

# Epidemiološke i mikrobiološke karakteristike *Mycobacterium tuberculosis* u KBC-u Split u razdoblju 2015. - 2019.

---

**Kovačić, Katarina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:822596>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-05**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET  
I  
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**KATARINA KOVAČIĆ**

**EPIDEMIOLOŠKE I MIKROBIOLOŠKE KARAKTERISTIKE  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* U KBC SPLIT U  
RAZDOBLJU 2015.-2019.**

**DIPLOMSKI RAD**

**Akadska godina:**

**2021./2022.**

**Mentor:**

**Izv. prof.dr. sc. Ivana Goić Barišić**

**Split, prosinac 2021.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET  
I  
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**KATARINA KOVAČIĆ**

**EPIDEMIOLOŠKE I MIKROBIOLOŠKE KARAKTERISTIKE  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* U KBC SPLIT U  
RAZDOBLJU 2015.-2019.**

**DIPLOMSKI RAD**

**Akadska godina:**

**2021./2022.**

**Mentor:**

**Izv. prof.dr. sc. Ivana Goić Barišić**

**Split, prosinac 2021.**

Medicinski fakultet Split  
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA  
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

**Znanstveno područje:** Biomedicinske znanosti  
**Znanstveno polje:** Farmacija  
**Nastavni predmet:** Farmaceutska mikrobiologija  
**Tema rada:** prihvaćena na 70. sjednici Vijeća studija Farmacije, 8. sjednici Vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i 5. sjednici Fakultetskog Vijeća Medicinskog fakulteta  
**Mentor:** izv. prof. prim. dr. sc. Ivana Goić Barišić

**EPIDEMIOLOŠKE I MIKROBIOLOŠKE KARAKTERISTIKE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*  
U KBC SPLIT U RAZDOBLJU 2015.-2019.**

Katarina Kovačić, broj indeksa 198

**Sažetak:**

**Cilj istraživanja:** Prikaz podataka o broju pozitivnih i negativnih uzoraka prikupljenih u svrhu laboratorijske dijagnostike tuberkuloze u Kliničkom bolničkom centru Split u razdoblju od 01.01.2015. do 31.12.2019. godine.

**Materijali i metode:** U retrospektivnom istraživanju obuhvaćeni su podaci iz arhive Kliničkog zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju KBC-a Split i godišnjih publikacija Registra za tuberkulozu Službe za epidemiologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo koji analiziraju uzorke upućene na dijagnostiku *M. tuberculosis* u KBC Split. Obrađeni podaci odnose se na bronhoskopske uzorke, uzorke sputuma, pleuralnih punktata, likvora, urina, punktata limfnih čvorova, tkiva, briseva rana i punktata kosti. Podaci su obrađeni u programskom paketu Office 2016 (Microsoft, Redmond, WA).

**Rezultati:** Od ukupnog broja testiranih uzoraka, najviše je uzoraka testirano 2015. (N = 2608), a najmanje 2018. godine (N = 2104). Najveći je broj pozitivnih rezultata mikroskopije dobiven 2015. (N = 2114), a najmanji 2017. godine (N = 1771). U skladu s time, kultivacijskom je analizom najveći broj pozitivnih rezultata dobiven 2015. (N = 2608), a najmanji 2017. godine (N = 2104). S obzirom na vrstu uzoraka, najveći je broj testiranih bronhoskopskih uzoraka, zatim slijede uzorci sputuma, urina te pleuralnih punktata. Uzorci likvora, punktata limfnih čvorova, tkiva te briseva rana u značajno su manjem broju testirani u odnosu na ostale uzorke. Prosjek pozitivnih rezultata mikroskopske i kultivacijske analize uzoraka sputuma i bronhoskopskih uzoraka, kao i kultivacijske analize pleuralnih punktata, u promatranom razdoblju pokazuje blagi pad. Najveći broj izolata *M. tuberculosis* potvrđen je 2015. (N = 97), a najmanji 2017. godine (N = 45). Testom osjetljivosti na antituberkulotike utvrđena su 4 uzorka s monorezistencijom na izoniazid 2015. godine, dok ostalih godina nisu pronađeni rezistentni uzorci. Rezultati testiranja ukazuju na pad broja oboljelih od tuberkuloze u razdoblju istraživanja.

**Zaključak:** Rezultati istraživanja pokazuju kontinuirani pad u broju osoba zaraženih tuberkulozom u Splitsko-dalmatinskoj županiji tijekom istraživanih razdoblja, kao i u broju dijagnostičkih uzoraka analiziranih u KBC-u Split, što je u skladu s hipotezom istraživačkog rada, kao i s padom incidencije tuberkuloze u Republici Hrvatskoj i u svijetu u promatranom vremenskom razdoblju.

**Ključne riječi:** *M. tuberculosis*, incidencija, testiranje, KBC Split  
**Rad sadrži:** 42 stranice, 12 slika, 6 tablica, 41 literaturnu referencu  
**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva za obranu:**

1. prof. dr. sc. Marija Tonkić, dr. med., predsjednik povjerenstva
2. doc. dr. sc. Anita Novak, dr. med., član
3. izv. prof. dr. sc. Ivana Goić Barišić, dr. med., mentor

**Datum obrane:** 17. prosinac 2021.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u knjižnici Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

School of Medicine Split  
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy  
University of Split, Croatia

**Scientific area:** Biomedical sciences  
**Scientific field:** Pharmacy  
**Course title:** Pharmaceutical microbiology  
**Thesis subject:** was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 70 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 8 and by Faculty Council of School of Medicine, session no. 5.  
**Mentor:** Ivana Goić Barišić PhD, Associate professor

### EPIDEMIOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* IN THE UNIVERSITY HOSPITAL OF SPLIT IN THE PERIOD 2015-2019.

Katarina Kovačić, indeks number 198

#### Summary:

**Objective:** Review of the data on the number of positive and negative samples collected for the purpose of laboratory diagnosis of tuberculosis in the University Hospital of Split in the period from 01.01.2015. to 31.12.2019.

