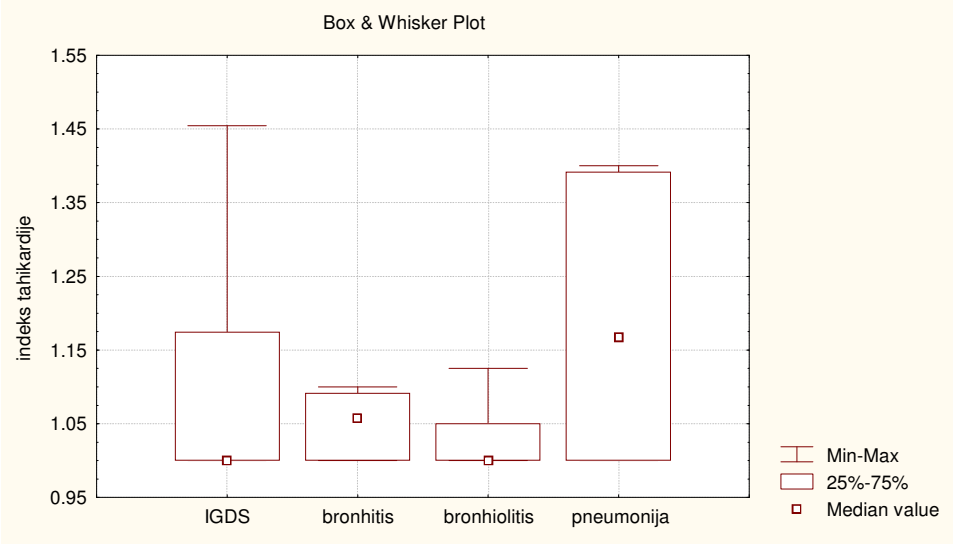
Nalaz na bubnjiću. Patološki nalaz na bubnjiću (crvenilo i/ili skraćen refleks) u smislu upale srednjeg uha (OMA, lat. *otitis media acuta)* imalo je 8/30; 27% dok je uredan otoskopski nalaz imalo 22/30; 73% naših bolesnika. U troje djece sa OMA u brisu nazofarinksa izoliran je *Streptococcus pneumoniae,* u jednog djeteta *Moraxella catarrhalis,* dok je u preostale djece s OMA izolirana fiziološka flora.

Respiratorna frekvencija i puls. Povišene vrijednosti respiratorne frekvencije imalo je 18/30; 60% bolesnika, a povišene vrijednosti pulsa 14/30; 47% bolesnika sa HMPV infekcijom. Kako bi se mogla usporediti jačina tahipneje i tahikardije izračunat je indeks tahipneje (slika 23) i indeks tahikardije (slika 24). Indeks tahipneje i tahikardije izračunat je kao kvocijent broja udaha u minuti odnosno otkucaja srca u minuti i gornje granice normalnog raspona respiratorne frekvencije odnosno gornje granice normalnog raspona pulsa za dob. U slučajevima kad je ovaj broj manji od 1 (respiratorna frekvencija odnosno puls niži od maksimuma normalnog raspona za dob) indeks iznosi 1.



Slika 23. Indeks tahipneje za pojedine dijagnoze u djece s HMPV infekcijom

Iz slike 23 vidi se da većina djece sa IGDS nije imala tahipneju, a ako je ona postojala njene vrijednosti bile su za 20% više od gornje granice normale, dok su djeca sa bronhiolitisom većinom imala tahipneju a njene vrijednosti su bile i do 100% veće od gornje granice normalnih vrijednosti za dob.

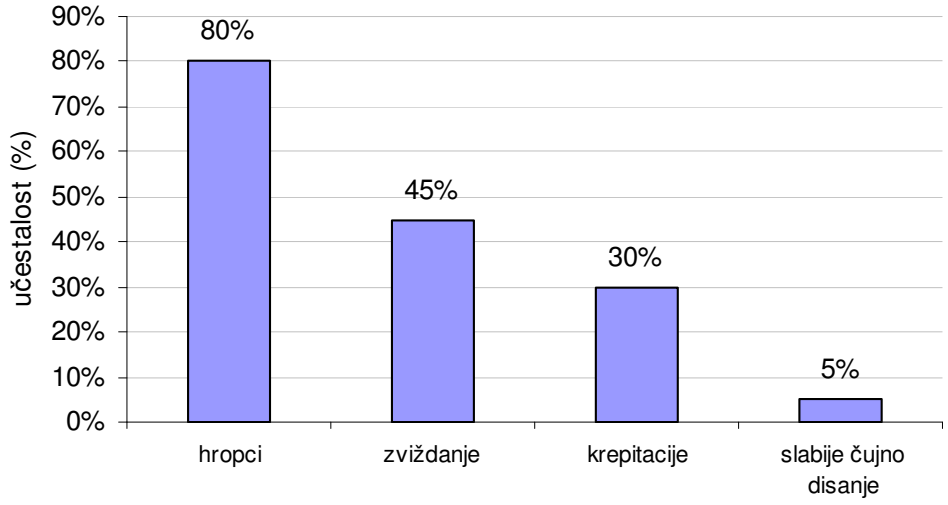


Slika 24. Indeks tahikardije za pojedine dijagnoze u djece s HMPV infekcijom

Slika 24 pokazuje da većina djece sa IGDS i bronhiolitisom nije imala tahikardiju, s time da su kod IGDS-a postojali slučajevi kada je puls značajno odstupao od gornje

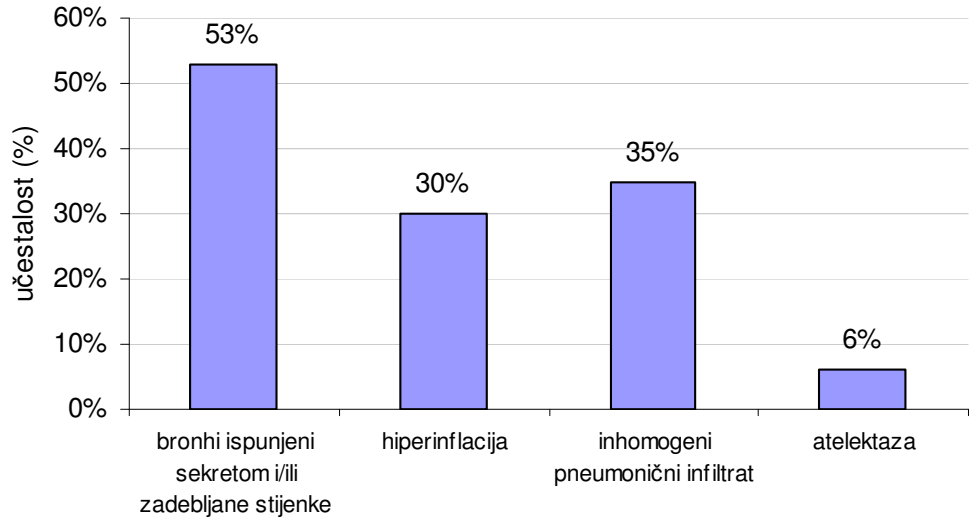
granice normale za dob. Većina djece sa pneumonijom i bronhitisom imala je tahikardiju, koja je kod pneumonije značajno odstupala od gornje granice normalnih vrijednosti.

Auskultacijski nalaz nad plućima. Patološki auskultacijski nalaz na plućima imalo je 20/30;67% naših bolesnika, a 10/30;33% je imalo uredan auskultacijski nalaz. Pojedinačni auskultatorni nalazi u bolesnika s patološkim auskultacijskim nalazom na plućima prikazani su na slici 25. Najčešći nalaz su bili hropci koji su se našli 80% bolesnika s patološkim nalazom na plućima (16/20) odnosno u 53% svih bolesnika s HMPV infekcijom (16/30). Zviždanje (engl. *wheezing*) bilo je izraženo u 45% bolesnika s patološkim nalazom na plućima (9/20) odnosno u 30% svih bolesnika s HMPV infekcijom (9/30). Zviždanje je trajalo najmanje 1 do najdulje 6 dana sa prosjekom od 3,9 dana. Krepitacije su nađene u 6, a slabije čujno disanje u jednog pacijenta inficiranog HMPV-om.



Slika 25. Pojedinačni auskultatorni nalazi u bolesnika sa patološkim auskultacijskim nalazom na plućima; (N=20)

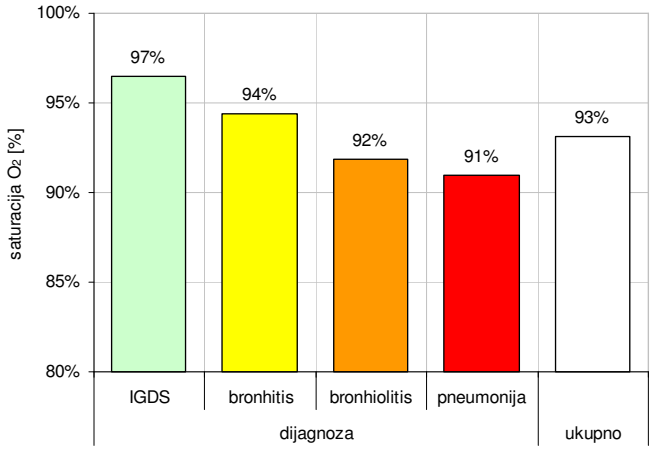
Rendgenogram pluća. Rendgenogram pluća učinjen je kod 80% (24/30) bolesnika s HMPV infekcijom, a patološki nalaz nađen je u 17 bolesnika što je 53% od svih bolesnika sa HMPV infekcijom (17/30), odnosno 71% od svih bolesnika kojima je učinjena snimka pluća (17/24). Nalaz snimke pluća u pacijenata s patološkim nalazom prikazan je na slici 26. Tako je nalaz bronha ispunjenih sekretom i/ili zadebljane stijenke ustanovljen u 9/17 bolesnika, hiperinflacija u 5/17, inhomogeni pneumonični infiltrat u 6/17 i atelektaza u 1/17 bolesnika.



Slika 26. Rendgenski nalaz snimke pluća u pacijenata s patološkim nalazom; (N=17)

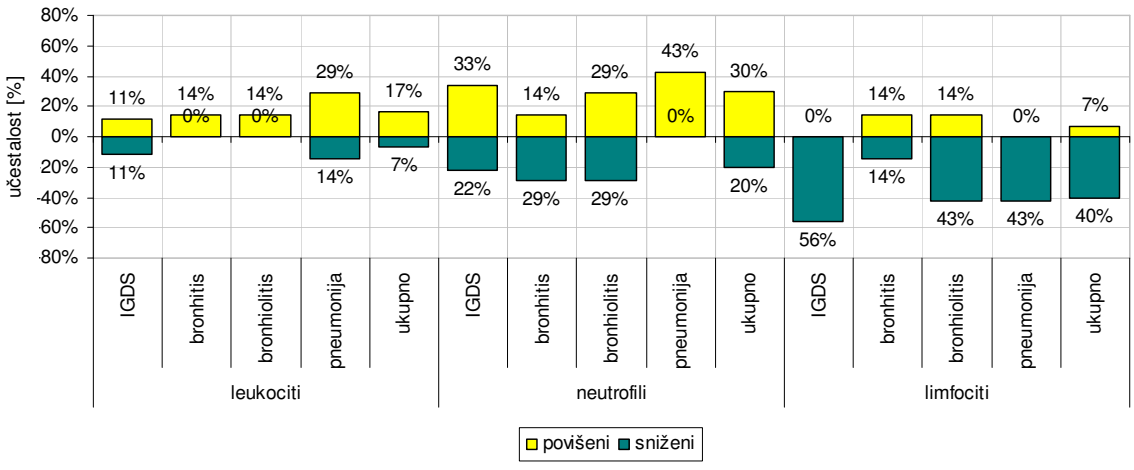
4.3.2. Laboratorijski nalazi bolesnika s infekcijom humanim metapneumovirusom

Saturacija kisika u perifernoj arterijskoj krvi. Vrijednosti saturacije kisikom <90% imalo je 3/30;10% bolesnika s HMPV infekcijom, a vrijednosti saturacije kisikom <95% imalo je 12/30; 40% djece. Prosječne vrijednosti saturacije kisikom prema dijagnozi prikazane su na slici 27.



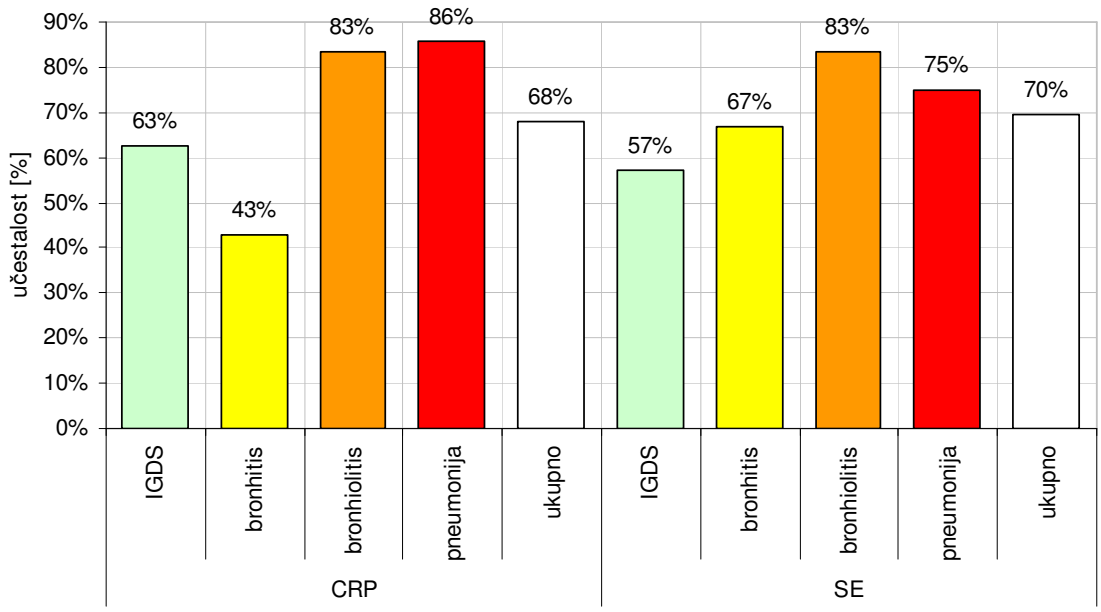
Slika 27. Prosječne vrijednosti saturacije kisika u HMPV inficirane djece

Leukociti. Većina bolesnika s HMPV infekcijom (23/30; 76,6%) imala je vrijednosti leukocita u granicama normalnih vrijednosti za dob, leukocitozu je imalo 5/30; 16,6%, a leukopeniju 2/30; 6,7% bolesnika. Diferencijalna krvna slika pokazala je da su vrijednosti neutrofila bile u granicama normalnih vrijednosti za dob u 50% (15/30), a vrijednosti limfocita u granicama normalnih vrijednosti za dob u 53,3% (16/30) bolesnika. Bolesnici su češće imali relativnu neutrofiliju (9/30;30%) nego neutropeniju (6/30; 20%) i relativnu limfopeniju (12/30; 40%) nego limfocitozu (2/30; 6,7%) (slika 28).



Slika 28. Udio djece s povišenim i sniženim vrijednostima leukocita, neutrofila i limfocita u HMPV inficirane djece prema dijagnozi

CRP i sedimentacija eritrocita. Nasuprot vrijednostima leukocita, vrijednosti CRP-a i sedimentacije eritrocita u HMPV inficirane djece bile su najčešće umjereno povišene (19/28; 53,6% i 16/23; 70%) (slika 29 i tablica 11).

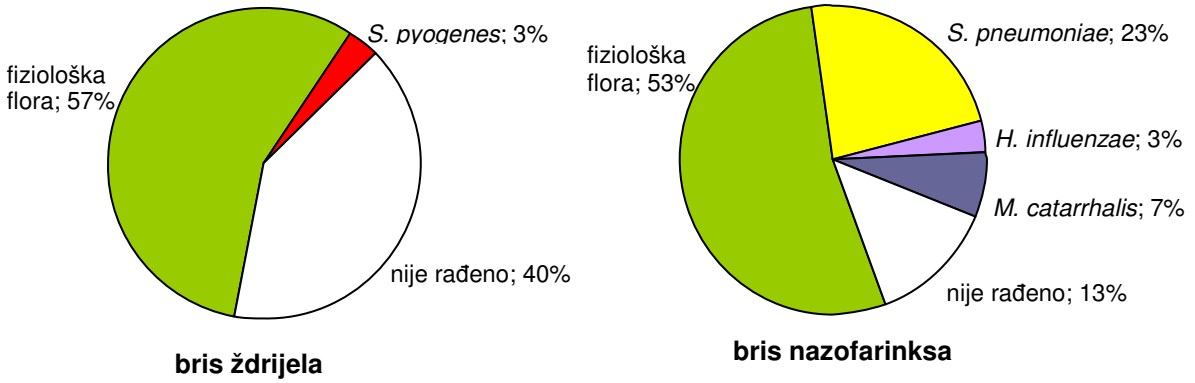


Slika 29. Postotak djece s povišenim vrijednostima C-reaktivnog proteina (CRP) i sedimentacije eritrocita (SE) u HMPV inficirane djece prema dijagnozi

Tablica 11. Prosječne vrijednosti C-reaktivnog proteina (CRP) i sedimantacije eritrocita (SE) u HMPV inficirane djece prema dijagnozi

	CRP		**SE**	
	Sr. vr.	Std.dev.	Sr. vr.	Std.dev.
IGDS	21,6	20,1	21,4	10,6
bronhitis	5,3	6,5	21,8	6,8
bronhiolitis	26,0	20,4	20,2	6,9
pneumonija	21,7	13,9	19,3	5,0
ukupno	18,5	17,2	20,8	7,5

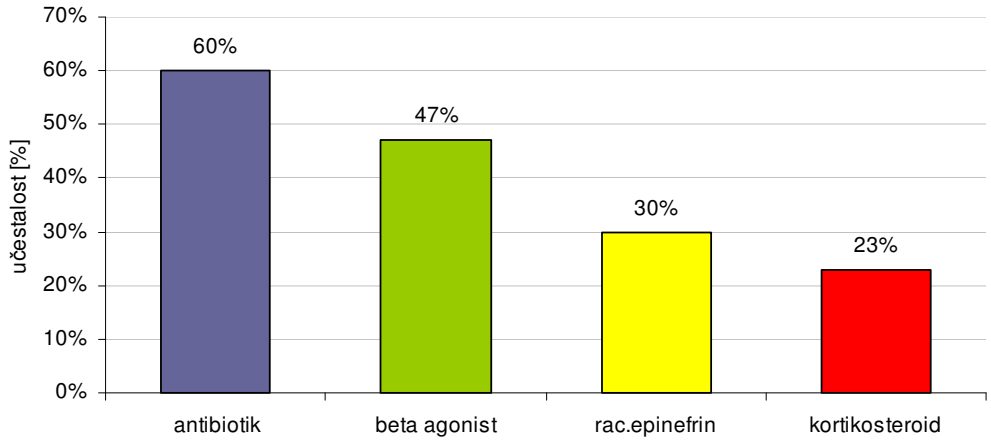
Bakteriološki nalazi brisa ždrijela i nazofarinksa. Bris ždrijela učinjen je u 16/30; 60% bolesnika te je u jednoga pacijenta izoliran *Streptococcus pyogenes*. Bris nazofarinksa učinjen je u 26/30; 87% bolesnika od kojih je u većine izolirana fiziološka flora (16/26; 62%), u 7/26; 27% pacijenata izoliran je *Streptococcus pneumoniae*, u 2/26; 8% *Moraxella catarrhalis* i 1/26; 4% *Haemophylus influenzae*. Bakteriološki nalazi brisa ždrijela i nazofarinksa prikazani su na slici 30.



Slika 30. Bakteriološki nalaz brisa ždrijela i nazofarinksa u HMPV inficiranih bolesnika

4.3.3. Liječenje bolesnika s infekcijom humanim metapneumovirusom

U našoj skupini bolesnika niti jedan bolesnik inficiran samo s HMPV-om nije trebao umjetnu respiraciju niti liječenje u JIL-u. Nadomjesna terapija kisikom provedena je u 5/30; 17% bolesnika. Isključivo antipireticima liječeno je 3/30; 10% bolesnika. Antibiotskom terapijom samom ili u kombinaciji sa nekim drugim lijekom liječeno je 18/30; 60% bolesnika, inhalcije agonistima beta-2 adrenergičkih receptora (bronhodilatatorima) primalo je 14/30; 47% bolesnika, inhalacije racemičnog epinefrina 9/30; 30% i kortikosteroide 7/30; 23% bolesnika (slika 31).



Slika 31. Udio bolesnika prema primjenjenoj farmakoterapiji

Najčešće su naši pacijenti liječeni samo antibiotskom terapijom (7/30; 23%), zatim slijedi terapija kombinacijom antibiotika i inahalacijama agonistima beta-2 adrenergičkih receptora (4/30; 13%). Po troje naših bolesnika (10%) primalo je terapiju samo inhalacijama agonistima beta-2 adrenergičkih receptora odnosno terapiju kombinacijom racemičnog epinefrina i antibiotika. Po dvoje bolesnika (7%) primalo je terapiju kombinacijom antibiotika, bronhodilatatora i koritkosteroida odnosno kombinacijom antibiotika, bronhodilatatora, koritkosteroida i racemičnog epinefrina.

4.3.4. Kliničko–laboratorijski nalazi bolesnika s infekcijom humanim metapneumovirusom i infekcijom nekim drugim respiratornim virusom (koinfekcijom)

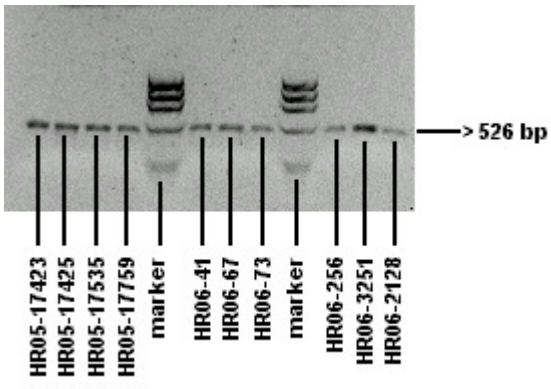
Od 33 naših pacijenata s HMPV infekcijom troje ih je imalo koinfekciju s HMPV-om i nekim drugim virusom (tablica 12) što daje učestalost koinfekcije u HMPV inficiranih pacijenata od 9% (3/33). Svo troje pacijenata s koinfekcijom bilo je hospitalizirano zbog neke druge osnovne bolesti i razvilo kl. sliku ARI tijekom hospitalizacije što upućuje na hospitalnu infekciju. Pacijentu br. 1 uzeta su dva NFS-a u razmaku od 7 dana. U prvome uzorku dokazan je samo HMPV, a u drugome uzorku HMPV i PI-3. Saturacija kisika kod ovog pacijenta mjerena u doba uzimanja 1. uzorka iznosila je 95%, a klinička slika ARI (uzrokovana samo s HMPV-om) bila je IGDS. U doba uzimanja 2. uzorka kod pacijenta br. 1 došlo je do pogoršanja simptoma ARI, te je kratkotrajano premješten u JIL, a tada izmjerena saturacija kisika iznosila je 87%. Stoga smo zaključili da je kod pacijenta br. 1 dokazana superinfekcija virusom PI-3 koja je dovela do značajnog pogoršanja kliničke slike u ovog pacijenta. Iako je svo troje pacijenata imalo ozbiljnu predliježeću bolest, ARI uzrokovana koinfekcijom s HMPV-om i još jednim respiratornim virusom ipak je rezultirala izlječenjem ARI.

Tablica 12. Kliničke osobitosti pacijenata inficiranih s HMPV i nekim drugim virusom;
PI-3=virus parainfluence tip 3; AD= adenovirus; RSV=respiratorni sincicijski virus, ARI = akutna respiratorna infekcija, IGDS= infekcija gornjeg dišnog sustava, BNF= bakteriološki nalaz brisa nazofarinksa, L= leukociti x10^9/L, CRP= C-reaktivni protein mg/L , GEC= gastroenetrokolitis *hipoksija definirana saturacijom O_2 <90%

Broj pacijenta	Dob (mjeseci)	Spol	Koinfekcija s virusom	Dijagnoza ARI	Simptomi/ klinički i laboratorijski nalazi	Predliježeća bolest	Liječenje	Ishod HMPV koinfekcije/ napomena
1	8	m	PI-3	bronhiolitis	afebrilan, kašalj, rinoreja, hropci, hipoksija*, na RTG-u pluća blaga hiperinflacija, BNF=fiz. flora, L=12,6	Sy Down, Sy West	nadkonada O_2 kroz 4 dana / inhalacije bronhodilatatora	pogoršanje bolesti nakon superinfekcije s PI-3 / kl. status kod otpusta uredan
2	17	ž	RSV	bronhitis	febrilna, kašalj, RTG pluća uredan; BNF=fiz. flora, L=14,5, CRP=8	Celijakija, prethodno GEC uzrokovan rotavirusom	samo antipiretik	kl. status kod otpusta uredan
3	3	m	AD	IGDS	febrilan, kašalj, rinoreja, hipoksija*, RTG nalaz pluća u skladu sa predliježećom bolesti, BNF=nije rađen, L=16, CRP=19,6	Milijarna tuberkuloza pluća, tuberkulozni meningitis	nadkonada O_2 kroz 1 dan / kontinuirana antibiotska teraoija za osnovnu bolest	tijekom koinfekcije nije došlo do pogoršanja osnovne bolesti

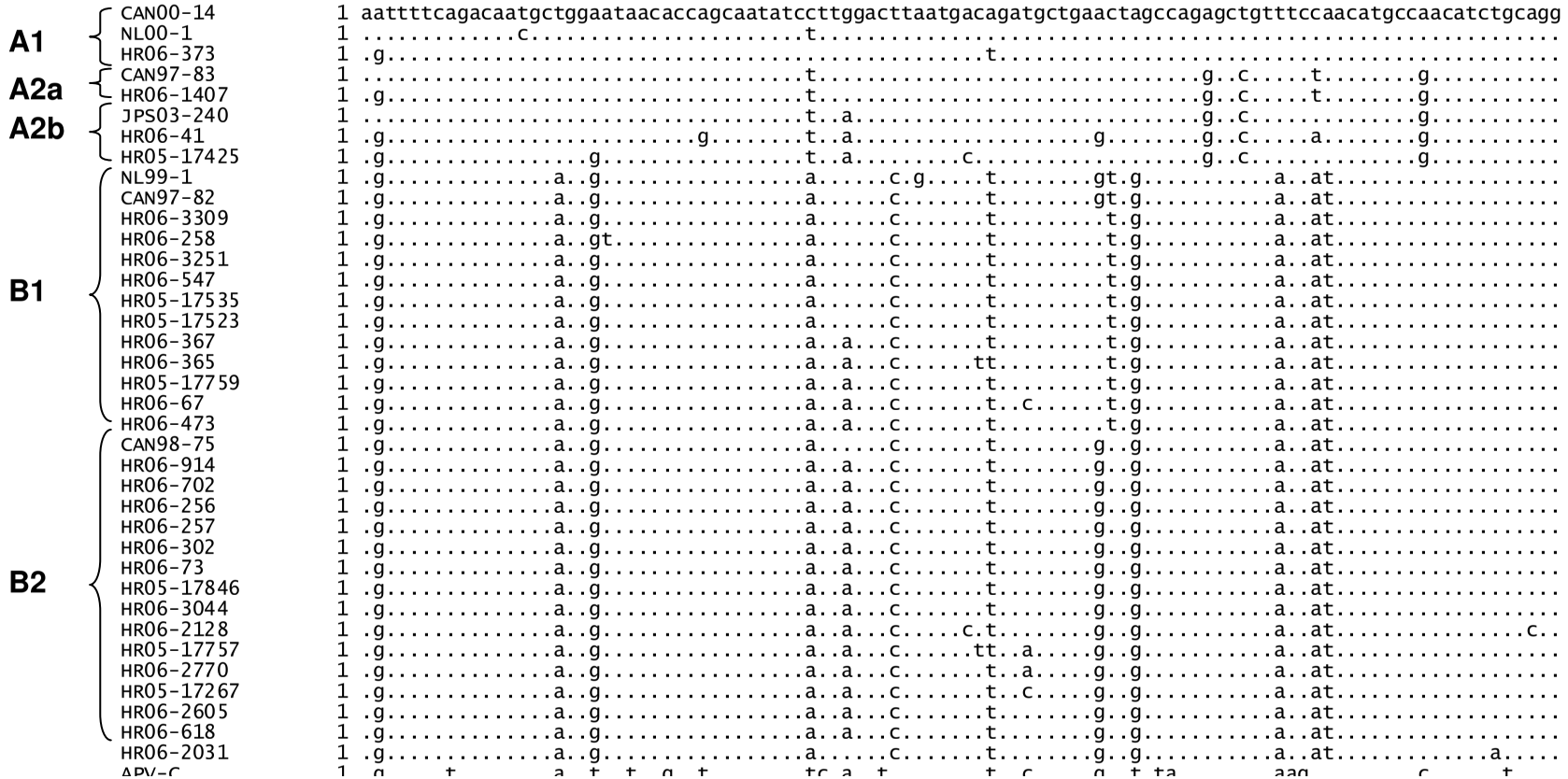
4.4. Molekularna analiza sojeva humanog metapneumovirusa

Od 34 HMPV pozitivnih NFS-a dokazanih metodom RT-PCR-a u stvarnom vremenu, u 30 uzorka HMPV smo dokazali metodom konvencionalnog RT-PCR-a za dokaz F gena. Na slici 32 prikazana je detekcija PCR produkta za neke HMPV sojeve.

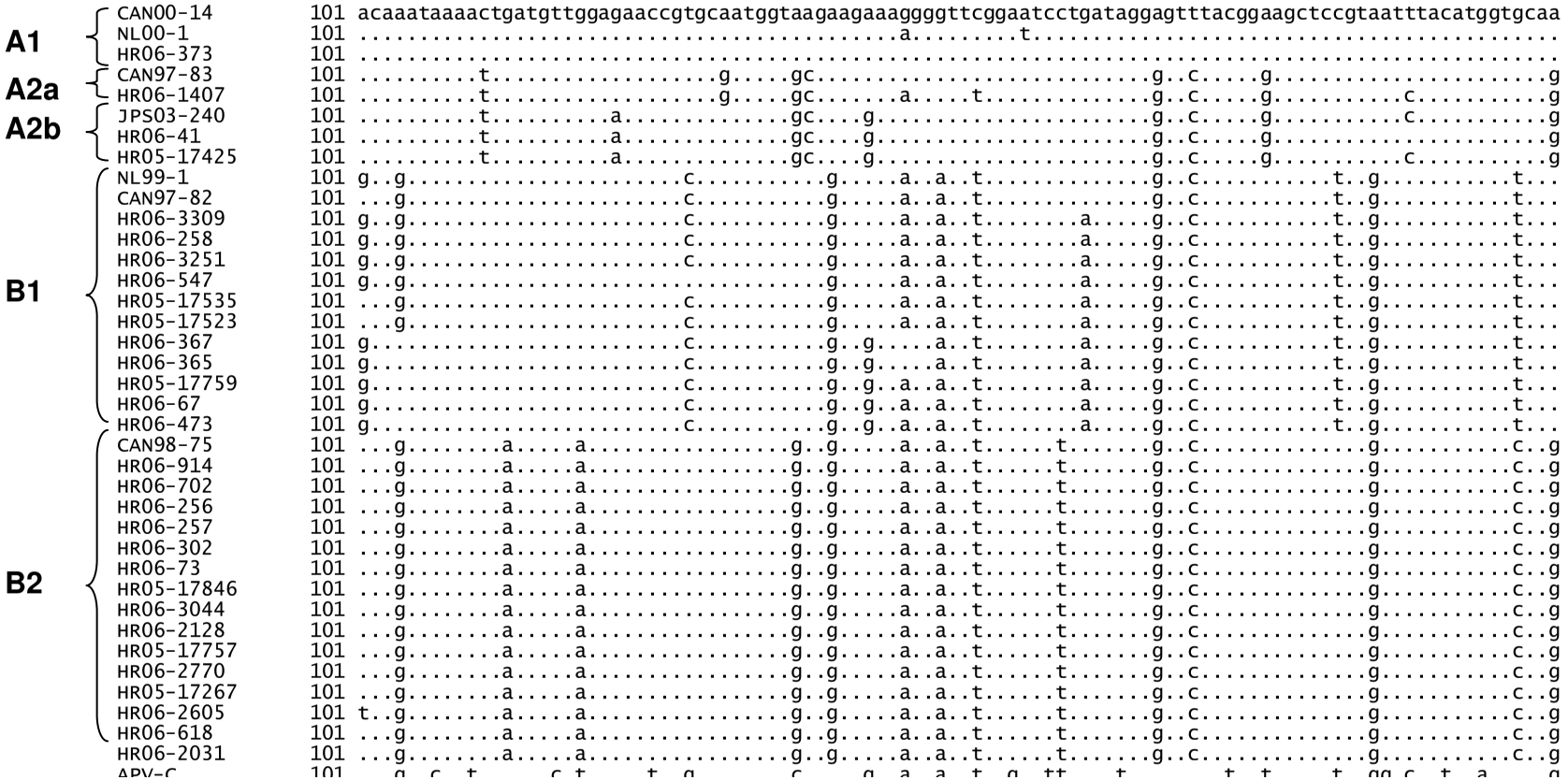


Slika 32. Detekcija PCR produkta RT-PCR-a za dokaz F gena; veličina očekivanog odsječka iznosi 526 parova baza (bp, engl. *base pairs*); prikazano 10 HMPV sojeva imenovanih slovčanom oznakom za državu (HR), iza koje slijedi broj godine detekcije i laboratorijski broj uzorka. Odsječci markera su veličine (odozgora pa nadolje): 1358, 1078, 872, 603, 310, 281bp