**Materials and methods:** The retrospective study processed the data from the archives of the Clinical Institute of Microbiology and Parasitology of the University Hospital of Split and annual publications of the Tuberculosis Registry of the Epidemiology Service of the Croatian Institute of Public Health describing samples collected and analyzed at the University Hospital of Split for diagnostic confirmation of *M. tuberculosis*. The processed data refers to bronchoscopic, sputum, pleural puncture, cerebrospinal fluid, urine, lymph node puncture, tissue, wound swab and bone puncture samples. The data was processed in the Office 2016 software package (Microsoft, Redmond, WA).

**Results:** From the total number of tested samples, the most samples were tested in 2015 (N = 2608), and the least in 2018 (N = 2104). The highest number of positive microscopy results was obtained in 2015 (N = 2114), and the lowest in 2017 (N = 1771). Accordingly, the highest number of positive cultivation results was obtained in 2015 (N = 2608) and the lowest in 2017 (N = 2104). Regarding the type of samples, the largest number of tested samples were bronchoscopic samples, followed by samples of sputum, urine and pleural punctures. Samples of cerebrospinal fluid, lymph node punctures, tissues and wound swabs were tested in significantly smaller numbers compared to the other samples. The average of positive results of microscopic and cultivation analysis of sputum samples and bronchoscopic samples, as well as cultivation analysis of pleural punctures, shows a slight decrease in the observed period. The highest number of *M. tuberculosis* isolates was confirmed in 2015 (N = 97), and the lowest in 2017 (N = 45). The antituberculosis susceptibility test identified 4 samples with isoniazid monoresistance in 2015, while no resistant samples were found in the other years. The test results indicate a decrease in the number of tuberculosis patients during the study period.

**Conclusion:** The results of the research show a continuous decrease in the number of persons infected with tuberculosis in Split-Dalmatia County during the research period, as well as in the number of diagnostic samples analyzed in KBC Split, which is in line with the research hypothesis in the observed time period.

**Keywords:** *M. tuberculosis*, incidence, testing, University Hospital of Split  
**Thesis contains:** 42 pages, 12 figures, 6 tables, 41 references  
**Original in:** Croatian

#### Defence committee:

1. Marija Tonkić PhD, Full Prof., chair person
2. Anita Novak PhD, A/Prof, member
3. Ivana Goić Barišić PhD, Prof., supervisor

**Defence date:** December 17th, 2021.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of School of Medicine, Šoltanska 2.**

## SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD .....   | 1  |
| 1.1. Opće karakteristike Mycobacterium tuberculosis .....     | 2  |
| 1.2. Patogeneza tuberkuloze .....                             | 5  |
| 1.3. Preživljavanje bakterije unutar stanica domaćina .....   | 6  |
| 1.4. Razvoj i težina bolesti .....                            | 7  |
| 1.5. Principi postavljanja dijagnoze.....                     | 8  |
| 1.5.1. Dijagnostika latentne tuberkuloze .....                | 8  |
| 1.5.2. Dijagnostika aktivne tuberkuloze .....                 | 8  |
| 1.6. Farmakoterapijski pristup liječenju tuberkuloze .....    | 9  |
| 1.7. Epidemiologija tuberkuloze .....                         | 10 |
| 1.7.1. Epidemiološki podaci o tuberkulozi u svijetu.....      | 10 |
| 1.7.2. Epidemiološki podaci o tuberkulozi u Hrvatskoj .....   | 10 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....                                     | 12 |
| 3. MATERIJALI I METODE .....                                  | 14 |
| 3.1. Ustroj istraživanja.....                                 | 15 |
| 3.2. Protokol istraživanja.....                               | 15 |
| 3.3. Obrada podataka.....                                     | 15 |
| 4. REZULTATI.....   | 16 |
| 4.1. Dijagnostika tuberkuloze u KBC-u Split.....              | 17 |
| 4.2. Dijagnostika tuberkuloze s obzirom na vrstu uzorka ..... | 20 |
| 5. RASPRAVA.....  | 26 |
| 6. ZAKLJUČAK .....  | 30 |
| 7. LITERATURA .....   | 32 |
| 8. SAŽETAK.....   | 37 |
| 9. SUMMARY .....  | 39 |
| 10. ŽIVOTOPIS .....   | 41 |

*Zahvaljujem se mentorici izv. prof. prim. dr. sc. Ivani Goić Barišić na svesrdnoj pomoći i vodstvu tijekom izrade diplomskog rada.*

*Zahvaljujem cijeloj svojoj obitelji, a posebno roditeljima i sestri, što me uvijek podupiru u ostvarenju mojih ciljeva, što vjeruju u mene, bodre me, osnažuju i usrećuju.*

*Mome stricu Ivici, koji mi je pokazao veliko razumijevanje i brigu u najtežim trenucima školovanja, hvala na svom uloženom trudu i pomoći.*

*Zahvaljujem se svojim kolegicama koje su mi pružile neizmjernu potporu i nadu tijekom čitavog perioda fakultetskog obrazovanja i učinile taj period moga života ispunjenijim i ljepšim.*

*Svim mojim prijateljima koji su neprestano bili uz mene, tješili me i podizali kada je to bilo potrebno, od srca zahvaljujem za sve.*