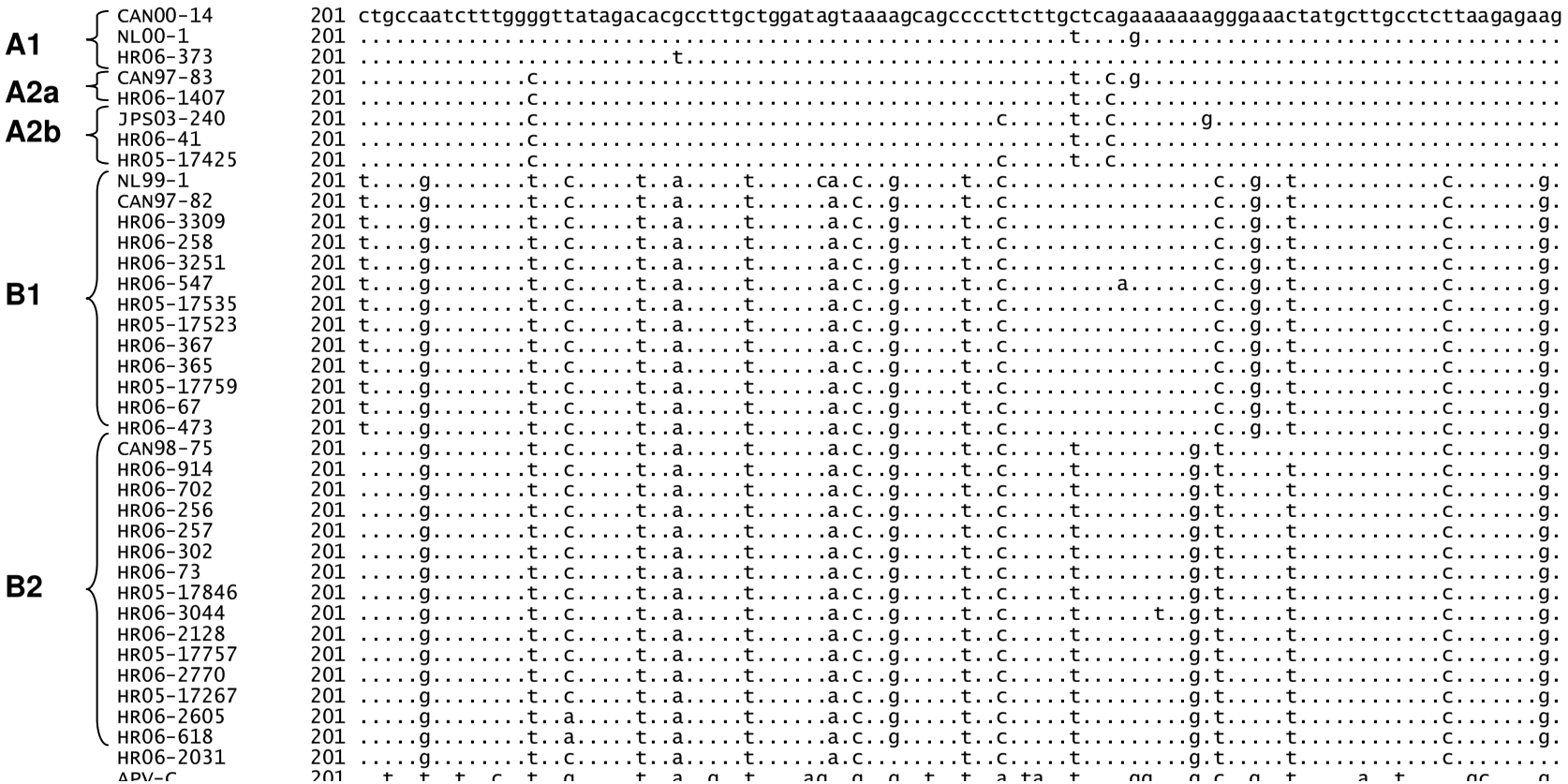
Nakon sekvenciranja dobivenih DNK odsječka veličine 526 nt, za analizu smo odabrali odsječak veličine 471 nt (budući se prvih 20-tak nt ne može sa sigurnošću odrediti). Slijed nukleotida dijela F gena (471nt**;** 3673 nt- 4143 nt) za 30 naših i 6 HMPV sojeva predstavnika genogrupa te APV prikazan je na slici 33. Slika 33 također prikazuje različitost u pojedinim nukleotidima između genogrupa. Sekvence naših HMPV sojeva smo usporedili međusobno i s referalnim HMPV sojevima– predstavnicima određenih genogrupa te na temelju sličnosti izradili filogenetsko stablo i svrstali sojeve po genogrupama (slika 34).



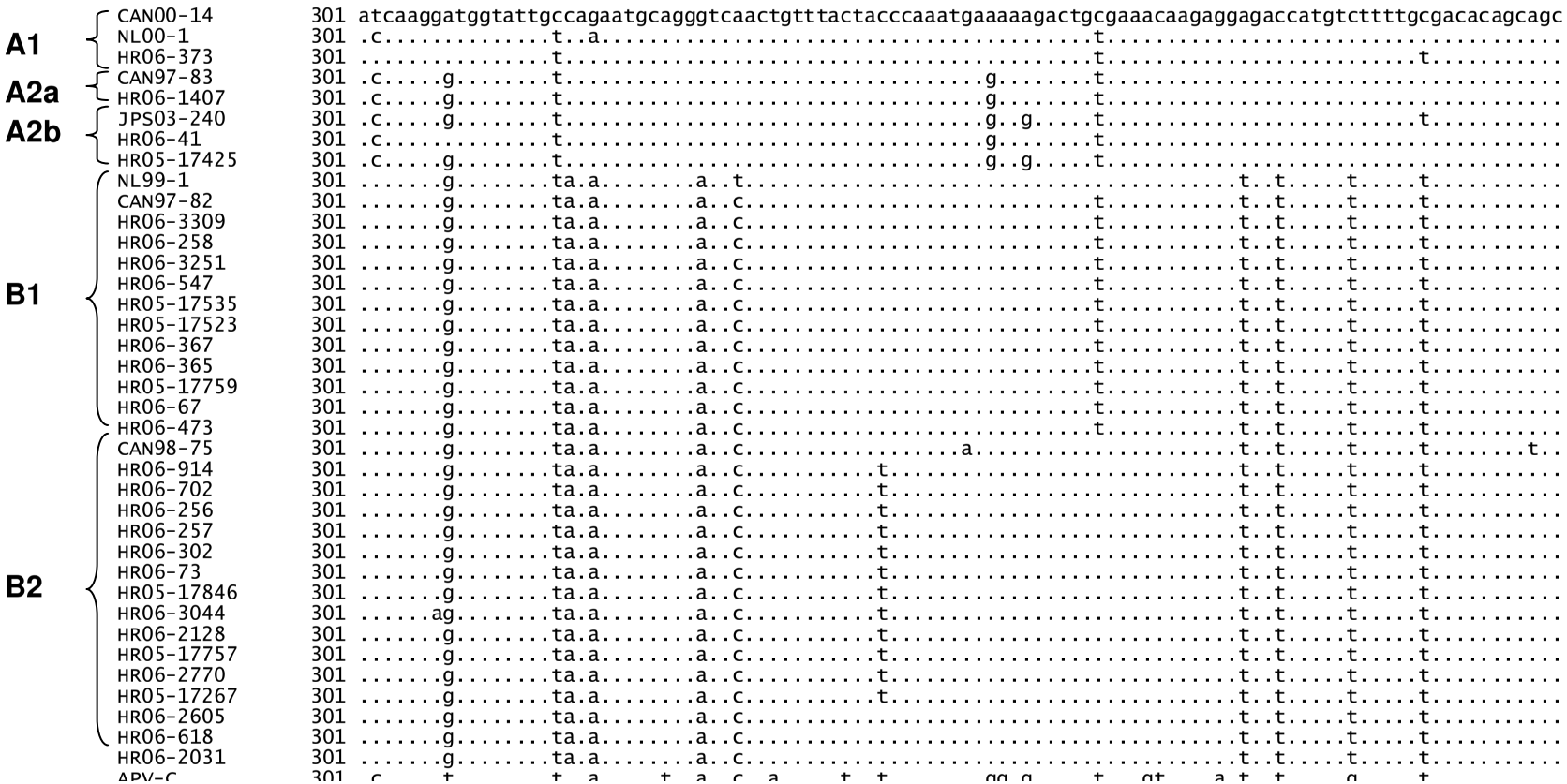
Slika 33. Prikaz slijeda nukleotida dijela F gena (471nt; 3673 nt- 4143 nt) 30 HMPV sojeva detektiranih u Hrvatskoj i 6 HMPV sojeva predstavnika genogrupa; točkama označeni nepromijenjeni nukleotidi u odnosu na referalni soj CAN00-14=genotip A1



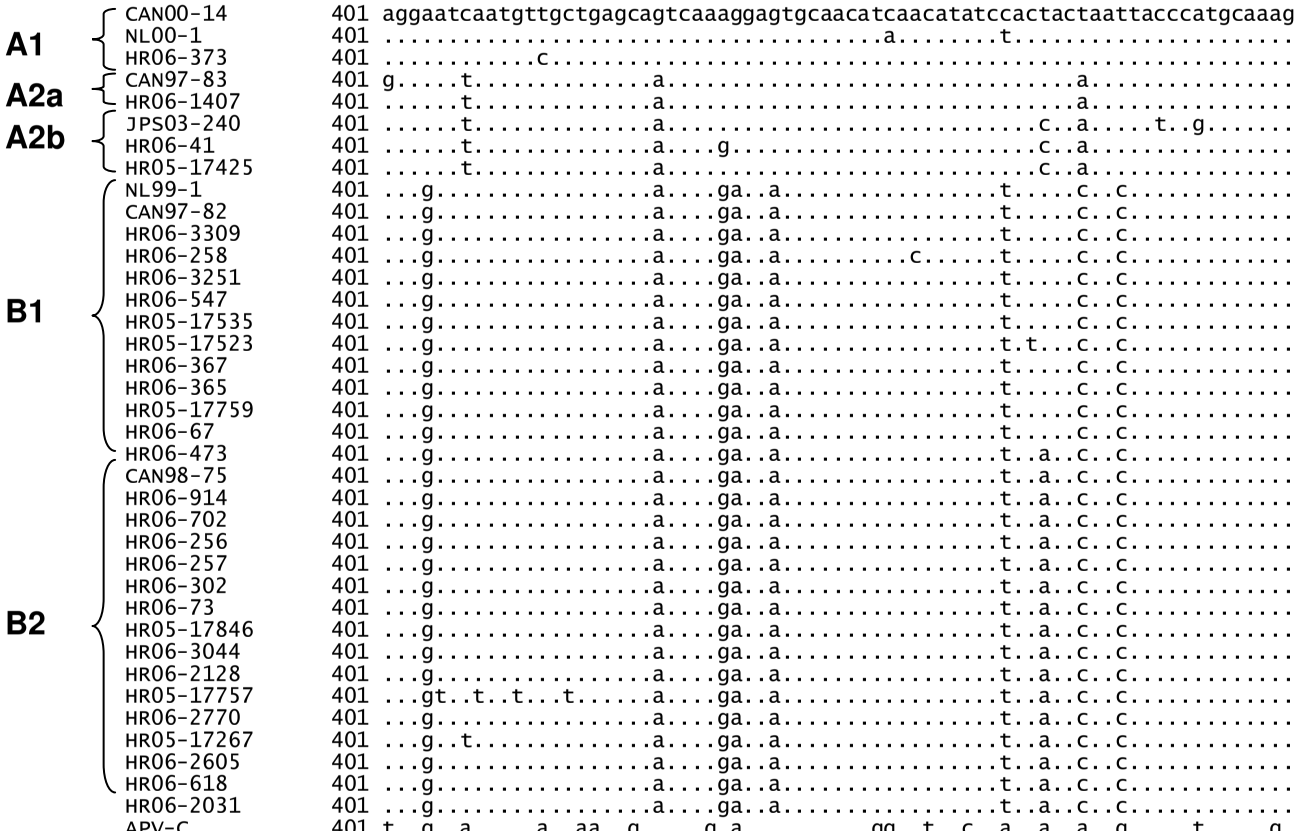
nastavak slike 33.



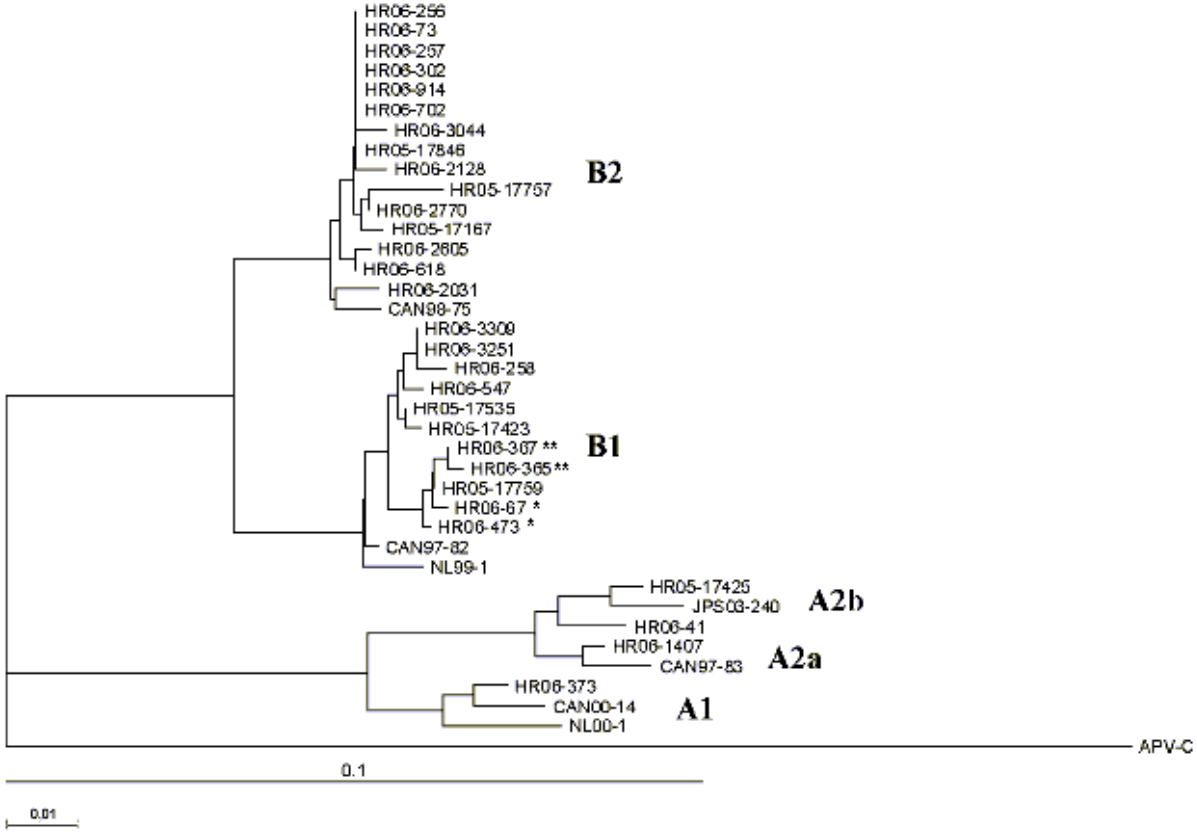
nastavak slike 33.



nastavak slike 33.

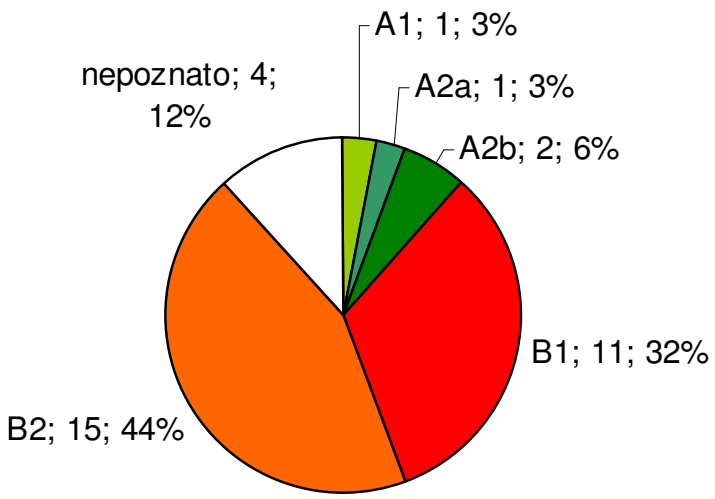


nastavak slike 33.



Slika 34. Filogenetsko stablo sojeva dokazanih u sjeverozapadnoj Hrvatskoj u sezoni 2005/2006;
HMPV sojevi imenovanih slovčanom oznakom za državu (HR), iza koje slijedi broj godine detekcije i laboratorijski broj uzorka te uspoređeni sa referalnim sojevima iz Nizozemske (NL00-1, NL99-1), Kanade (CAN00-14, CAN97-82, CAN97-83, CAN99-75) i Japana (JPS03-240). Duljina mjerila na dnu slike odgovara duljini od 10% (veće mjerilo) i 1% (manje mjerilo) duljine promatrane sekvene što odgovara 47 odnosno 4,7 nt.
*sojevi dokazani u dva uzorka istog pacijenta unutar 7 dana
**sojevi dokazani u uzorcima koji potječu od sestre i brata

Slika 35 pokazuje da su u zimskoj sezoni 2005/2006 u sjeverozapadnom dijelu Hrvatske dokazana sva četiri genotipa HMPV-a (A1, A2, B1 i B2), kao i dvije varijante HMPV-a unutar podgrupe A2 (A2a i A2b). Načešći podtip dokazan u ovome istraživanju bio je podtip B2 (15 sojeva), zatim slijedi B1 (11 sojeva), varijanta podtipa A2b (2 soja) i po jedan dokazani podtip A1 i varijanta A2a (slika 34 i slika 35).

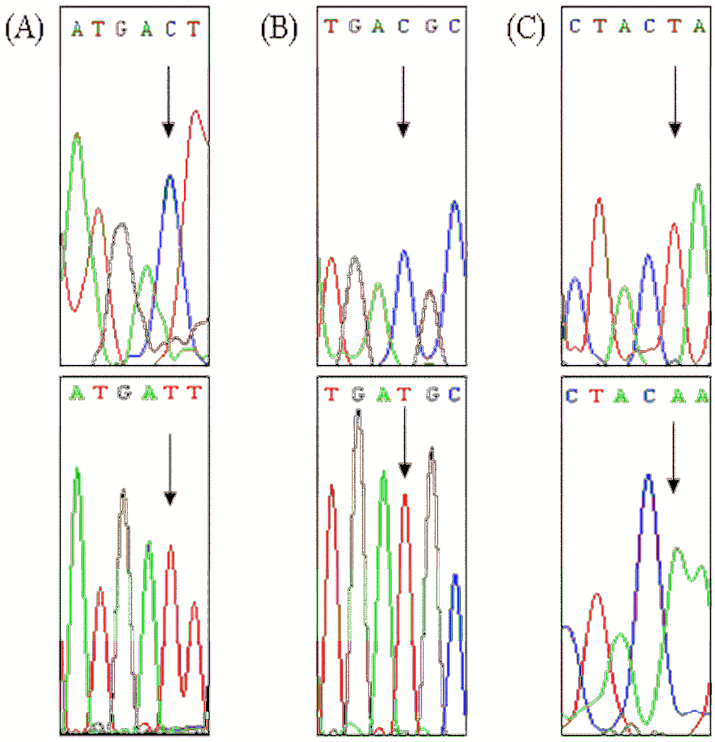


Slika 35. Udio pojedinih podtipova humanog metapneumovirusa (HMPV) u sjeverozapadnoj Hrvatskoj u sezoni 2005/2006

Analizom sličnosti dobivenih sekvenca dijela F gena u naših sojeva dobili smo slijedeće rezultate:

1. sličnost između genogrupa A i B iznosi od 83,9% do 88,3%;
2. sličnost između A1 i A2 podgrupe iznosi od 92,6% do 94,5%, a između B1 i B2 podgrupe od 94,1% do 96,2%;
3. Sekvence sojeva unutar podgrupe A1 pokazuju sličnost od 96,8% do 98,5%, unutar podgrupe A2 sličnost od 96,8% do 98,7%, unutar podgrupe B1 od 97,9% do 99,8% i unutar podgrupe B2 sličnost od 97,7% do 100%;
4. Sličnost nukeotida sekvenci sojeva unutar varijanti A2b iznosi od 97,3% do 98,5%, dok smo unutar varijante A2a detektirali samo jedan soj koji pokazuje sličnost u odnosu na referalni soj CAN97-83 od 98,4%.

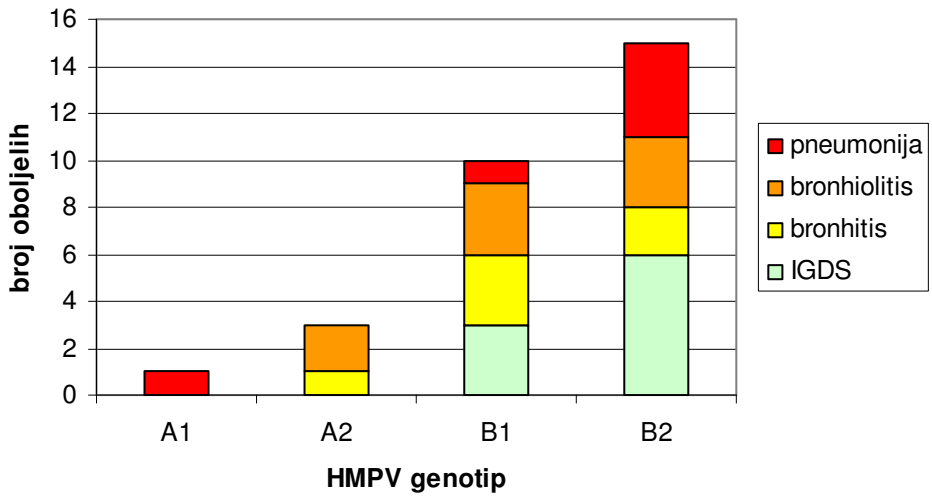
Iz slike 34 se vidi da 6 HMPV sojeva podgrupe B2 ima identičan slijed nukeotida (HR06-73, HR06-256, HR06-257, HR06-302, HR06-914 i HR06-702). Ovi sojevi su dokazani u različitih pacijenata u dvije različite bolnice, ali tijekom kratkog vremenskog perioda (siječanj 2006). Sojevi HR06- 365 i HR06-367 dokazani su u brata i sestre, a anamnezom je doznato da je sestra dobila ARI od starijeg brata koji je pokazivao simptome ARI već neko vrijeme. Iako je bilo za očekivanje da imaju identične sekvence ovi se sojevi međusobno razlikuju u jednom nukleotidu, te je zaključeno da se radi o točkastoj mutaciji soja HR06-365 (uzorak dječaka). Ova mutacija dogodila se na poziciji 3724 nt, gdje je došlo do zamjene citozina timidinom (c→t; slika 36/A), a rezultiralo je promijenom u slijedu aminokiselina tj. izoleucin je prešao u treonin.



Slika 36. Djelomični elektroferogrami sa prikazom mutacije dvaju soja; A) HR06-365 (gore) i HR06-367 (dolje) pozicija 3724 nt; B)HR06-67 (gore) i HR06-473 (dolje) pozicija 3728 nt C) HR06-67 (gore) i HR06-473 (dolje) pozicija 4124 nt

Sojevi HR06-67 i HR06-473 dokazani su u uzorcima istog pacijenta uzetim u razmaku od 7 dana. Oni se međusobno razlikuju u dva nukleotida, a točkaste mutacije su zabilježene na pozicijama 3728 nt gdje je citozin prešao u timidin (c→t; slika 36/B) i 4124 nt gdje je timidin prešao u adenin (t→a; slika 36/C). Ove mutacije nisu rezultirale promjenom u aminokiselinskom slijedu.

U svrhu usporedbe težine kliničke slike s obzirom na genotip promatrali smo učestalost pojedinih genotipova s obzirom na dijagnozu bolesti (slika 37).

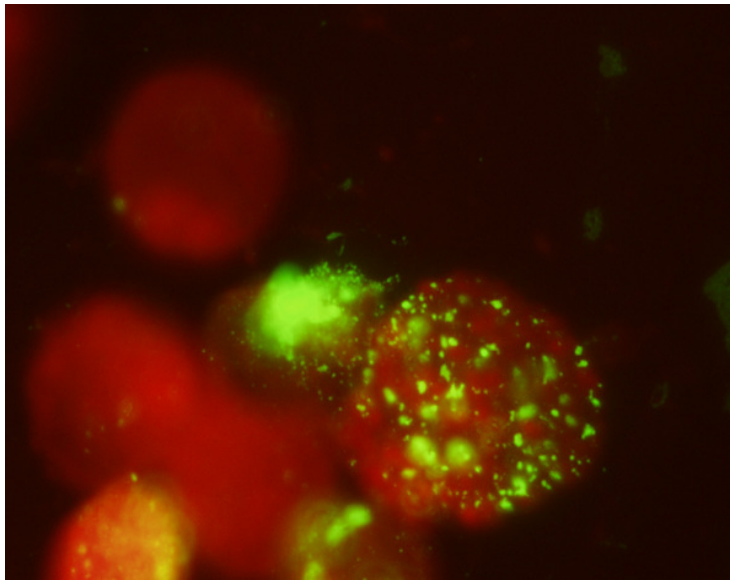


Slika 37. Genotipovi humanog metapneumovirusa (HMPV) s obzirom na dijagnozu bolesti

Iz slike 37 se vidi da je genotip A uzrokovao samo IDDS-a dok je genotip B uzrokovao i IGDS i IDDS. Drugi je pokazatelj težine kliničke slike nadoknada kisikom. U svih naših bolesnika koji su bili inficirani samo s HMPV-om i primali nadomjesnu terapiju kisikom dokazan je genotip B2, dok je u dva bolesnika sa koinfekcijom koji su primali kisik dokazan genotip B1.

4.5. Izolacija humanog metapneumovirusa

Kliničke uzorke u kojima smo metodom molekularne dijagnostike (RT-PCR u stvarnom veremenu za dokaz N gena) dokazali HMPV inokulirali smo na LLC-MK2 stanice. Metodom izolacije HMPV smo dokazali u 5 NFS-a. Niti jedan izolat nije pokazivao jasni CPU već samo neznatne promjene na stanicama u obliku blage granulacije, ali je tijekom prve i druge pasaže u supernatanitma stanične kulture HMPV dokazan RT-PCR metodom. Ove izolate potvrdili smo i identificirali pomoću monoklonskih protutijela usmjerenih na nukleoprotein HMPV-a metodom IFA (slika 39). To su slijedeći izolati: HR06-41 (varijanta A2b), HR06-258 (podtip B1) i HR06-256, HR06-2128 i HR06-2770 (podtipovi B2). Izolirani sojevi su pohranjeni na Odjelu za virologiju HZJZ-a.



Fotografija učinjena u Odjelu za virologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ)

Slika 39. Detekcija HMPV inficiranih LLC-MK2 stanica uz pomoć monoklonskih protutijela usmjerenih na nukleoprotein; monoklonska protutijela dobivena ljubaznošću Dr Ann R. Falsey, Infectious Diseases Unit, Rochester General Hospital, University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester, NY, SAD

4.6. Testiranje hipoteza

Hipoteza broj 1

Prvu hipotezu smo testirali pomoću dva jednosmjerna Z testa. U tablici 13 prikazani su rezultati dvaju jednosmjernih Z testova za dijelove hipoteze, te učestalost HMPV infekcije u hospitalizirane djece ≤ 5 god. sa pripadajućim intervalom pouzdanosti (95% CI).

Tablica 13. Rezultati Z-testa s pripadajućum P vrijednostima za hipoteze

Hipoteza	Učestalost HMPV infekcije(%)	95% CI	Jednosmjerni Z-test*	P vrijednost za Z-test
HMPV > 6,4%	8,2	5,5-10,9	1,469247	0,071
HMPV < 15,2%	8,2	5,5-10,9	3,73606	<0,001

*α=0,05

Iz dobivenih rezultata Z-testa za hipotezu da je učestalost HMPV infekcije u sjeverozapadnoj Hrvatskoj (Zagrebačka županija i šira okolica) u hospitalizirane djece ≤ 5 god. s ARI veća od 6,4% možemo sa 95% sigurnošću reći da se hipoteza ne može prihvatiti iako se P vrijednost (P=0,071) približava granici značajnosti (P<0,05). To znači da učestalost HMPV infekcije može biti i manja od 6,4%. Hipoteza da je učestalost HMPV infekcije u sjeverozapadnoj Hrvatskoj u hospitalizirane djece ≤ 5 god. s ARI niža od 15,2% može se sa 95% sigurnošću prihvatiti (P<0,001).

Hipoteza broj 2

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da se svi dokazani HMPV sojevi mogu svrstati u do sada opisane genetske grupe i podgrupe (slika 35). Stoga smatramo da se hipoteza da se gensko ustrojstvo HMPV-a koji kruže u Hrvatskoj podudara s dokazanim genotipovima ovog virusa nađenim drugdje u svijetu može prihvatiti.

5. RASPRAVA

Ovo je prva studija u Hrvatskoj u kojoj je metodama izravne virološke dijagnostike dokazana infekcija HMPV-om. Rezultati ovog rada pokazali su da je učestalost HMPV-a određena metodom RT-PCR u stvarnom vremenu, u hospitalizirane djece s ARI mlađe od 5 godina, u sezoni 2005/2006 iznosila 8,2%. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima studija provedenim na istoj populacijskoj skupini metodama molekularne dijagnostike tijekom jedne zimske sezone iz SAD-a (6,4%) [45] i Izraela (10,8%) [63], te rezultatom studije iz Francuske koja je trajala tijekom cijele godine (8,5%) [59]. U odnosu na studiju iz Kanade provedenu tijekom jedne zimske sezone u kojoj je učestalost infekcije HMPV-om u istoj dobnoj skupini iznosila 15,2% [46], naši rezultati pokazuju nižu učestalost, a u odnosu na cjelogodišnju studiju iz SAD-a (3,9%) [65] višu učestalost od očekivane. S obzirom da neki autori izvještavaju o razlici u incidenciji HMPV infekcije u pojedinim zimskim sezonama [61,69,75,78], prilikom tumačenja rezultata jednogodišnjih studija, pa tako i ove naše, moramo uzeti u obzir mogućnost varijacije u incidenciji HMPV infekcije ovisno o ispitivanoj godini.

U našoj studiji HMPV je bio treći dokazani uzročnik ARI u ispitivanoj skupini bolesnika odmah nakon RSV-a (25,1%) i adenovirusa (10,2%) (tablica 9, slika 11). Većina studija koje su uspoređivale učestalost HMPV-a i drugih respiratornih virusa (RSV-a, virusa INFL, PI i AD) pokazala je da je HMPV drugi po učestalosti ARI, odmah nakon RSV-a u male djece [40,47]. HMPV je drugi po učestalosti i u djece do 5 god. starosti [59,65] odnosno do 15 god. starosti [54,56]. Navedene studije izvještavaju o učestalosti RSV-a od 11,5% u djece do 12 god. starosti [54] i od 45,5% u djece do 1 god. starosti [40]. Učestalost RSV-a u studijama koje su pratile djecu do 5 godina starosti iznosila je 18,7 % [65] i 28% [59] što je u skladu s rezultatima naše

studije u kojoj je učestalost RSV infekcije iznosila 25,1%. Ove studije izvještavaju o relativno malom udjelu ARI uzrokovanih adenovirusom (~1%), što se razlikuje od nalaza naše studije u kojoj je AD (10,2%) drugi najčešće dokazani uzročnik virusnih ARI u djece do 5 god. starosti. Učestalost virusa parainfluence u našoj studiji (6%) u skladu je s učestalosti ovih virusa u prije navedenim studijama u kojima se kretala od 1,3% do 6,7%, kao i učestalost virusa influence (1,5%) koja se poklapa sa rezultatima drugih studija u kojima se kreće od 1,1% do 3,4% [40,47,54,59,65].

Vrh incidencije HMPV infekcije u našem istraživanju zabilježen je u siječnju 2006, dok je vrh indicencije RSV infekcije zabilježen u veljači iste godine. Incidencija adenovirusa i virusa PI nije se mijenjala tijekom istraživanog razdoblja, dok je virus influence tip A dokazan tek početkom ožujka 2006. god. Kasni početak sezone influence objašnjava relativno mali broj dokazanih infekcija ovim virusom u našem istraživanju. Iako se sezona HMPV-a djelomično preklapala sa sezonom RSV-a možemo zaključiti da je u sezoni 2005/2006 sezona HMPV-a prethodila RSV sezoni.

Rezultati naše studije pokazuju da su dječaci nešto češće oboljevali od djevojčica u svim dokazanim virusnim infekcijama pa tako i u HMPV infekcije. Nešto veća učestalost HMPV infekcije u dječaka u skladu je sa nalazima većine drugih istraživanja [47,65-67,70,77,79]. U ovom radu nije pronađena značajna razlika po spolu između grupa djece inficirane različitim virusom (P=0,439).

Srednja dob HMPV inficirane djece u ovome istraživanju iznosila je 18,4 mjeseci, a medijan 11, 5 mjeseci. Van den Hoogen i sur. izvjestila je da je srednja vrijednost dobi inficirane djece iznosila 15 mjeseci [70], dok Williams i sur. izvještavaju o srednjoj dobi HMPV inficirane djece od 11,6 i 20 mjeseci [79,78]. Medijan dobi HMPV

inficirane djece u radu Noyole i sur. iznosio je 10 mjeseci [47]. Isti autor izvještava o porastu HMPV infekcija u dobnim skupinama do 3 godine starosti (4,7% u djece mlađe od 1 god., 9,4% od 1-2 god. i 13,2% od 2-3 god.) dok učestalost RSV infekcija u djece s porastom dobi pada. U suprotnosti s ovim nalazima Maggi i sur. kao i Mackay i sur. izvjestili su o padu učestalosti HMPV infekcije s porastom dobi djece [61,72]. Naši rezultati pokazuju da se učestalost infekcija HMPV-om ne mijenja do 5 god. života (slika 12 i 13), ali da je s porastom dobi sve manja učestalost RSV infekcija, dok broj infekcija uzrokovan virusima PI i AD pokazuje porast s dobi bolesnika. Grupe djece inficirane određenim virusom u ovome radu značajno su se razlikovale po dobi (P<001). Djeca inficirana AD-om i PI virusima bila su starija od djece oboljele od RSV-a i HMPV-a (slika 14,15,16 i 17). Međutim kada smo usporedili grupe djece inficirane HMPV i RSV virusom one se nisu međusobno razlikovale po dobi (P=0,242).