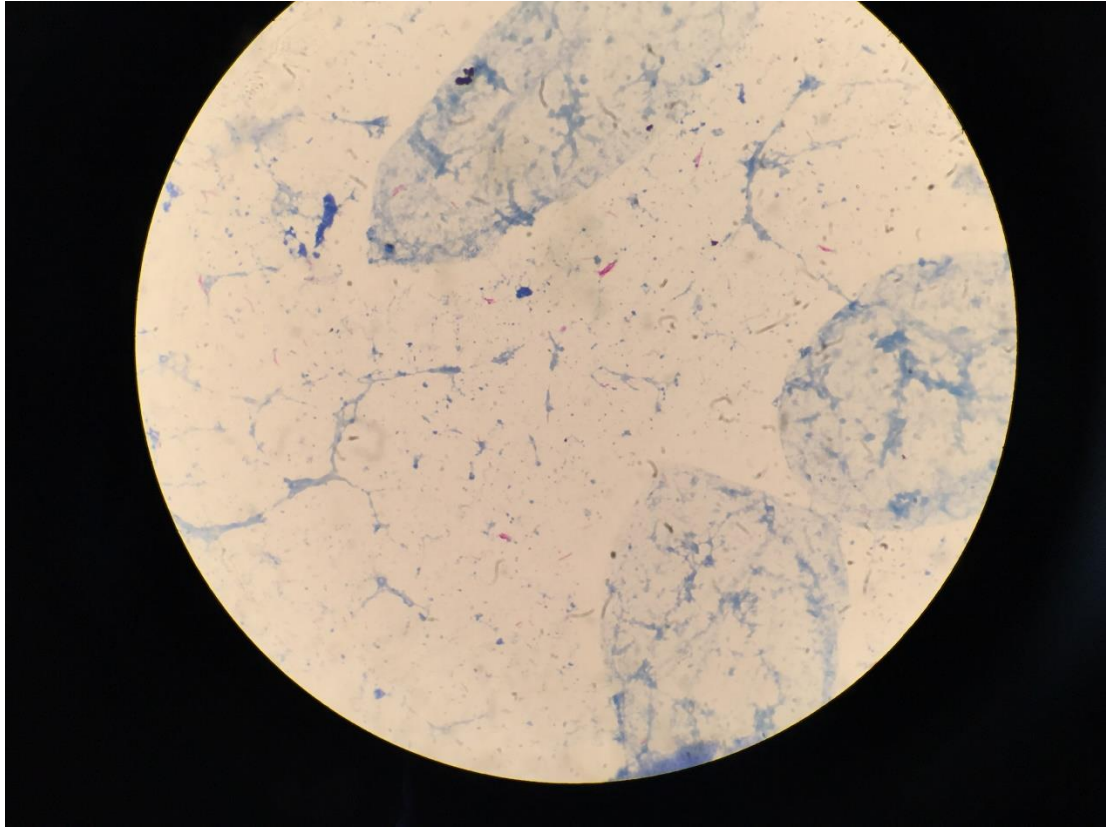
## **1. UVOD**



## 1.1. Opće karakteristike *Mycobacterium tuberculosis*

*Mycobacterium tuberculosis* je humani patogen uzročnik tuberkuloze, još uvijek najčešće zarazne bolesti sa smrtnim ishodom u svijetu (1). *M. tuberculosis* je aeroban, nepokretan, najčešće pravilan štapić dužine 1-10  $\mu\text{m}$  koji nema sposobnost stvaranja spora. Vrijeme replikacije (generacijsko vrijeme) je 14-22 sata, te se opisuje kao spororastuća bakterija. Prirodno je patogen samo za ljude i fakultativno unutarstanični (intracelularni) mikroorganizam. Zbog posebnosti u sastavu stanične stijenke nije ga moguće prikazati običnim tehnikama bojenja u mikrobiologiji (bojenje po metilenu ili Gramu), već za prikaz mikobakterija koristimo posebne složene metode poput Ziehl-Neelsen (Z-N) bojenja ili florokromnih boja (auramin) (2).

Stanična stijenka *M. tuberculosis* je građena od četiri sloja: prvi sloj je peptidoglikan (murein) koji je kovalentno vezan na polisaharid arabinogalaktan, koji predstavlja drugi sloj. Na njega se vežu mikolične kiseline koje u sastavu sadrže 60-90 C atoma, te predstavljaju treći sloj s izrazitim hidrofobnim osobinama. Mikolična kiselina se pirolizom razdvaja u metilne estere s 22-26 C atoma. Četvrti, površinski sloj, čine peptidoglikolipidi, sulfolipidi, cord-činitelj (trehaloza-6,6-dimikolat) i voskovi. Mikolična kiselina i lipidi staničnog zida uzrok su veće otpornosti prema nižim koncentracijama kiselina i lužina. Prilikom bojanja bazičnom bojom karbol-fuksinom, zbog visokog sadržaja lipida u sastavu staničnog zida mikroorganizam zadržava crvenu boju i nakon odbojavanja kiselim alkoholom, te mikobakterije zato opisujemo kao acidoalkoholno rezistentne. Karbol-fuksin se veže na mikoličnu kiselinu, a peptidoglikolipidi staničnog zida sprječavaju njihovo odbojavanje i primanje neke druge boje (metilensko plavilo). Tehnikom bojenja po Ziehl-Neelsenu mikobakterije zadržavaju prvu boju, karbol-fuksin, te ostaju obojene crveno, za razliku od drugih mikroorganizama u uzorku koji se odbojavaju kiselim alkoholom i poprimaju drugu boju (metilensko modrilo) (Slika 1). Prije početka bojanja potrebno je otopiti vosak koji se nalazi na površini mikroorganizma zagrijavanjem mikroskopskih preparata, te na taj način omogućiti vezivanje bazične boje za odgovarajući dio stanične stijenke (3, 4).



**Slika 1.** Bojanje uzorka sputuma po Ziehl-Neelsenu, izvor: zbirka mikroskopskih preparata Kliničkog zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju KBC-a Split

Za primarnu kultivaciju mikobakterija koristi se podloga koja sadrži neselektivni i selektivni medij. Selektivni medij sadrži antibiotike koji omogućuju sprječavanje kontaminacije podloge bakterijskom i gljivičnom florom. Uobičajene vrste medija uključuju krute jajčane podloge (npr. Löwenstein-Jensen) koje sadrže određene soli, glicerol i složene organske tvari (npr. svježa jaja ili žumanjke, krumpirovo brašno i druge sastojke u raznim kombinacijama) te malahitno zelenilo koje inhibira druge bakterije (Slika 2.), i tekuće podloge (npr. Middlebrook 7H9 i 7H12) koje podržavaju umnažanje mikobakterija prisutnih u malom broju (5).