Dvije značajne studije Williamsa i sur. dokazale su da je HMPV uzročnik IGDS-a u 5-15% slučajeva u djece [78,79]. Isti autor u retrospektivnoj studiji izvješćuje da je HMPV dokazan u nazalnim ispircima 20% djece s IDDS-a, u kojima do otkrića HMPV-a nije dokazan niti jedan drugi virus [79]. Također je pokazao da se HMPV otkriva u vrlo malom broju djece koja ne pokazuju nikakove simptome infekcije (1,2%) što je u skladu sa istraživanjem Boivina i sur. koji izvještavaju o detekciji HMPV-a u manje od 1% asimptomatske djece [67]. Rezultati naše studije pokazuju da je HMPV uzročnik IGDS-a u 4% i IDDS-a u 15% slučajeva ARI u hospitalizirane djece <5 god (slika 12), što odgovara prethodno navedenim rezultatima studija Williamsa i sur. Ovakav nalaz sličan je i rezultatima studije Thomazelli i sur. u kojoj je HMPV dokazani uzročnik u 17,8% IDDS-a [71]. Usporedbom sa drugim virusnim

infekcijama u našoj studiji uvidjeli smo da HMPV značajno češće uzrokuje IDDS u odnosu na AD i PI viruse (P<0,001), ali ne i u odnosu na RSV (P=0,684) (slika 18, tablica 10). Ovi rezultati upućuju na činjenicu da su RSV i HMPV značajni uzročnici IDDS-a, a AD i PI virusi IGDS-a. Nadalje, kad usporedimo učestalost AD u IGDS u našoj studiji (14,5%) sa studijom Williamsa i sur. koja je pratila viruse uzročnike isključivo IGDS-a, te uzmemo u obzir relativno veliki udio IGDS-a u naših ispitanika (62%; slika 10) vidimo da se naši rezultati podudaraju (učestalost AD u IGDS-a u navedenoj studiji iznosi 11%) [78].

Nepostojanje značajne razlike između HMPV-a i RSV-a u odnosu na pojedini klinički sindrom bolesti u ovome radu (tablica 10) govori u prilog mišljenju da se klinička slika HMPV infekcije ne razlikuje od kliničke slike koju uzrokuje RSV. Studije Bosis i sur. i Peiris i sur. uspoređivale su grupe djece inficirane HMPV-om, RSV-om i virusima INFL te našle da se HMPV-om i RSV-om inficirana djeca ne razlikuju u odnosu na dijagnozu i kliničke simptome, ali se ove dvije grupe razlikuju u odnosu na djecu inficiranu virusom INFL obolijevajući češće od bronhiolitisa i pneumonije [44,52]. Mullins i sur. također ne nalaze razlike u kliničkoj prezentaciji infekcije između HMPV i RSV inficirane djece [65]. U suprotnosti s spomenutim istraživanjima Garcia-Garcia i sur. izvjestili su o značajno češće postavljenoj dijagnozi bronhiolitisa kod RSV inficirane djece u odnosu na HMPV inficiranu djecu iako je u njihovoj studiji recidivirajuće zviždanje (engl. *reccurent wheezing*) bila najčešća dijagnoza u HMPV inficiranih pacijenata pa i sami autori zaključuju kako ova dijagnoza nije jako različita od dijagnoze bronhiolitisa [62].

Što se tiče kliničkih simptoma i znakova HMPV infekcije, kašalj je bio izražen u 90%, rinoreja u 87%, a povišenu temperaturu iznad 38,0ºC imalo je 77% naših bolesnika. Prethodne studije drugih istraživača izvjestile su o učestalosti kašlja u bolesnika s

HMPV infekcijom od 63%-97%, učestalosti rinoreje 33,3%-90% i povišenoj temperaturi od 57%-91,7% [6,23,51,60,64,65,67,70].

Upalu srednjeg uha (OMA) imalo je 27% naših bolesnika s HMPV infekcijom. Drugi autori izvještavaju o učestalosti OMA tijekom HMPV infekcije od 11,5%-63% [37,44,64,67,78,79]. Williams i sur. su istraživali ulogu HMPV-a u patogenezi bolesti 144 djece s dijagnozom OMA [90]. U ove djece prikupljeni su nazalni ispirci i tekućina iz srednjeg uha te pretraženi na HMPV RT-PCR metodom. HMPV je dokazan u 6% nazalnih ispiraka i jednom uzorku tekućine iz srednjeg uha. U 75% uzoraka pozitivnih na HMPV u ove djece dokazan je i neki bakterijski kopatogen, ali u 25% niti jedna bakterija što ukazuje na mogućnost da HMPV može biti samostalan uzročnik OMA. U naših HMPV pozitivnih ispitanika s OMA (N=8) nismo timpanocentezom prikupili tekućinu iz srednjeg uha te tako nismo mogli utvrditi postojanje HMPV-a i/ili nekog bakterijskog patogena. Međutim, u troje naše djece sa OMA u brisu nazofarinksa izoliran je *Streptococcus pneumoniae,* u jednog djeteta *Moraxella catarrhalis,* dok je u preostale djece (4/8; 50%) s OMA izolirana fiziološka flora. Stoga zaključujemo da naši nalazi također govore u prilog pretpostavci da HMPV može samostalno uzrokovati upalu srednjeg uha u određenom broju slučajeva OMA.

Najčešći auskultacijski nalaz u naših bolesnika bili su hropci koji su se našli u 53% svih bolesnika s HMPV infekcijom dok je zviždanje (engl. *wheezing*) bilo je izraženo u 30% svih bolesnika s HMPV infekcijom. Učestalost zviždanja u HMPV inficirane djece u drugim studijama kreće se od 24%-52% [6,23,70,79].

Abnormalan rendgenski nalaz pluća nađen je u 17 naših bolesnika što je 53% od svih bolesnika sa HMPV infekcijom, a od toga je najčešći nalaz bio nalaz bronha ispunjenih sekretom i/ili zadebljane stijenke bronha (53% patoloških nalaza) iza kojeg

slijedi pneumonični inhomogeni infiltrat (35% patoloških nalaza) i hiperinflacija (30% patoloških nalaza). Ovakav nalaz je u skladu sa prije navedenim auskultacijskim nalazom, ali i sličan nalazima Williamsa i sur. U njihovoj studiji 50% djece u koje je učinjena rendgenska snimka pluća imalo je patološki nalaz, a najčešći nalaz bio je nalaz difuznih perihilarnih infiltrata.

Djeca sa HMPV bronhiolitisom većinom su imala tahipneju, a njene vrijednosti su bile i do 100% veće od gornje granice normalnih vrijednosti za dob (slika 23). Većina djece s HMPV bronhitisom i pneumonijom također je imala povišenu respiratornu frekvenciju, ali su njihove vrijednosti bile manje povišene u odnosu na vrijednosti izmjerene u djece s bronhiolitisom (30% odnosno 70% u odnosu na gornju granicu normalnih vrijednosti za dob). Slične nalaze za djecu inficiranu RSV-om objavili su autori Lukić-Grlić i sur. [93]. U njihovoj studiji nađena je značajno viša respiratorna frekvencija u djece s RSV bronhiolitisom u odnosu na djecu s RSV pneumonijom i bronhitisom.

Najveće vrijednosti pulsa izmjerene su u djece s HMPV pneumonijom (slika 24) što je u skladu i s nalazima povišene temperature čije su najveće prosječne vrijednosti također izmjerene u djece s pneumonijom (slika 20).

Vrijednosti saturacije kisikom u naše HMPV inficirane djece očekivano su se smanjivale u odnosu na težinu kliničke slike, te je prosječna vrijednost u bolesnika s pneumonijom iznosila 91% (slika 28). Vrijednosti saturacije kisikom < 90% imalo je 12,5% naših bolesnika s HMPV infekcijom a vrijednosti saturacije kisikom < 95% imalo je 50% djece. U studiji Espera i sur. hipoksiju definiranu vrijednostima saturacije kisika < 90% imalo je 37,7% HMPV inficirane djece [66] dok Garcia-Garcia i sur. izvještavaju o vrijednostima saturacije kisika < 95% u 57,7% njihovih bolesnika.

Većina naših bolesnika s HMPV infekcijom imala je vrijednosti leukocita u granicama normalnih vrijednosti za dob. Leukocitozu je imalo 16,6% bolesnika, leukopeniju 6,7%, relativnu neutrofiliju 30% i relativnu limfocitozu 6,7% naših bolesnika (slika 29). Većina bolesnika imala je blago povišene vrijednosti CRP-a i ubrzanu sedimentaciju eritrocita (slika 30 i tablica 11). Promatrajući ove laboratorijske nalaze svakako treba uzeti u obzir da je u 11 naših bolesnika (36%) u brisu ždrijela ili nazofarinksa izolirana neka patogena bakterija. Ebihara i sur. nisu našli leukocitozu niti u jednog HMPV inficiranog pacijenta, leukopeniju u 5,3%, dok je CRP bio blago povišen u 31,6% njihovih bolesnika [51].

Veliki broj (60%) naših bolesnika liječen je antibioticima samim ili u kombinaciji sa nekim drugim lijekom. Prema čestoći upotrebe slijede bronhodilatatori (47%), zatim racemični epinefrin (30%) i na kraju kortikosteroidi (23%). Iako se stalno naglašava racionalna primjena antibiotika u liječenju virusnih infekcija na slične smo rezultate naišli i u izvještajima drugih autora. Tako npr. autori iz Finske izvještavaju da je 38% HMPV inficirane djece primalo antibiotsku terapiju [60], dok je u studiji iz Italije antibiotsku terapiju primalo preko 50% djece [44]. Autori iz Kanade naglašavaju da je preko dvije trećine HMPV inficirane djece tijekom istraživanja primilo antibiotsku terapiju iako niti jedan uzorak nije proslijeđen na bakteriolšku dijagnostiku [67]. Rezultati studije iz Nizozemske pokazali su da je 60% HMPV inficirane djece primalo antibiotike, 36% djece liječeno je bronhodilatatorima, a 20% kortikosteroidima što je vrlo slično našim rezultatima [70]. U studiji istih autora nadomjesnu terapiju kisikom primilo je 36% djece dok u našoj studiji ovu terapiju dobivalo 17% djece.

Neki autori ukazali su na postojanje teže kliničke slike u pacijenata koinficiranih s HMPV-om i RSV-om. Tako je u studiji Greensilla i sur. u kojoj je pregledano 30-oro

djece sa teškim oblikom bronhiolitisa dokazana koinfekcija ovih dvaju virusa u 70% slučajeva [105]. U jednoj drugoj studiji u kojoj su promatrana djeca koja su liječena u JIL-u koinfekcija s HMPV-om i RSV-om dokazana je u 60% slučajeva [106]. O teškoj kliničkoj slici jednog pacijenta koinficiranog HMPV-om i RSV-om izvještava i studija autora iz Japana [107]. U istoj studiji međutim nije zamijećena razlika u kliničkoj slici između pacijenata inficiranih samo s HMPV-om u odnosu na one koji su bili koinficirani s HMPV-om i AD [107]. Istraživanje van Woensela i sur. pokazuje da teška klinička slika ne mora biti rezultat koinfekcije s RSV-om i HMPV-om. Oni su promatrali 30-ero mehanički ventilirane djece s infekcijom DDS-a uzrokovanom RSV-om i niti u jednog od ovih pacijenta nisu dokazali koinfekciju HMPV-om [108].

U našoj studiji dokazana je koinfekcija nekim drugim virusom u troje djece (tablica 12). To su bile po jedna koinfekcija s virusima PI-3, RSV-om i adenovirusom. U bolesnika koji je imao koinfekciju s virusom PI-3 u stvari se radilo o dokazanoj superinfekciji virusom PI-3 budući smo u NFS-u ovog bolesnika prikupljenom tjedan dana prije nalaza koinfekcije dokazali samo HMPV. Klinički i laboratorijiski nalazi u ovog bolesnika bolesnika pokazali su izrazito pogoršanje u vrijeme superinfekcije virusom PI-3. U skladu sa prethodno navedenim nalazom autora iz Japana, koinfekcija HMPV-om i adenovirusom u jednog našeg bolesnika s izuzetno teškom predliježećom bolesti nije rezultirala teškom kliničkom slikom već samo IGDS-a. Koinfekcija RSV-om i HMPV-om u jedne naše pacijentice nije rezultirala razvojem teške kliničke slike.

Sekvenciranjem 30 HMPV sojeva i analizom odsječka djela F gena utvrdili smo da su u sezoni 2005/2006 u sjeverozapadnoj Hrvatskoj bila prisutna sva četiri podtipa HMPV-a (slika 35 i 36). Cirkulacija svih četiriju podtipa tijekom jedne sezone opisana

je u studijama iz Australije [64,72], Italije [30,156] i Njemačke [29]. U suprotnosti s ovim nalazom studije iz SAD-a i Južne Afrike izvještavaju o istovremenom kruženju do najviše tri podtipa istodobno [78,157].

Najčešći je slučaj da tijekom jedne zimske sezone prevladava jedan podtip. Tako je u Australiji 2001 god. prevladavao podtip A1, 2002 god. podtip A2, 2003 god. se zastupljenost pojedinog podtipa nije značajno razlikovala, dok je 2004. god. prevladavao podtip B1 [64,72]. U Njemačkoj je tijekom sezone 2002/2003 prevladavao podtip A2 uz dominaciju A2a varijante, dok su u sezoni 2004/2005 podjednako bili zastupljeni B1 i A2 podtip uz dominaciju A2b varijante [29]. Sveukupno u ove dvije sezone varijanta A2b je u Njemačkoj dokazana u 30% slučajeva.

U našem istraživanju najzastupljeniji podtip u sezoni 2005/2006 bio je podtip B2 iza kojega po učestalosti slijedi podtip B1 (slika 36). Većina podtipova dokazana u sjevernoj Italiji i zapadnoj Austriji u sezoni 2005/2006 također je pripadala B genogrupi [88]. Isti autori izvještavaju o detekciji veoma malog broja HMPV sojeva podgrupe A2 i niti jednog soja podgrupe A1 tijekom navedene sezone u zapadnoj Austriji i sjevernoj Italiji. Iz ovoga slijedi da je dominantan genotip te sezone na širem području centralne Europe bio genotip B.

U dvoje naših pacijenata dokazana je varijanta A2b. Jedan od dvije dokazane variajnte A2b (HR06-41) pripadao je pacijentici čije je stalno prebivalište u Njemačkoj, a u Hrvatsku je s roditeljima došla provesti novogodišnje praznike tijekom kojih je zbog ARI hospitalizirana. Njeni su roditelji imali simptome ARI nekoliko dana prije dolaska u Hrvatsku tj. ARI su stekli u Njemačkoj, a djevojčica se prema anamnestičkim podacima inficirala od roditelja. Na temelju ovih epidemioloških podataka, kao i podatka o kruženju A2b varijante u Njemačkoj u prethodnoj sezoni

(2004/2005) možemo zaključiti da se u ovome slučaju radilo o specifičnoj varijanti podtipa A2 uvezenoj iz Njemačke. Nadalje, druga od dviju dokaznih varijanti A2b u našoj studiji (HR05-17425) dokazana je kod pacijenta iz Hrvatskog zagorja u razmaku od 15 dana od detekcije prethodno opisane varijante. Detaljnom epidemiološkom anamnezom nađeno je da ovaj pacijent nije bio u Njemačkoj, niti je bio u kontaktu s osobom koja je doputovala iz Njemačke. Iz ovoga zaključujemo da je, iako u manjem opsegu u sezoni 2005/2006, varijanta A2b kružila u Hrvatskoj neovisno od uvoza sojeva iz Njemačke.

Iz prikaza filogenetskog stabla (slika 35) naših HMPV sojeva možemo uočiti da je dokazano 6 istih sekvenca podtipa B2 i dvije iste sekvence podtipa B1. Sojevi istih sekvenci podtipa B2 dokazani su u uzorcima pacijenata hospitaliziranih u dvije bolnice, ali u veoma kratkom vremenskom razmaku (unutar 15 dana, siječanj 2006), iz čega zaključujemo da je dotični podtip bio dominantan u to doba u Zagrebu i široj okolici. Dva identična soja podtipa B1 dokazana su u uzorcima od dva djeteta dugotrajno smještenih u istoj bolnici, a zaprimljenim u laboratorij u razmaku od jednog dana. Ovaj nalaz upućuje na intrahospitalnu infekciju HMPV-om. Ipak, moramo napomenuti da je ograničenje ove studije to što smo sekvencirali dio F gena koji je relativno konzerviran [16]. U slučaju da želimo sa 100% sigurnošću dokazati da se radi o potpuno identičnim sojevima potrebno bi bilo učiniti dodatna istraživanja sekvenciranjem divergentnijeg G gena ili cijelog HMPV genoma.