**Slika 2.** Rast *M. tuberculosis* na Löwenstein-Jensen podlozi, izvor: zbirka Kliničkog zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju KBC-a Split

Osim što bakteriji daje mnoge važne karakteristike, poput relativne nepropusnosti za antibiotike, stanična stijenka sadrži velik broj imunomodulacijskih molekula uključujući lipoarabinomanan, sulfolipide i ftiocerol dimciocerozat. Cord-činitelj (trehaloza-6,6-dimikolat) neophodan je za virulenciju i odgovoran je za karakterističan rast *M. tuberculosis* u tekućoj podlozi kao dugačke, zmijolike vrpce (4) (Slika 3.).



**Slika 3.** Mikroskopski izgled bacila *M. tuberculosis* iz tekuće podloge,  
izvor: <https://emedicine.medscape.com/article/230802-overview#a5>

## 1.2. Patogeneza tuberkuloze

Premda nije obligatorni unutarstanični patogen, *M. tuberculosis* većinu svog infektivnog ciklusa provodi unutar fagocita domaćina. Nakon inhalacije, bakterija biva fagocitirana od strane alveolarnih makrofaga. Inficirane stanice dalje napadaju plućno tkivo te dolazi do jačanja proupalnog odgovora (1). Proupalni odgovor traje sve do razvoja stečenog imunološkog odgovora, koji kod zaraženih laboratorijskih životinja nastaje 3-4 tjedna nakon infekcije jer ovisi o dendritičkim stanicama koje nose antigen *M. tuberculosis* do drenažnih limfnih čvorova, gdje se dodatno razvija početni odgovor T-stanica na infekciju (6, 7). Nakon dolaska u regionalne limfne čvorove, bakterija cirkulira krvotokom, inficirajući dodatne stanice domaćina, te u konačnici zahvaća značajan dio plućnog tkiva. S početkom razvoja staničnog imuniteta, lokalni proupalni odgovori dovode do regrutiranja dodatnih monocita i limfocita, koji se pak okupljaju oko zaraženih makrofaga kako bi zadržali *M. tuberculosis* unutar organizirane stanične strukture, poznate kao granulom (8). Granulom predstavlja patološko obilježje tuberkuloze i mjesto na kojemu *M. tuberculosis* ostaje u produženom stanju usporene ili zaustavljene replikacije, koje može trajati duži vremenski period, često i desetljećima (9). Takva će formacija biti odsutna ili slabo formirana u ljudi s oslabljenim imunološkim odgovorom, osobito onima zaraženim HIV-om (10). Slabljenje integriteta

granuloma rezultira staničnom nekrozom koja bakteriju izlaže hipoksičnom izvanstaničnom okruženju bogatom lipidima (9). Daljnji gubitak integriteta, djelomično posredovan povećanom regulacijom metaloproteinaza ekstracelularnog matriksa pluća, omogućuje pristup bakterija vaskularnim hranjivim tvarima i kisiku, nakon čega slijedi oslobađanje sadržaja granuloma u dišne puteve, pri čemu dolazi i do oslobađanja samih bakterija (11). Životni ciklus bakterije završava stvaranjem zaraznog aerosola koji joj omogućava prijenos na novog domaćina (8).

### 1.3. Preživljavanje bakterije unutar stanica domaćina

*M. tuberculosis* ulazi u stanicu klasičnom fagocitozom. Nakon fagocitoze od strane makrofaga i/ili dendritičke stanice domaćina, *M. tuberculosis* preživljava u fagosomskom odjeljku koji zadržava mnoge karakteristike ranog endosoma. Smatra se da je na taj način bakteriji omogućen pristup hranjivim tvarima potrebnim za njeno preživljavanje i rast. Inertne čestice fagocitirane od strane makrofaga u uobičajenim se okolnostima isporučuju u kiselo, hidrolitičko okruženje fagolizosoma, dok je *M. tuberculosis* razvila načine sprječavanja sazrijevanja fagosoma u fagolizosom (12-14). Unutarstanični patogeni poput *M. tuberculosis* izbjegavaju fuziju lizosoma kroz utjecaj na signalne puteve prijenosa domaćina, što im omogućuje sintezu proteina s efektorskom funkcijom koji modificiraju (uglavnom inhibiraju, ali ponekad i aktiviraju) puteve stanice domaćina te osim na sazrijevanje fagosoma, imaju utjecaj i na staničnu smrt, citokinski odgovor, ksenofagiju, i prezentaciju antigena putem MHC klase I i klase II molekula (15, 16). Odjeljak stanice u kojem boravi *M. tuberculosis* blago je zakiseljen (pH 6,4), te ostaje u interakciji s endosomalnom mrežom stanice i pokazuje ograničeno nakupljanje lizosomalnih hidrolaza (1). Nakon imunološke aktivacije s IFN $\gamma$  fagosom sazrijeva i stapa se s lizosomima. Time se *M. tuberculosis* izlaže protonima vakuolarne ATPaze, reaktivnim dušikovim međuproduktima (RNI) inducibilne sintaze dušikovog oksida (iNOS) i reaktivnim kisikovim međuproduktima (ROI) NADPH oksidaze 2 (NOX2) (13).

Uništavanje *M. tuberculosis* aktiviranim makrofazima ovisi o više čimbenika, najznačajnije, proizvodnji dušikovog oksida (NO), niskom pH lizosoma i isporuci antimikrobnih peptida u procesu autofagije (17). Tipični dvokomponentni regulatorni sustavi (engl. *two-component regulatory systems*, TCS), koji se sastoje od regulatora odgovora i histidin kinaze, imaju središnju ulogu u preživljavanju bakterija u navedenim stresnim uvjetima, regulirajući njihov rast, diferencijaciju, virulenciju, otpornost i patogenost (18).

Također, kao dodatni mehanizmi obrane, detoksifikaciju stanice bakterije i njenu obranu od oksidativnog stresa omogućuju enzimi kao što su katalaza-peroksidaza i superoksid dismutaza te mikotiol (MSH) svojim antioksidativnim djelovanjem (13).