Dva HMPV soja (HR06-365 i HR06-367) prikupljena su od bliskih rođaka (brata i sestre) u istome danu. Anamnestički podaci ukazivali su na to da je mlađa sestra inficirana u kontaktu sa starijim bratom koji je već neko vrijeme imao simptome ARI. Detaljnom molekularnom analizom ova dva soja uočena je razlika u jednom

nukleotidu koja je rezultirala izmjenom u aminokiselinskom slijedu (slika 37). Nadalje, dva HMPV pozitivna uzorka (HR06-67and HR06-473) prikupljena su od istog pacijenta u razmaku od 7 dana. Analiza ova dva soja pokazala je razliku između sojeva u dva nukleotida koja međutim nije rezultirala promjenom u slijedu aminokiselina. S obzirom na kratak vremenski period između prikupljanja ovih uzoraka čini se da ovi slučajevi predstavljaju infekciju istim sojem koji je mutirao tijekom replikacije u domaćinu. Ovo stvaranje kvazispeciesa *in vivo* tijekom HMPV infekcije zamijetili su i Hata i sur. [102]. S obzirom da su promjene na F proteinu veoma značajne za imunološki odgovor domaćina vrlo je važno pratiti mutacije na F genu kako bi u budućnosti mogli što bolje procijeniti njihov značaj za evoluciju samog virusa. Tako je nedavno opisana studija iz Irana tijekom koje je zamijećena neuobičajeno visoka incidencija HMPV-a (54,4%) u male djece [68]. Ovu visoku učestalost autori pripisuju antigenski izmjenjenom virusu, točnije, izmjenjenom F proteinu na kojeg većina populacije nije imala adekvatan imunološki odgovor.

Za RSV infekciju je dokazno da su određeni RSV genotipovi unutar grupe A povezani sa težim oblikom bolesti [158]. Svega nekoliko studija do sada naznačile su mogućnost povezanosti određenog HMPV genotipa s težinom kliničke slike [54, 66,102,104]. Studija iz Singapura utvrdila je veću učestalost IDDS-a u pacijenata inficiranih podtipom A2 [54]. Autori studije iz SAD-a primjećuju da su svi pacijenti koji su trebali bolničko liječenje bili inficirani s genotipom A [66]. Autori iz Japana sugeriraju moguću povezanost genotipa A sa infekcijom središnjeg živčanog sustava [102]. Vjerojatno najvažnija studija u ovom smislu je studija Vicente i sur. Oni su uspoređivali grupe pacijenata inficirane genogrupama A i B promatrajući objektivne laboratorijske parametre (stupanj hipoksemije) i našli da je u male djece klinička slika

uzrokovana genotipom A teža od one uzrokovane genotipom B. U suprotnosti s ovim nalazima je studija Williamsa i sur. u kojoj nije zamijećena razlika u kliničkoj slici bolesti uzrokovnoj različitim genotipovima [78]. Rezultati naše studije pokazali su da je u svih pacijenata infekcija genotipom A rezultirala IDDS (slika 39) dok je 36% infekcija genogrupom B rezultiralo je IGDS. Nasuprot tome svi sojevi koji su dokazani u pacijenta koji su primali nadoknadu kisikom pripadali su genotipu B1 i B2. Komentirajući ove rezultate treba uzeti u obzir da smo u promatranoj sezoni dokazali veoma mali broj (N=4) sojeva genogrupe A. Iako postoje indicije da genotip A uzrokuje težu kliničku sliku smatramo da su potrebna daljnja opsežnija istraživanja koja će razlučiti postoje li stvarne razlike u težini bolesti s obzirom na pojedini HMPV genotip.

Na kraju ove rasprave htjeli bi naglasiti opravdanost i neophodnost uporabe metoda molekularne dijagnostike u dijagnostici HMPV infekcije. Metoda molekularne dijagnostike opravdano se smatra zlatnim standardom u dijagnostici HMPV infekcije zbog izrazito zahtjevne, skupe i što je najvažnije u odnosu na molekularnu dijagnostiku neosjetljive izolacije ovog virusa [36,124]. Studije koje su učestalost HMPV infekcije procjenjivale na temelju izolacije izvještavale su o veoma niskoj učestalosti ovog virusa (~1,5%) [50,57,124]. Ove rezultate potvrdila je i naša studija u kojoj smo metodom izolacije HMPV uspjeli dokazati u svega 15% uzorka koji su bili pozitivni RT-PCR metodom u stvarnom vremenu za dokaz N gena, odnosno u svega 1,2% svih ispitivanih uzoraka.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata provedenog istraživanja možemo zaključiti slijedeće:

1. Učestalost HMPV-a u sjeverozapadnoj Hrvatskoj, u hospitalizirane djece s ARI mlađe od 5 godina, u sezoni 2005/2006 iznosila je 8,2 %. HMPV je bio treći dokazani uzročnik ARI u ispitivanoj skupini bolesnika odmah nakon RSV-a (25,1%) i AD-a (10,2%). Virusi PI uzrokovali su 6% ARI, a virusi INFL 0,7% ARI u našoj skupini bolesnika.
2. Vrh incidencije HMPV infekcije zabilježen je u siječnju 2006, dok je vrh indicencije RSV infekcije zabilježen u veljači iste godine. Incidencija AD i virusa PI nije se mijenjala tijekom istraživanog razdoblja, dok je virus INFL tip A dokazan tek početkom ožujka 2006. god.
3. U svim grupama djece inficiranim pojedinim virusom pa tako i u grupi djece inficirane HMPV-om dječaci su oboljevali češće od djevojčica. Djeca inficirana HMPV-om nisu se značajno razlikovala prema spolu u odnosu na djecu inficiranu nekim drugim respiratornim virusom.
4. Djeca inficirana AD-om bila su značajno starija od djece oboljele od RSV-a i HMPV-a, dok se djeca inficirana HMPV-om, RSV-om i virusima PI nisu međusobno razlikovala po dobi. Učestalost HMPV infekcija ne mijenja se s obzirom na dob do 5-e god. života. Učestalost RSV infekcija je sve manja, dok je učestalost infekcija uzrokovanih s AD-om sve veća s porastom dobi.
5. HMPV je uzročnik IGDS-a u 4% i IDDS-a u 15% slučajeva hospitalizirane djece <5 god. s ARI. HMPV značajno češće uzrokuje IDDS u odnosu na AD i PI viruse, ali ne i u odnosu na RSV. Klinička slika HMPV infekcije promatrana

prema učestalosti pojedinih klinčkih sindroma ne razlikuje se od kliničke slike RSV infekcija.

6. Dokazano je da je superinfekcija s PI-3 u jednog HMPV inficiranog djeteta dovela do pogoršanja kliničke slike.
7. U sezoni 2005/2006 u sjeverozapadnoj Hrvatskoj kružila su sva četiri podtipa HMPV-a. Najzastupljeniji podtip bio je podtip B2, iza kojega su po učestalosti slijedili podtipovi B1, A2 i A1. U istoj sezoni dokazane su i varijante A2 podtipa (A2a i A2b).
8. Ukazano je na na stvaranje kvazispeciesa u tijeku HMPV infekcije *in vivo*.
9. Iako postoje naznake da genotip A uzrokuje težu kliničku sliku, nije dokazano postojanje razlike u težini klinčke slike s obzirom na pojedini HMPV genotip.

7. SAŽETAK

Humani metapneumovirus (HMPV) jedan je od važnih uzročnika akutnih infekcija dišnog sustava (ARI), osobito u male djece. Cilj ovog rada bio je odrediti incidenciju HMPV-a u hospitalizirane djece mlađe od 5 god. s ARI u zimskoj sezoni 2005/2006, kao i analizirati genetsko ustrojstvo dokazanih HMPV sojeva.

U razdoblju od 1. prosinca 2005. do 31. ožujka 2006. prikupljeni su nazofaringealni sekreti (NFS) 402 djece do 5 godina starosti oboljele od ARI hospitalizirane u dvije zagrebačke klinike. NFS su testirani metodom RT-PCR u stvarnom vremenu s početnicama koje dokazuju gen za nukleoprotein (N) HMPV-a. U svrhu izrade filogentetskog stabla, umnožen je, detektiran i sekvenciran dio gena koji kodira fuzijski (F) protein u 30 uzoraka pozitivnih na N gen HMPV-a.

HMPV infekcija dokazana je u 33/402 bolesnika (8,2%), infekcija respiratornim sincicijskim virusom (RSV) u 101 (25,1%), adenovirusima u 41 (10,2%), virusima parainfluence tipa 1, 2 ili 3 u 24 bolesnika (6,0%) i virusom influence A u 3 (0.7%) bolesnika. Vrh incidencije HMPV infekcije zabilježen je u siječnju 2006. god. U tri pacijenta dokazana je koinfekcija s još jednim respiratornim virusom (1 parainfluenza virus tip 3, 1 RSV, 1 adenovirus). Djeca inficiran HMPV-om nisu se razlikovala po spolu u odnosu na djecu inficiranu nekim drugim virusom. S obzirom na dob, djeca inficirana adenovirusom bila su značajno starija od djece inficirane HMPV-om, RSV-om ili virusima parainfluence. Većina infekcija uzrokovana HMPV-om (69.7%) bila je infekcija donjeg dišnog susutava (IDDS). Usporedbom učestalosti klinčkih sindroma uzrokovanih pojedinim virusima nismo pronašli razliku u djece inficirane HMPV-om i RSV-om, dok su djeca inficirana adenovirusom i virusima parainfluence imala češće infekcije gornjeg dišnog sustava (IGDS) u odnosu na djecu inficiranu HMPV-om i

RSV-om. U bolesnika s koinfekcijom virusom parinfluence tip 3 i HMPV-om uočena je teža klinička slika u odnosu na kliničku sliku koju je bolesnik pokazivao kada je bio inficiran samo s HMPV-om.

Filogenetska analiza sojeva dokazala je cirkulaciju dviju glavnih genetičkih linija HMPV-a (A i B). Dokazne su i dvije podgrupe unutar grupa A i B (A1, A2, B1 i B2), te dvije varijante unutar podgrupe A2 (A2a i A2b). Najčešći dokazan podtip bio je podtip B2 (15/30) zatim slijedi B1 (11/30), dok je genotip A dokazan u samo četiri uzorka. Epidemiološki podaci ukazuju da je jedna od dokaznih varijanti A2b bila uvezena iz Njemačke.

Svi bolesnici inficirani HMPV genotipom A imali su kliničku sliku IDDS (4/4). IGDS je malo 36% (9/25) djece inficirano genotipom B. U sve djece koja su primala kisik a bila inficirana isključivo s HMPV-om dokazan je podtip B2, dok je kod koinficirane djece koja su primala kisik dokazan podtip B1.

Određivanje učestalosti HMPV-a značajan je doprinos etiologiji virusnih ARI u Hrvatskoj, a genotipizacija autohtonih sojeva iz Hrvatske molekularnoj epidemiologiji ovog virusa u regiji i svijetu.

8. SUMMARY

Human metapneumovirus (HMPV) is an important respiratory pathogen, especially among young children. The aim of this study was to determine the incidence of HMPV infection in hospitalized children with acute respiratory tract infection (ARTI) in the season 2005/2006 in Croatia, as well as to perform the genotypic analysis of detected HMPV strains.

From December 1 to March 31 2005/2006 nasopharyngeal secretions (NPSs) were collected from 402 inpatients up to 5 years of age with ARTI hospitalized in two clinics in Zagreb. NPSs were tested by real time RT-PCR assay targeting the nucleoprotein (N) gene of HMPV. To perform the phylogenetic study, partial nucleotide sequences were obtained for HMPV fusion (F) gene of 30 HMPV positive samples.

HMPV was detected in 33 (8.2%), respiratory syncitial virus (RSV) in 101 (25.1%), adenoviruses in 41 (10.2%), parainfluenza viruses types1-3 in 24 patients (6.0%) and influenza viruses in 3 (0.7%) patients. The peak incidence of HMPV infection was detected in January (18/33). Three of 34 HMPV positive specimens were positive for other viral pathogens (1- parainfluenza virus type 3, 1- RSV, 1- adenovirus). No difference was noted between HMPV infected children and children infected with other viruses regarding to the sex. Children infected with adenovirus were significantly older than children infected with other viruses (HMPV, RSV and parainfluenza viruses).

The majority of the infections caused by HMPV (69.7%) children presented with lower respiratory tract infections (LRTI). Comparative analysis of the clinical presentation of HMPV and RSV infected children revealed no significant differences

between those two groups while adenoviruses and parainfluenza viruses caused more upper respiratory tract infections (URTI) than HMPV and RSV.

Patient co-infected with parainfluenza virus type 3 and HMPV showed more severe clinical picture comparing to the clinical presentation of single-infection of HMPV in the same patient.

Phylogenetic analysis showed the circulation of two main genetic lineages (A and B). It also showed the existence of two sublineages within the group B (B1 and B2) and three subclusters within lineage A (A1, A2a and A2b). The most prevalent subtype was the genotype B2 (15/30), followed by B1 (11/30), while group A of HMPV was detected in only four specimens. Interestingly, for one A2b genotype isolate epidemiological data suggests importation from Germany.

All patients infected with HMPV genotype A had clinical presentation of LRTI, while 36% (9/25) of those infected with genotype B had URTI. All strains detected from patients infected with HMPV alone who required supplemental oxygen belonged to the genotype B2, while two HMPV strains from patients with co-infection who received supplemental oxygen belonged to the genotype B1.

Evaluation of HMPV incidence contributes to the etiology of ARI in Croatia, while genotyping of the HMPV strains from Croatia contributes to the data of the genetic variability and molecular epidemiology of the virus in the region and in the world.

9. POPIS LITERATURE

1. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory disease. Nat Med 2001;7:719-24.

2. van den Hoogen BG, Besterbroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. Virology 2002;295:119-32.

3. ICTVdB Management (2006). 01.048.2.01. Pneumovirus. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA

4. Njenga KM, Lwamba HM, Seal BS. Metapneumoviruses in birds and humans. Virus Research 2003;91:163-9.

5. Peret TCT, Boivin G, Li Y et al. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. J Infect Dis 2002;185:1660-3.

6. Hamelin ME, Abed Y, Boivin G. Human Metapneumovirus: A new player among respiratory viruses. Clin Infect Dis 2004;38:983-90.

7. Collins PL, Crowe JE Jr. Respiratory sincytial virus and Metapneumovirus. In: Knipe DM, Howley PM (eds). Fields virology. 5th ed. Lippincot W&W-Wolters Kluwer, Philadelphia, 2007, str. 1601-46.

8. Collins PL, Hill MG, Cristina J, Grosfeld G. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand virus. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:81-5.

9. Buchholz UJ, Biacchesi S, Pham NQ et al. Deletion of M2 gene open reading frames 1 and 2 of human metapneumovirus: effects on RNA synthesis, attenuation and immunogenicity. J Virol 2005;79:6588-97.

10. Biacchesi S, Pham NQ, Skiadopoulos MH, Murphy BR, Collins PL, Buchholz UJ. Infection of nonhmanprimates with recombinant human metapneumovirus lacking the SH, G, or M2-2 protein categorizes each as a nonessential accessory protein and identifies vaccine candidates. J Virol 2005;79:12608-13.

11. Miller AS, Tollefson S, Crowe JE Jr., Williams JV, Wright DW. Examination of a fusogenic hexameric core from human metapneumovirus and identification of a potent synthetic peptide inhibitor from the heptad repeat 1 region. J Virol 2007;81:141-9.

12. Schowalter RM, Smith SE, Dutch RE. Characterization of human metapneumovirus F protein-promoted membrane fusion: critical roles for proteolitic processing and low pH. J Virol 2006;80:10931-41.

13. Schickli JH, Kaur J, Ulbrandt N, Spaete RR, Tang RS. An S101P sibstitution in the putative cleavage motif of the human metapneumovirus fusion protein is a major determinant for trypsin-independent growth in Vero cells and does not alter tissue tropism in hamsters. J Virol 2005; 79:10678-89.

14. Biacchesi S, Pham NQ, Skiadopoulos MH, Murphy BR, Collins PL, Buchholz UJ. Modification of the trypsin-dependent cleavage action site of the human metapneumovirus fusion protein to be trypsin independent does not increase replication or spread in rodents or nonhuman primates. J Virol 2006;80:5798-806.

15. Bastien N, Liu L, Ward D, Taylor T, Li Y. Genetic variability of the G glikoprotein gene of human metapneumovirus. J Clin Microbiol 2004;42:3532-7.

16. Ishiguro N, Ebihara T, Endo R et al. High gentic diversity of the attachment (G) protein of human metapneumovirus. J Clin Microbiol 2004;42:3406-14.

17. Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Yang L et al. Recombinant human metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and/or attachment G glycoprotein: deletion of G yields a promising vaccine candidate. J Virol 2004;78:12877-87.

18. Liu L, Bastien N, Li Y. Intracellular processing, glycosylation,and cell surface expression of human metapneumovirus attachment glycoprotein. J Virol 2007; 81:13435-43.

19. Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ et al. The Two major human metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenically, and the fusion (F) protein is a major contributor to this antigenic relatedness. J Virol 2004;78:6927-37.