#### **1.4. Razvoj i težina bolesti**

Uspjeh infekcije i razvoj plućnog oblika tuberkuloze (pluća su glavna meta bakterije) ovise o četiri uzastopna koraka: fagocitoza bacila, njihovo unutarstanično umnožavanje, ograničena latentna faza infekcije i na kraju aktivna infekcija pluća. Ovi koraci mogu napredovati prema različitim kliničkim scenarijima: spontanom izlječenju, akutnoj bolesti, latentnoj infekciji i ponovnoj aktivaciji ili ponovnoj infekciji (19). Paradoksalno, imunološki odgovor na infekciju ima visoku zaštitu (90%) protiv aktivne tuberkuloze, ali se u osnovi temelji na proliferaciji Th1 limfocita te stoga ne može spriječiti ponovnu infekciju. Ozbiljna imunosupresija može objasniti samo 10% slučajeva aktivne tuberkuloze, dok se ostatak može pripisati komorbiditetima, proinflamatornom okruženju i nepoznatom genetskom sklonošću (20). Latentna tuberkuloza definirana je isključivo dokazima imunološke senzibilizacije proteinima mikobakterija u odsutnosti kliničkih znakova i simptoma aktivne bolesti, dok aktivnu tuberkulozu karakteriziraju različite patološke manifestacije u rasponu od granuloma preko kazeoznih hipoksičnih lezija koje sadrže promjenjiv broj bakterija, do šupljina ispunjenih tekućinom s velikim brojem replicirajućih organizama (9).

Aktivna se tuberkuloza razvija unutar dvije godine od infekcije ili recidiva. Ponovna je infekcija moguća jer je za neophodan stanično posredovan imunološki odgovor potreban lokalni upalni odgovor u svrhu lociranja lezija, što dokazuje prisutnost lezija u različitim progresijskim fazama unutar istog domaćina (21). U oko 90% zaraženih infekcija uzročnikom je asimptomatska, latentna tuberkulozna infekcija s 5% šanse napretka latentne infekcije do klinički manifestne aktivne tuberkulozne bolesti tijekom prve godine i dodatnih 5% kroz ostatak života. Kod osoba zaraženih HIV-om, rizik od razvoja aktivne tuberkuloze povećava se na gotovo 10% godišnje (22). Iako se mikobakterije krvlju šire po cijelom tijelu tijekom početne infekcije, primarna ekstrapulmonalna bolest je rijetka, osim kod imunokompromitiranih domaćina. Dojenčad, starije osobe ili na drugi način imunosuprimirani domaćini ne mogu kontrolirati rast mikobakterija zbog čega se kod njih često razvija diseminirana (primarna milijarna) tuberkuloza. Pacijenti koji postanu imunokompromitirani mjesecima ili godinama nakon primarne infekcije također mogu razviti kasnu, generaliziranu bolest (2).

## 1.5. Osnove postavljanja dijagnoze

Iako tuberkuloza pretežno pogađa pluća, također može uzrokovati bolest bilo kojeg drugog organa te mora biti uključena u diferencijalnu dijagnozu velikog broja kliničkih prezentacija bolesti. Simptomi i znakovi bolesti uključuju one povezane sa specifičnim mjestom bolesti, kao i nespecifičnim simptomima poput vrućice, gubitka težine, i noćnog znojenja (10).

### 1.5.1. Dijagnostika latentne tuberkuloze

Osobe s latentnom tuberkuloznom infekcijom imaju nisku razinu bakterija *M. tuberculosis* u organizmu zbog čega se dijagnoza latentne tuberkulozne infekcije oslanja na ispitivanje individualnog imunološkog odgovora na antigen *M. tuberculosis* (23).

Neizravni postupci, poput testova oslobađanja interferona-gama (engl. *interferon-gamma release assays, IGRA*), suvremeni su standard za dijagnosticiranje latentne tuberkulozne infekcije u odraslih. Ovi testovi otkrivaju lučenje IFN- $\gamma$  od strane T-limfocita, stimuliranih relativno specifičnim tuberkuloznim antigenima koji nisu prisutni u BCG cjepivu ni kod većine netuberkuloznih mikobakterija. U pravilu, prethodno cijepljenje BCG-om ne dovodi do lažno pozitivnih rezultata testa. *IGRA* se uglavnom koristi za testiranje osoba koje su bile u kontaktu s primarnim bolesnikom koji ima zaraznu plućnu tuberkulozu (24).

Druga metoda detekcije latentne tuberkuloze, tuberkulinski kožni test (pročišćeni proteinski derivat, PPD) temelji se na reakciji preosjetljivosti odgođenog tipa koja se javlja kada su zaraženi *M. tuberculosis* izloženi određenim antigenskim komponentama. Obje metode imaju nisku osjetljivost, osobito u osoba s teškom imunodeficijencijom te nisu prikladne za dijagnosticiranje klinički izražene tuberkuloze jer ne omogućuju razlikovanje latentne tuberkuloze od aktivne bolesti (23).

### 1.5.2. Dijagnostika aktivne tuberkuloze

Glavne metode za postavljanje dijagnoze tuberkuloze su izravna mikroskopska detekcija patogena te bakterijska kultura i testovi amplifikacije nukleinske kiseline (postupci temeljeni na lančanoj reakciji polimeraze; PCR testovi). Sve navedene metode svrstane su u skupinu direktne dijagnostike bakterijskog uzročnika, u ovom slučaju *M. tuberculosis*. Mikroskopija uzoraka sputuma, aspirata bronha ili bronhoalveolarnog lavata je ekonomična,

brza i predstavlja marker zaraznosti pacijenta. Međutim, njezina je osjetljivost vrlo promjenjiva (20% do 80%) i razlikuje se među laboratorijima te zahtjeva iskusnog mikroskopičara (25). Specifičnost mikroskopije također je ograničena, jer ne može razlikovati *M. tuberculosis* od netuberkuloznih mikobakterija. Metode temeljene na amplifikaciji nukleinske kiseline odlikuju se brzinom, dobrom osjetljivošću i vrlo visokom specifičnošću. Ipak, kultivacija uzročnika na krutim i preko tekuće podloge ostaje zlatni standard u dijagnostici tuberkuloze i važna je za ispitivanje osjetljivosti i rezistencije uzročnika (26).

### **1.6. Farmakoterapijski pristup liječenju tuberkuloze**

Standardno liječenje pacijenata s plućnom tuberkulozom osjetljivom na lijekove traje najmanje 6 mjeseci. Svjetska zdravstvena organizacija preporučuje liječenje početnom dvomjesečnom intenzivnom fazom koja uključuje svakodnevnu primjenu četverostruke terapije izoniazidom, rifampicinom, pirazinamidom i etambutolom, nakon čega slijedi dvojna terapija izoniazidom (INH) i rifampicinom (RMP) za posljednja 4 mjeseca (27). Ekstrapulmonalni i diseminirani oblici tuberkuloze ponekad zahtijevaju produženo liječenje: tuberkuloza limfnih čvorova 6 mjeseci; zglobna ili koštana tuberkuloza 9 mjeseci; tuberkuloza središnjeg živčanog sustava 12 mjeseci. Kod diseminirane tuberkuloze trajanje liječenja nužno je individualno prilagoditi ovisno o tijeku bolesti (25). U bolesnika s monorezistencijom na izoniazid ili rifampicin, koriste se rezervni antituberkulotici te fluorokinoloni (moksifloksacin, levofloksacin). Trajanje liječenja je produženo na ukupno 6 do 9 mjeseci (INH rezistencija) ili 18 do 20 mjeseci (rezistencija na RMP), ovisno o individualnom slučaju (28).

Za liječenje latentne tuberkuloze, u svrhu prevencije progresije bolesti u aktivni oblik, koriste se terapijske smjernice na bazi rifampicina, uključujući 3 mjeseca izoniazida jednom tjedno uz rifampicin ili 4 mjeseca svakodnevne primjene rifampicina i 3 mjeseca svakodnevne primjene izoniazida uz rifampicin (29).

Trenutne strategije cijepljenja BCG-om (*Bacillus Calmette-Guérin*), kao jedinim licenciranim cjepivom protiv tuberkuloze, prije izlaganja zarazi, za cilj imaju smanjenje početnog opterećenja prilikom zaraze i sprječavanje reaktivacije latentne infekcije. Primjena cjepiva nakon izlaganja također je potrebna jer cilja bakterije u stanju mirovanja te sprječava njihovu reaktivaciju (10).



## **1.7. Epidemiologija tuberkuloze**

Intenzitet lokalnog širenja tuberkuloze ovisi o prevalenciji i zaraznosti pojedinaca sa zaraznim oblicima tuberkuloze, broju i osjetljivosti pojedinaca s kojima zarazni pojedinci mogu doći u kontakt, učestalosti i blizini interakcija između zaraznih i osjetljivih pojedinaca, kao i biološkim značajkama samog uzročnika koje utječu na prijenos zaraze. Svaki se od ovih čimbenika može razlikovati u svojoj osnovi. Primjerice, na prevalenciju i zaraznost pojedinaca mogu utjecati čimbenici na individualnoj razini (npr. koinfekcija HIV-om) ili zajednički čimbenici na razini zajednice (npr. dostupnost dijagnoze i kvaliteta skrbi) (30).

### **1.7.1. Epidemiološki podaci o tuberkulozi u svijetu**

Svake godine približno 10 milijuna ljudi oboli od tuberkuloze. Unatoč tome što je bolest moguće spriječiti i izliječiti, 1,5 milijuna ljudi godišnje umre od tuberkuloze, što ju čini vodećim svjetskim infektivnim uzrokom smrti. Vodeći je uzrok smrti ljudi s HIV-om, a velikim dijelom doprinosi i antimikrobnoj rezistenciji. Većina zaraženih živi u zemljama s niskim i srednjim prihodima, ali je tuberkuloza prisutna u cijelom svijetu. Otprilike polovica svih oboljelih od tuberkuloze može se naći u 8 zemalja: Bangladešu, Kini, Indiji, Indoneziji, Nigeriji, Pakistanu, Filipinima i Južnoj Africi. Procjenjuje se da je približno jedna četvrtina svjetske populacije zaražena tuberkuloznom bakterijom (31). Stopa tuberkuloze varira ovisno o dobi. U Africi prvenstveno pogađa adolescente i mlade odrasle osobe. Međutim, u zemljama u kojima je stopa incidencije dramatično pala (poput SAD-a), tuberkuloza je uglavnom bolest starijih osoba i imunokompromitiranih (32).

### **1.7.2. Epidemiološki podaci o tuberkulozi u Hrvatskoj**

Od prvog izdanja „Naputka za suzbijanje i sprečavanje tuberkuloze“ izdanog od strane Ministarstva zdravlja Republike Hrvatske 1998. pa do službenih podataka o broju oboljelih od tuberkuloze u Hrvatskoj u 2017. godini incidencija te bolesti znatno je pala, od 44/100 000 stanovnika do 9,2/100 000 stanovnika. U 2017. godini registrirano je 377 novooboljelih od tuberkuloze i prvi je put incidencija te bolesti pala na manje od 10/100 000 stanovnika (33). Općenito se u Hrvatskoj posljednjih nekoliko desetljeća bilježi pad incidencije tuberkuloze. Broj novooboljelih u 2018. godini bio je 372 te se prema stopi incidencije Hrvatska nalazi u europskom prosjeku (9,1/100 000 za 2018. godinu). Postoje velike razlike u incidenciji među županijama (od 2,5 u Dubrovačko-neretvanskoj županiji do 18,3 na 100 000 u

Brodsko-posavskoj županiji). Broj bolesnika s rezistentnom tuberkulozom u Hrvatskoj je nizak. U 2018. 12 pacijenata je imalo infekciju uzrokovanu rezistentnim sojem. Sredinom 2019. zabilježen je i prvi slučaj XDR tuberkuloze (tuberkuloza izvanredno otporna na lijekove) u Hrvatskoj (34).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj istraživanja je prikazati podatke o ukupnom broju testiranih uzoraka, prikupljenih u svrhu laboratorijske dijagnostike tuberkuloze u KBC-u Split u razdoblju 2015.-2019. godine. Broj pozitivnih uzoraka dodatno je analiziran s obzirom na vrstu uzorka i mikroskopski nalaz acidorezistentnih bacila. Također je istražena osjetljivost *M. tuberculosis* na antituberkulotike.