20. Tang RS, Mahmood K, Macphail M et al. A host-range restricted parainfluenza virus type 3 (PIV3) expressing the human metapneumovirus (hMPV) fusion protein elicits protective immunity in african green monkeys. Vaccine 2005; 23(14):1657-67.

21. Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ et al. Individual contributions of the huamn metapneumovirus F,G and SH surface glycoproteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunitiy. Virology 2006;345(2):492-501.

22. Lamb RA, Parks GD. *Paramyxoviridae:* The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (eds). Fields virology. 5th ed. Lippincot W&W-Wolters Kluwer, Philadelphia, 2007, str. 1449-84.

23. Boivin G, Abed Y, Pelletier G et al. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. J Infect Dis 2002;186:1330-4.

24. Bastien N, Normand S, Taylor T et al. Sequence analysis of the N, P, M and F genes of Canadian human metapneumoviruses. Virus Research 2003;93:51-62.

25. Mackay IM, Bialasiewicz S, Waliuzzaman Z et al. Use of the P gene to genotype human metapneumovirus idntifies 4 viral subtypes. J Infect Dis 2004;190(11):1913-8.

26. Boivin G, Mackay I, Sloots TP et al. Global genetic diversity of human metapneumovirus fusion gene. Emerg Infect Dis 2004;10:1154-7.

27. Bouscambert-Duchamp M, Lina B, Trompette A, Moret H, Motte J, Andreoletti L. Detection of human metapneumovirus RNA sequences in nasopharyngeal aspirates of young French children with acute bronchiolitis by real-time reverse transcriptase PCR and phylogenetic analysis. J Clin Microbiol 2005;43:1411-4.

28. Galiano M, Trento A, Ver L, Carballal G, Videla C. Genetic heterogeneity of G and F pfotein genes from argentinean human metapneumovirus strains. J med Virol 2006;78:631-7.

29. Huck B, Scharf G, Neumann-Haefelin D, Puppe W, Weigl J, Falcone V. Novel human metapneumovirus sublineage. Emerg Infect Dis 2006;12:147-50.

30. Gerna G, Sarasini A, Percivalle E et al. Prospective study of human metapneumovirus infection: diagnosis, typing and virus quantification in nasopharyngeal secretions from pediatric patients. J Clin Virol 2007;40:236-40.

31. Chung JY, Han TH, Kim SW, Hwang ES. Genotype variability of human metapneumovirus, South Korea. J med Virol 2008;80:902-5.

32. Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Boivin G et al. Genetic diversitiy between human metapneumovirus subgroups. Virology 2003;315:1-9.

33. Van den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L et al. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. Emerg Infect Dis 2004;10:658-66.

34. Ulbrandt ND, Ji H, Patel NK et al. Isolation and characterization of monoclonal antibodies which neutralize human metapneumovirus in vitro and in vivo. J Virol 2006;80:7799-806.

35. Herfst S, de Graaf M, Schrauwen EJ et al. Imunization of Syrian golden hamsters with F subunit vaccine of human metapneumovirus induces protection against challenge with homologous or heterologous strains. J Gen Virol 2007;88:2702-9.

36. Hamelin ME, Boivin G. Human metapneumovirus - a ubiquitous and long-staniding respiratory pathogen. Pediatr Infect Dis J 2005;24:S203-7.

37. Principi N, Bosis S, Esposito S. Human metapneumovirus in pediatric patients. Clin Microbiol Infect 2006;12:301-8.

38. Viazov S, Ratjen F, Scheidhauer R, Fiedler M, Roggendorf M. High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. J Clin Microbiol 2003;41:3043-5.

39. Stockton J, Stephenson I, Fleming D, Zambon M. Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. Emerg Infect Dis 2002;8:897-901.

40. Ordas J, Boga JA, Alvarez-Argüelles M et al. Role of metapneumovirus in viral respiratory infections in young children. J Clin microbial 2006;44.2739-42.

41. Freymuth F, Vabret A, Legrand L et al. Presence of the newhuman metapneumovirus in French children with bronchiolitis. Pediatr Infect Dis J 2003;22:92-4.

42. Jartti T, van den Hoogen B, Garofalo RP, Osterhaus ADME, Ruuskanen O. Metapneumovirus and acute wheezing in children. Lancet 2002;360:1393-4.

43. Christensen A, Nordbo SA, Jeansson S, Slordahl S. Lower respiratory tract infection caused by human metapneumovirus in two children: the first report of human metapneumovirus infection in Norway. Scand J Infect Dis 2003;35(10):772-4.

44. Bosis S, Esposito S, Niesters HGM, Crovari P,Osterhaus ADME, Principi N. Impact of human metapneumovirus in childhood: comparison with respiratory syncytial virus and influenza viruses. J med Virol 2005;75:101-4.

45. Esper F, Boucher D, Weibel C, Martinello RA, Kahn JS. Human metapneumovirus infection in the United States: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. Paediatrics 2003;111:1407-10.

46. Bastien N, Ward D, Van Caeseele P et al. Human metapneumovirus infection in the Canadian population. J Clin Microbiol 2003;41:4642-6.

47. Noyola DE, Alpuche-Solis AG, Herrera-Diaz A, Soria-Guerra RE, Sanchez-Alvarado J, Lopez-Revilla R. Human metapneumovirus infections in Mexico :epidemiological and clinical characteristics. J Med Microbiol 2005;54:969-74.

48. Galiano M, Videla C, Puch SS, Martinez A, Echavarria M, Carballal G. Evidence of human metapneumovirus in Argentina. J med Virol 2004;72:299-303.

49. da Silva LHA, Spilki RF, Riccetto AGL, de Almeida RS, Baracat ECE, Arns CW. Variant isolates of human metapneumovirus subgroup B genotype 1 in Campinas, brazil. J Clin Virol 2008;doi:10.1016/j.jcv.2007.11.010

50. Gray GC, Capuano AW, Setterquist SF et al. Human metapneumovirus, Peru. Emerg Infect Dis 2006,12:347-50.

51. Ebihara T, Endo R, Kikuta H et al. Human metapneumovirus infection in Japanese children. J Clin Microbiol 2004;42:126-32.

52. Peiris JSM, Tang W, Chan K et al. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. Emerg Infect Dis2003;9:628-33.

53. Brooks WA, Erdman D, Terebuh P et al. Human metapneumovirus infection among children, Bangladesh. Emerg Infect Dis 2007;13.1611-3.

54. Loo LH, Tan BH, Ng LM, Tee NWS, Lin RTP, Sugrue RJ. Human metapneumovirus in children, Singapore. Emerg Infect Dis 2007;13:1396-8.

55. Thanasugarn W, Samransamruajkit R, Vanapongtiparon P et al. Human metapneumovirus infection in Thai children. Scand J Infect Dis 2003;35:754-6.

56. Chung JY, Han TH, Kim BE, Kim CK, Kim SW, Hwang E. Human metapneumovirus infection in hospitalized children with acute respiratory disease in Korea. J Korean Med Sci 2006;21:838-42.

57. Nissen MD, Siebert DJ, Mackay IM, Sloots TP, Withers SJ. Evidence of human metapneumovirus in Australian children. Med J Aust 2002;176:188.

58. Madhi SA, Ludewick H, Abed Y, Klugman KP, Boivin G. Human metapneumovirus-associated lower respiratory tract infections among hospitalized human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected and HIV-uninfected African infants. Clin Infect Dis 2003;37:1705-10.

59. Foulongne V, Guyon G, Rodiere M, Segondy M. Human metapneumovirus infection in young children hospitalized with respiratory tract disease. Pediatr Infect Dis J 2006;25:354-9.

60. Heikkinen T, Österback R, Peltola V, Jartti T, Vainionpää. Human metapneumovirus infection in children. Emerg Infect Dis 2008;14:101-6.

61. Maggi F, Pifferi M, Vatteroni M et al. Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in 3-year study of nasal swabs from infants in Italy. J Clin Microbiol 2003;41:2987-91.

62. Garcia-Garcia ML, Calvo C, Perez-Brena P, De Cea JM, Acosta B, Casas I. Prevalence and clinical characteristics of human metapneumovirus infections in hospitalized infants in Spain. Pediatr Pulm 2006;41:863-71.

63. Regev L, Hindiyeh M, Shulman LM et al. Characteriaztion of human metapneumovirus infection in Israel. J Clin Microbil 2006;44:1484-9.

64. Sloots TP, Mackay IM, Bialasiewicz S et al. Human metapneumovirus, Australia, 2001-2004. Emerg Infect Dis 2006;12:1263-6.

65. Mullins JA, Erdman D.D.,Weinberg GA et al. Human metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illnes. Emerg Infect Dis 2004;10:700-5.

66. Esper F, Martinello RA, Boucher D et al. A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years. J Infect Dis 2004;189:1388-96.

67. Boivin G, De Serres G, Cote S et al. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. Emerg Infect Dis 2003;9:634-40.

68. Arabpour m, Samarbafzadeh AR, Makvandi M et al. The highest prevalence of human metapneumovirus in Ahwaz children accompanied by acute respiratory infections. Ind J Med Microbiol 2008;26(2):123-6.

69. Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, Walsh EE. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. J Infect Dis 2003; 187:785-90.

70. van den Hoogen BG, van Doornum GJJ, Fockens JC et al. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. J Infect Dis 2003;188:1571-7.

71. Thomazelli LM, Vieira S, Leal AL et al. Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. J Pediatr2007;83(5):422-8.

72. Mackay MI, Bialasiewicz S, Jacob KC et al. Genetic diversity of human metapneumovirus over 4 consecutive years in Australia. J Infect Dis 2006;193:1630-3.

73. Kaida A, Iritani N, Kubo H, Shiomi M, Kohdera U, Murakami T. Seasonal distribution and phylogenetic analysis of human metapneumovirus among children in Osaka city, Japan. J Clin Virol 2006;35:394-9.

74. Chano F, Rousseau C, Laferriere C, Couillard M, Charest H. Epidemiological survey of human metapneumovirus infection in a large pediatric tertiary care center. J Clin Microbiol 2005;43:5520-5.

75. Caracciolo S, Minini C, Colombrita D et al. Human metapneumovirus infection in young children hospitalized with acute respiratory tract disease. Pediatr Infect Dis J 2008;27(5):1-7.

76. Osterhaus AD, Fouchier R. Human metapneumovirus in the community. Lancet 2003;361:890-1.

77. Robinson JL, Lee BE, Bastien N, Li Y. Seasonalitiy and clinical features of human metapneumovirus infection in children in Northern Alberta. J Med Virol 2005;76:98-105.

78. Williams JV, Wang CK, Yang C et al. The role of human metapneumovirus in upper respiratory tract infections in children: a 20-year experience. J Infect Dis 2006;193(3):387-95.

79. Wiliams JV, Harris PA, Tollefson SJ et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. N Engl J Med 2004;350:443-50.

80. Mlinarić-Galinović G, Welliver RC, Vilibic-Cavlek T et al. The biennial cycle of respratory syncytial virus outbreaks in Croatia. Virol J 2008;5:18.

81. Ebihara T, Endo R, Kikuta H, Ishiguro N, Yoshioka M, Ma X, et al. Seroprevalence of human metapneumovirus in Japan. J Med Virol. 2003;70:281-3.

82. Wolf D G, Zakay-Rones Z, Fadeela A, Greenberg D, Dagan R. High Seroprevalence of human metapneumovirus among young children in Israel. J Infect Dis. 2003;188:1865-7.

83. Mirazo S, Ruchansky D,Blanc A, Arbiza J. Serologic evidence of human metapneumovirus circulation in Uruguay. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100(7):715-8.

84. Ljubin Sternak S, Vilibić Čavlek T, Falsey AR, Walsh EE, Mlinarić Galinović G. Serosurvey of human metapneumovirus infection in Croatia. Croat Med J 2006;47:878-81.

85. Ebihara T, Endo R, Ishiguro N, Nakayama T, Sawada H, Kikuta H. Early reinfection with human metapneumovirus in an infant. J Clin Microbil 2004;42:5944-6.

86. Pelletier G, dery p, Abed Y, Boivin G. Respiratory tract reinfections by the new human metapneumovirus in an immunocompromised child. Emerg infect Dis 2002;8:976-8.

87. Agapov E, Sumino Kc, Gaudreault-Keener M, Storch GA, Holtzman MJ. Genetic variability of huan metapneumovirus infection:evidence of a shift in viral genotype withouth a change in illness. J Infect Dis 2006;193:396-403.

88. Larcher C, Pagani E, Rossi P et al. Comparison of human metapneumovirus genotypes from the province of Bolzano in northern Italy with strains from surrounding regions in Italy and Austria. Jpn j Infect Dis 2008;61:154-6.

89. Falsey AR, Criddle MC, Walsh EE. Detection of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus by reverse tanscription polymerase chain reaction in adults with and withouth respiratory illness. J Cin Virol 2006;35(1):46-50.

90. Williams VJ, Tollefson JS, Nair S, Chonmaitree T. Association of human metapneumovirus with acute otitis media. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2006;70(7):1189-93.

91. Dare R, Sanghavi S, Bullotta A et al. Diagnosis of human metapneumovirus infection in immunosuppressed lung transplant recipients and children evaluated for pertussis. J Clin Microbiol 2007;45(2):548-52.

92. Mardešić D. Bolesti dišnih organa. U: Mardešić D. Pedijatrija 5.izd. Zagreb:Školska knjiga, 1991,655-96.

93. Lukić-Grlić A. Suptipizacija sojeva respiratornog sincicjskog virus izoliranih u Hrvatskoj i Austriji. Doktorska distertacija. Zagreb: Medicinski fakultet sveučilišta u Zagrebu,1998.

94. McIntosh K. Bronchiolitis and asthma: possible common pathogenic pathways. J Allergy Clin Immunol 1976;57:595-604.

95. Johnstone J, Majumdar SR, Fox JD, Marrie TJ. Human metapneumovirus pneumonia in adults:results of a prospective study. Clin Infect Dis 2008;46(4):571-4.

96. Williams JV, Crowe Jr. JE, Enriquez R et al. Human metapneumovirus infection plays an etiologic role in acute asthma exacerbations requiring hospitalization in adults. J Infect Dis 2005;192(7):1149-53.

97. Cane PA, van den Hoogen BG, Chakrabarti S, Fegan CD, Osterhaus ADME. Human metapneumovirus in a haematopoietic stem cell transplant recipient with fatal lower respiratory tract disease. Bone marrow Transplant 2003;31:309-10.

98. Williams VJ, Martino R, Rabella N et al. A prospective study comparing human metapneumovirus with other respiratory viruses in adults with hematologic malignancies and respiratory tract infections. J Infect Dis 2005;192(6):1061-5.

99. Abed Y, Boivin G. Persistent human metapneumovirus infection in immunocompromised child. Emerg Infect Dis. 2008;14(5):854-6.

100. Debiaggi M, Canducci F, Sanpaolo M et al. Persistent symptomless human metapneumovirus infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. J Infect Dis 2006,194:474-8.

101. Schildgen o, Glatzel T, Geikowski T et al. Human metapneumovirus RNA in encephalitis patient. Emerg Infect Dis 2005,11:467-70.

102. Kiyosawa S, Ito M, Hata M et al. A fatal case of encephalophaty possibly associated with human metapneumovirus infection. Jpn j Infect Dis 2007;60:328-9.

103. Li IW, To KK, Tang BS et al. Human metapneumovirus infection in an immunocompetent adult presenting as mononucleosis-like illness. J Infect 2008;56(5): 389-92.

104. Vicente D, Montes M, Cilla G, Perez-Yarza EG, Perez-Trallero E. Differeces in clinical severity between genotype A and genotype B human metapneumovirus infection in children. Clin Infect Dis 2006;42:111-3.

105. Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. Emerg Infect Dis 2003;9:372-5.

106. König B, König W, Arnold R, Werchau H, Ihorst G, Forster J. Prospective study of human metapneumovirus infection in children less than 3 years of age. J Clin Microbiol 2004;42:4632-5.

107. Kaida A, Kubo H, Goto K, Shiomi M, Kohdera U, Iritani N. Co-infection of human metapneumovirus with adenovirus or respiratory syncytial virus among children in Japan. Microbiol immunol 2007; 51(7):679-83.

108. van Woensel JBM, Bos AP, Lutter R, Rossen JWA, Schuurman R. Absence of human metapneumovirus co-infection in cases of severe respiratory syncytial virus infection. Padiatr Pulm 2006;41:872-4.

109. Vargas SO, Kozakewich HP, Perez-Atayade AR, McAdam AJ. Pathology of human metapneumovirus infection: insights into the pathogenesis of a newly identified respiratory virus. Pediatr Dev Pathol 2004;7:478-86.

110. Kuiken T, van den Hoogen BG, van Riel DAJ et al. Experimental human metapneumovirus infection of Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*) results in virus replication in ciliated epithelial cells and pneumocytes with associated lesions throughout the respiratory tract. Am J Pathol 2004;164(6):1893-900.

111. Hamelin ME, Yim K, Kunh KH, Cragin RP, Boukhvalova M, Blanco JC et al. Pathogenesis of human metapneumovirus lung infection in BALB/c mice and cotton rats. J Virol.2005;79:8894-903.

112. Hamelin Me, Prince GA, Gomez AM, Kinkead R, Boivin G. Human metapneumovirus infection induces long-term pulmonary inflammation associated with airway obstruction and hyperresponsiveness in mice. J Infect Dis. 2006; 193:1634-42.