Hipoteza diplomskog rada je da broj zaraženih (prevalencija) tuberkuloze u KBC Split tijekom razdoblja 2015.-2019. godine opada, odnosno da dolazi do smanjenja udjela pozitivnih uzoraka testiranih na *M. tuberculosis* u navedenom vremenskom razdoblju.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. Ustroj istraživanja**

Rad se zasniva na retrospektivnom istraživanju. Korišteni su podaci prikupljeni iz arhive Kliničkog zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju KBC-a Split i godišnjih publikacija Registra za tuberkulozu Službe za epidemiologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, koji se odnose na uzorke prikupljene u razdoblju od 01.01.2015. do 31.12.2019. godine u Kliničkom bolničkom centru Split u cilju dijagnostičke potvrde zaraze ispitanika bakterijom *M. tuberculosis*.

### **3.2. Protokol istraživanja**

Prikupljeni podaci međusobno su uspoređeni po godinama s obzirom na vrstu analiziranih uzoraka, a uključuju uzorke sputuma, bronhoskopske uzorke, uzorke pleuralnih punktata, uzorke likvora, uzorke urina, uzorke punktata limfnih čvorova, uzorke tkiva, uzorke briseva rana te uzorke punktata kosti. Podaci su uneseni u tablice, i to ukupan broj testiranih pojedinačnih vrsta uzoraka, broj pozitivnih i negativnih testova dobivenih metodom mikroskopije, broj pozitivnih i negativnih testova dobivenih metodom kultivacije te udio pozitivnih testova u ukupnom boju testiranih uzoraka za svaku navedenu metodu testiranja prikazan u obliku postotka. Rezultati istraživanja prikazani su u obliku tablica i grafikona te je napravljena njihova statistička analiza i obrazloženo tumačenje rezultata.

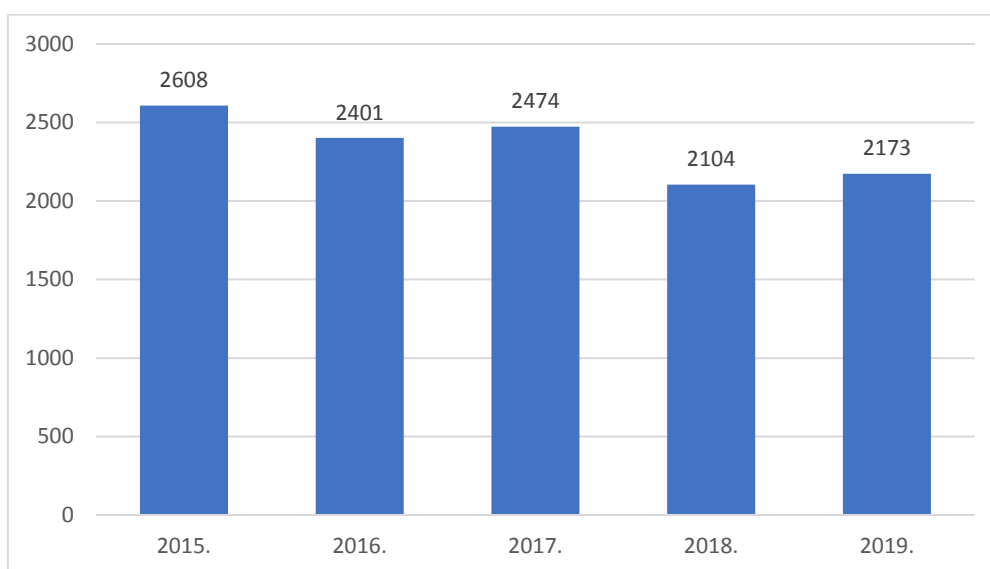
### **3.3. Obrada podataka**

Prikupljeni podaci obrađeni su u programskom paketu Office 2016 (Microsoft, Redmond, WA), dok su za obradu tekstualnih i brojčanih podataka te za izradu tablica i slika korišteni programi Microsoft Word i Microsoft Excel.

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Dijagnostika tuberkuloze u KBC-u Split

U razdoblju od 01.01.2015. do 31.12.2019. godine u Kliničkom bolničkom centru Split ukupno je prikupljeno 11758 uzoraka koji su mikrobiološki ispitani na prisutnost bakterije *M. tuberculosis* s ciljem potvrde tuberkulozne bolesti. Na Slici 4. moguće je uočiti blagi pad broja prikupljenih uzoraka tijekom istraživanog razdoblja. Najveći broj uzoraka testiran je 2015. godine (N = 2608), a najmanji 2018. godine (N = 2104).