113. Alvarez R, Harrod KS, Shieh WJ, Zaki S, Tripp RA. Human metapneumovirus persist in BALB/c mice despite the presence of neutralizing antibodies. J Virol 2004;78.14003-11.

114. Bao X, Liu T, Spetch L, Kolli D, Garofalo RP, Casola A. Airway epithelial cell response to human metapneumovirus infection. J Virol 2007; 368:91-101.

115. Alvarez R, Tripp RA. The immune response to human metapneumovirus is associated with aberrant immunitiy and impaired virus clearance in BALB/c mice. J Virol 2005; 79(10). 5971-8.

116. Huck B, Neumann-Haefelin D, Schmitt-Graeff A et al. Human metapneumovirus induces more severe disease and stronger innate immune response in BALB/C mice as compared with respiratory syncytial virus. Respiratory Research 2007;8:6

117. Guerrero-Plata A, Casola A, Garofalo RP. Human metapneumovirus induces a profile of lung cytokines distinct from that of respiratpry syncytial virus. J Virol 2005; 79:14992-7.

118. Guerrero-Plata A, Baron S, Poast JS, Adegboyega PA, Casola A, Garofalo PR. Activity and regulation of alpha interferon in respiratory syncytial virus and human metapneumovirus experimental infections. J Virol 2005; 79:10190-9.

119. Laham FR, Israele V, Casellas JM et al. Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with human metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy. J Infect Dis 2004;189:2047-56.

120. Tan MC, Battini L, Tuyama AC et al. Characterization of human metapneumovirus infection of myeloid dendritic cells. Virology 2007;357(1):1-9.

121. Deffrasnes C, Cote S, Boivin G. Analysis of replication kinetics of human metapneumovirus in different cell lines by real-time PCR. J Clin Microbiol 2005;43:488-90.

122. Chan PKS, Tam JS, Lam C et al. Human metapneumovirus detection in patients with severe acute respiratory syndrome. Emerg Infect Dis 2003;9:1058-63.

123. Ingram RE, Fenwick F, McGuckin R, Tefari A, Taylor C, Toms GL. Detection of human metapneumovirus in respiratory secretions by reverse-transcriptase polymerase chain reaction, indirect immunofluorescence, virus isolation in human bronchial epithelial cells. J Med Virol 2006;78:1223-31.

124. Reina J, Ferres F, Alcoceba E, Mena A, de Gopegui ER, Figuerola J. Comparison of different cell lines and incubation times in the isolation by the shell vial culture of human metapneumovirus from pediatric respiratory samples. J Clin Virol 2007;40:46-9.

125. Mackay IM, Jacob KC, Woolhouse D et al. Molecular assays for detection of human metapneumovirus. J Clin Microbiol 2003;41:100-5.

126. Cote S, Abed Y, Boivin G. Comparative evaluation of real-time PCR assays for detection of the human metapneumovirus. J Clin Microbiol 2003;41:3631-35.

127. Maertzdorf J, Wang CK, Brown JB et al. Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages. J Clin Microbiol 2004;42:981-6.

128. Ebihara T, Endo R, Ma X, Ishiguro N, Kikuta H. Detection of human metapneumovirus antigens in nasopharyngeal secretions by an immunofluorescent-antibody test. J Clin Microbiol 2005;43:1138-41.

129. Fenwick F, Young B, McGuckin R et al. Diagnosis of human metapneumovirus by immunofluorescence staining with monoclonal antibodies in the North-East England. J Clin Virol 2007;40:193-6.

130. Manoha C, Bour JB, Pitoiset C, Darniot M, Aho S, Pothier P. Rapid and sensitive detection of metapneumovirus in clinical specimens by indirect fluorescence assay using a monoclonal antibody. J med Virol 2008;80(1):154-8.

131. Aslanzadeh J, Zheng X, Li H et al. Prospective evaluation of rapid antigen tests for diagnosis of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus infections. J Clin Mirobiol 2008; 46(5):1682-5.

132. Kikuta H, Ebihara T, Endo R et al. Development of a rapid chromatographic immunoassay for detection of human metapneumovirus using monoclonal antibodies against nucleoprotein of hMPV. Hybridoma (Larchmt) 2007;26:17-21.

133. Kikuta H, Sakata C, Gamo R et al. Comparison of a lateral-flow immunochromatography assay with real-time reverse transcription-PCR for detection of human metapneumovirus. J Clin Microbiol 2008;46(3):928-32.

134. de Graaf M, Herfst S, Schrauwen EJA et al. An improved plaque reduction virus neutralization assay for human metapneumovirus. J Virol Methods 2007;143:169-74.

135. Hamelin ME, Boivin G. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for human metapneumovirus serology based on a recombinant viral protein. Clin Diagn Lab Immunol 2005; 12:249-53.

136. Hamelin ME, Prince GA, Boivin G. Effect of ribavirin and glucocorticoid treatment in a mouse model of human metapneumovirus infection. Antmicrob Agent Chem 2006;50:774-7.

137. Hamelin ME, Couture C, Sackett M et al. The prophylactic administration of a monoclonal antibody against human metapneumovirus attenuates viral disease and airways hyperresponsiveness in mice. Antivir Ther 2008;13(1):39-46.

138. Deffrasnes C, Hamelin ME, Prince GA, Boivin G. Identification and evaluation of a highly effective fusion inhibitor for human metapneumovirus. Antimicrob Agents Chemother 2008;52(1):279-87.

139. Hamelin ME, Couture C, Sackett MK, Boivin G. Enhanced lung disease and Th2 response following human metapneumovirus infection in mice immunized with the inactivated virus. J Gen Virol 2007;88:3391-400.

140. Yim KC, Cragin RP, Boukhvalova MS et al. Human metapneumovirus: enhanced pulmonary disease in cotton rats immunized with formalin-inactivated virus vaccine and challenged. Vaccine 2007;25(27):5034-40.

141. de Swart RL, van den Hoogen BG, Kuiken T et al. Immunization of macaques with formalin-inactivated human metapneumovirus induces hypersensitivity to hMPV infection. Vaccine 2007;25(51):8518-28.

142. Kim HW, Canchola JG, Brandt CD et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. Am J Epidemiol 1969;89:422-34.

143. Herfst S, Fouchier RAM. Vaccination approaches to combat human metapneumovirus lower respiratory tract infections. J Clin Virol 2008;41:49-52.

144. Herfst S, de graaf M, Schickli JH et al. Recovery of human metapneumovirus genetic lineages A and B from cloned cDNA. J Virol 2004;78:8264-70.

145. Buchholz UJ, Nagashima K, Murphy BR, Vollins PL. Live vaccines for human metapneumovirus designed by reverse genetics. Expert Rev Vaccines 2006;5(5):695-706.

146. Tang RS, Schickli JH, MacPhail M et al. Effects of human metapneumovirus and respiratory syntitial virus antigen insertion in two 3' proximal genome position of bovine/human parainfluenza virus type 3 on virus replication and immunogenicity. J Virol 2003;77(20):10819-28.

147. Pham QN, Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Murphy BR, Collins PL, Buchholz UJ. Chimeric recombinant human metapneumovirus with the nucleoprotein or phosphoprotein open reading frame replaced by that of avian metapneumovirus exhibit improved growth in vitro and attenuation in vivo. J Virol 2005;79:15114-22.

148. Cseke G, Wright DW, Tollefson Sj, Johnson JE, Crowe Jr JE, Williams JV. Human metapneumovirus fusion protein vaccines that are immunogenic and protective in cotton rats. J Virol 2007;81:698-707.

149. Mlinarić-Galinović G, Grljušić V. Nazofaringealni sekret bolesnika kao klinički materijal kod virusnih respiratornih infekcija. Liječ Vjes. 1989;111:213-4.

150. Brunetti M, Cohen J. Hematology. In: Robertson J, Shilkofski N (eds) The Harriet Lane handbook: a manual for pediatric house officers. 17th ed. Mosby Inc., Philadelphia, 2005, str. 346-7.

151. Gajewski KK. Cardiology. . In: Robertson J, Shilkofski N (eds) The Harriet Lane handbook: a manual for pediatric house officers. 17th ed. Mosby Inc., Philadelphia, 2005, str. 173.

152. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. Lippincot W&W-Wolters Kluwer, Philadelphia, 1997.

153. Murray PR, Baron JE, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH. Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington DC: ASM Press; 2003.

154. Ivanković D. Statistička analiza podataka u medicini. Zagreb:Medicinska naklada, 2004.

155. Petrie A, Sabin C. Medical statistics at a glance. 2nd ed. Blackwell Science, Oxford, 2005.

156. Gerna G, Campanini G, Rovida F et al. Changing circulation rate of human metapneumovirus strains and types among hospitalized pediatric patients during three consecutive winter-spring seasons. Arch Virol 2005;150.2365-75.

157. Ludewick Hp, Abed Y, van Niekirk N, Boivin G, Klugman KP, Madhi SA. Human metapneumovirus genetic variability, South Africa. Emerg Infect Dis 2005;11:1074-8.

158. Martinello RA, Chen MD, Weibel C, Kahn JS. Correlation between respiratory syncytial virus genotiype and severity of illness. J Infect Dis 2002;186:839-42.

10. ŽIVOTOPIS

Datum rođenja: 02. siječnja 1968

Mjesto rođenja: Zagreb, Republika Hrvatska

Mjesto stanovanja: R. Bićaniaća 30. 10000 Zagreb, Hrvatska

Bračno stanje: udata, dvoje djece

Telefon: 01 3834 197, 091 5361 018

E-mail: sljsternak@hzjz.hr

Školovanje:

Osnovno i srednješkolsko obrazovanje završila u Zagrebu. Na Medicinskom fakultetu u Zagrebu diplomirala 1993. god. s prosjekom ocjena 4,1. Specijalistički ispit iz medicinske mikrobiologije s parasitologijom položila 2002. god. Doktorski poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu u Zagrebu upisala 2003. god.

Zaposlenja i dužnosti:

Pripravnički staž obavila tijekom 1993./1995. god. za PB Jankomir. Stručni ispit položila 1996. god. Od 1996. zaposlena u Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo (Odjel za virologiju). Od 2004. god. voditelj Odsjeka za klamidije, a od 2005. god. i voditelj Odsjeka za enteralne i ostale viruse s Nacionalnim centrom za polio.

Nastavna i stručna djelatnost:

Od 2005. god. sudjeluje kao predavač, a 2008.god i kao jedan od voditelja na poslijediplomskim tečajevima I i II kategorije (Infekcije respiratornog i probavnog sustava) u organizaciji Medicinskog fakulteta u Zagrebu, HZJZ i HLZ-a. Od 2005.

god. godine sudjeluje kao nastavnik u dodiplomskom studiju na engleskom jeziku iz Medicinske mikrobiologije s parazitologijom na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Od 2007. god. sudjelovala kao nastavnik na stručnom poslijediplomskom studiju iz Medicinske mikrobiologije s parazitologijom te poslijediplomskom doktorskom studiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

Članstva:

Hrvatska liječnička komora, Hrvatski liječnički sindikat, Hrvatsko društvo za medicinsku mikrobiologiju s parasitologijom Hrvatskog liječničkog zbora.

Objavljeni radovi:

1. Marušić A, Kozarić-Kovačić D, Folnegović-Šmalc V, Ljubin T, Zrnčić A, **Ljubin S**. Use of two PTSD Scales in assesing posttraumatic stress disorder of refugees and displaced persons from Bosnia and Herzegovina and Croatia. Psyhologische Beitrage 1995;37:209-214.
2. Kozarić-Kovačić D, Ljubin T, Grubišić-Ilić M, **Ljubin Sternak S**. Učestalost PTSP-a u skupini prognanika i moguća povezanost sa zatočeništvom u logoru. Društvena istraživanja 1997;28-29: 327-341.
3. Borčić B, Kružić V, Kaić B, **Ljubin Sternak S**, Ljubičić M, Dobrovšak-Šourek V. Immunitiy of Croatian population to Poliomyelitis- A Serosurvey. Acta Med Croat. 1998;52:229-233.
4. Škerk V, Krhen I, Lisić M, Begovac J, Roglić S, Škerk V, **Ljubin Sternak S**, Banaszak A, Strugar-Šuica J, Vuković J. Comparative randomized pilot study of azithromycin and doxycycline efficacy in the treatment of prostate infection caused by *Chlamydia trachomatis.* Int J Antimicrob Agents 2004;24:188-191.
5. Skerk V, Krhen I, Lisic M, Begovac J, Cajic V, Zekan S, Skerk V, **Sternak SL**, Topic A, Schonwald S. Azithromycin: 4.5- or 6.0- gram dose in the treatment in patients with chronic prostatitis caused by Chlamydia trachoamtis-a randomized study. J Chemoter 2004;16(4): 408-410.
6. Škerk V, **Ljubin Sternak S**, Roglić S**,** Škerk V, Lisić M.Diagnosis and treatment of chronic prostatitis caused by Chlamydia trachomatis. J Chemoter 2005;17(5): 570-571.
7. **Sternak SL**, Kružić V, Vilibić Čavlek T, Škerk V. Chlamydia trachomatis infection in Croatian symptomatic and asymptomatic men. Journal of mens health & gender 2006;3(1):80-81.
8. Šantak M, Košutić-Gulija T, Tešović G, **Ljubin-Sternak S**, Gjenero-Margan I, Betica-Radić Lj, Forčić D. Mumps virus strains isolated in Croatia in 1998 and 2005: genotyping and putative antigenic relatedness to vaccine strains. J Med Virol 2006;78(5):638-643.
9. **Ljubin Sternak S**, Vilibić Čavlek T, Falsey AR, Walsh EE, Mlinarić Galinović G. Serosurvey of human metapneumovirus infection in Croatia. Croat Med J 2006;47:878-81.
10. Vilibić Čavlek T, **Ljubin Sternak S,** Žarković K, Marušić Della Marina B, Cvitanović Šojat Lj, Bašnec A, Kaić B, Turković B, Mlinarić Galinović G. Subacute sclerosing panencephalitis- the contining threat. Coll Antropol 2006; 30(4): 959-963.
11. Lepej SZ, Tešović G, **Sternak SL**, Jeren T. Naive and memory CD4+ T-cells in the cerebrospinal fluid of children with aseptic meningitis following measles-mumps-rubella vaccination and enteroviral meningitis. Immunol Invest 2007;36(3):321-35.

12. Tcheremenskaia O, Marucci G, De Petris S, Ruggeri FM, Dovecar D, **Sternak SL**, Matyasova I, Dhimolea MK, Mladenova Z, Fiore L. Molecular epidemiology of rotavirus in Central and South-Eastern Europe. J Clin Microbiol 2007;45(7):2197-204.
13. Vilibić Čavlek T, **Ljubin Sternak S**, Kaić B, Žarković K, Marušić Della Marina B, Cvitanović Šojat Lj, Bašnec A, Mlinarić-Galinović G. Subacute sclerosing panencephalitis in Croatia (1994-2004). Acta Microbiol et Immunol Hung. 2007;54(1):57-63.
14. **Ljubin-Sternak S**, Lukic-Grlic A, Fiore L, Di Bartolo I, Ruggeri MF, Bukovski-Simonoski S, Mlinaric-Galinovic G. Norovirus genotypes involved in the outbreaks of gastroenteritis in Croatia during the winter season 2004-2005. Acta Virol. 2007;51(3):189-94.
15. Skerk V, Krhen I, Cajic V, Markovinović L, Puntarić A, Roglić S, Zekan S, **Ljubin-Sternak S**, Zidovec Lepej S, Vince A. The Role of Chlamydia trachomatis in Prostatitis Syndrome - Our Experience in Diagnosis and Treatment. Acta Dermatovenerol Croat. 2007;15(3):135-140.
16. Tešović G, Poljak M, Lunar MM, Kocjan BJ, Seme K, Vukić BT, **Sternak SL**, Čajić V, Vince A. Horizontal transmission of the Leningrad-Zagreb mumps vaccine strain: A report of three cases.Vaccine. 2008; 26(16):1922-5.
17. Mlinarić-Galinović G, Welliver RC, Vilibić-Čavlek T, **Ljubin-Sternak S**, Draženović V, Galinović I, Tomić V. The biennial cycle of respiratory syncytial virus outbreaks in Croatia.Virol J. 2008;5(1):18
18. Vilibić-Čavlek T, **Ljubin-Sternak S,** Mlinarić-Galinović G. Value of IgG avidity in cytomegalovirus infection diagnosis in pregnant woman and newborn infants. Med Jad 2008,38:23-28.
19. **Ljubin Sternak S,** Santak M, Cepin-Bogovic J, Baće A, Vojnović G, Mlinarić-Galinović G, Forčić D, Draženović V, Falsey AR. Detection of genetic lineages of human metapneumovirus in Croatia during the winter season 2005/2006. J Med Virol. 2008;80(7):1282-1287.
20. Kaic B, Gjenero-Margan I, Aleraj B, **Ljubin-Sternak S**, Vilibic-Cavlek T, Kilvain S, Pivic I, Stojanovic D, Ilic A. Transmission of the L-Zagreb mumps vaccine virus, Croatia, 2005-2008. Euro Surveill 2008;13(16)