**Slika 4.** Ukupan broj uzoraka prikupljenih za dijagnostiku tuberkuloze u KBC-u Split po godinama

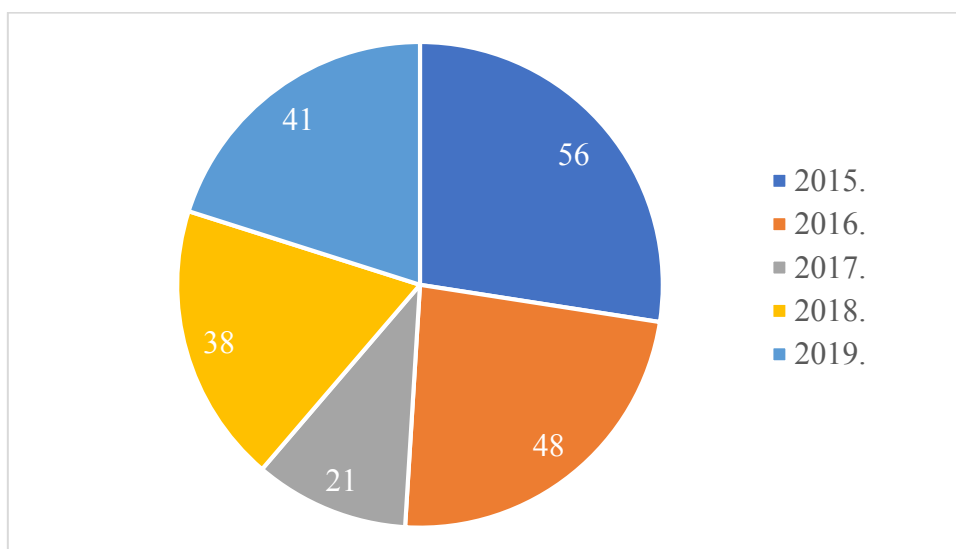
U Tablici 1. prikazani su rezultati mikroskopske pretrage uglavnom respiratornih uzoraka po godinama i broj pozitivnih nalaza. Najveći broj uzoraka mikroskopski je pregledan 2015. godine (N = 2114), dok je najmanje uzoraka mikroskopski analizirano 2018. godine (N = 1771).

**Tablica 1.** Mikroskopski pozitivni rezultati uzoraka u KBC-u Split po godinama (Ziehl-Neelsen bojanje)

| Godina | Ukupno uzoraka | Pozitivni | %   |
|--------|----------------|-----------|-----|
| 2015.  | 2114           | <b>56</b> | 2,6 |
| 2016.  | 2069           | <b>48</b> | 2,3 |
| 2017.  | 2021           | <b>21</b> | 1,0 |
| 2018.  | 1771           | <b>38</b> | 2,1 |
| 2019.  | 1852           | <b>41</b> | 2,2 |



Kao što je prikazano na Slici 5., među uzorcima testiranim metodom mikroskopije najveći je broj pozitivnih rezultata analize dobiven 2015. godine, kada je pronađeno 56 (2,6 %) izolata *M. tuberculosis*. Stopa pozitivnih rezultata približno je jednaka tijekom svih godina, osim 2017. godine kada je broj uzoraka koji su pokazali mikroskopski pozitivan rezultat značajno manji u odnosu na ostale godine uključene u istraživanje, a iznosi 21 (1,0 %).



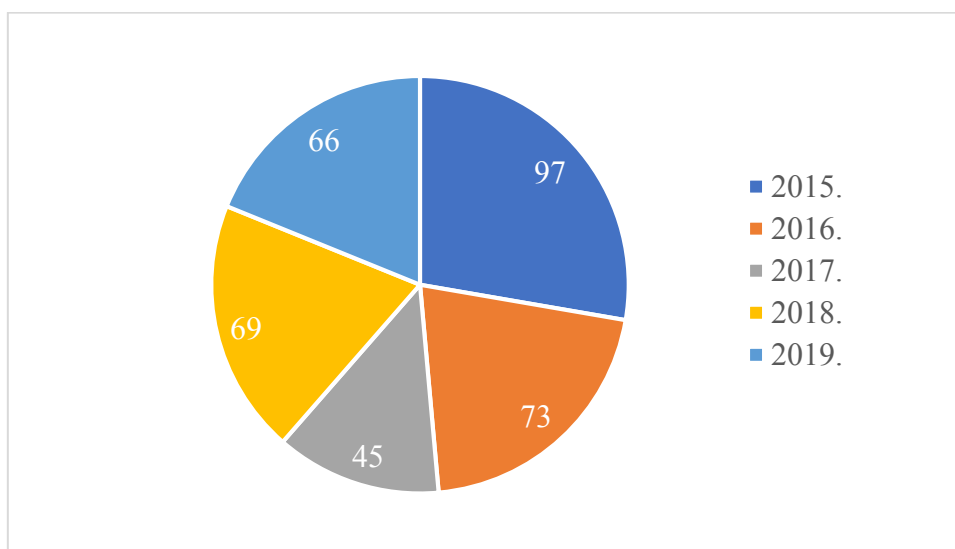
**Slika 5.** Broj mikroskopski pozitivnih uzoraka upućenih na dijagnostiku tuberkuloze u KBC-u Split po godinama

Prema mikrobiološkim protokolima gotovo svi uzorci idu na kultivaciju (izuzetak je mikroskopija uzorka sa četkice), te je ukupan broj analiziranih uzoraka metodom kultivacije izjednačen je s brojem uzoraka pristiglih u mikrobiološki laboratorij po godinama. Rezultati porasta *M. tuberculosis* u kulturi prikazani su u Tablici 2.

**Tablica 2.** Rezultati kultivacije (porast u kulturi) *M. tuberculosis* u KBC-u Split po godinama

| Godina | Ukupno uzoraka | Pozitivni | %   |
|--------|----------------|-----------|-----|
| 2015.  | 2608           | <b>97</b> | 3,7 |
| 2016.  | 2401           | <b>73</b> | 3,0 |
| 2017.  | 2474           | <b>45</b> | 1,8 |
| 2018.  | 2104           | <b>69</b> | 3,3 |
| 2019.  | 2173           | <b>66</b> | 3,0 |

Slika 6. grafički prikazuje broj pozitivnih rezultata testa kultivacije. Najveći je broj pozitivnih rezultata dobiven 2015. godine, 97 izolata *M. tuberculosis* (3,7 %), 2018. godine taj broj iznosi 69 (3,3 %), dok je 2016. i 2019. godine dobiven jednak udio pozitivnih rezultata kultivacijske analize uzoraka (3,0 %), s malom razlikom u broju izolata. 2017. godine broj i udio pozitivnih rezultata kultivacije iznosi 45 izolata *M. tuberculosis* (1,8 %), što značajno odstupa od ostalih godina.



**Slika 6.** Broj pozitivnih uzoraka kultivacije u KBC-u Split po godinama.

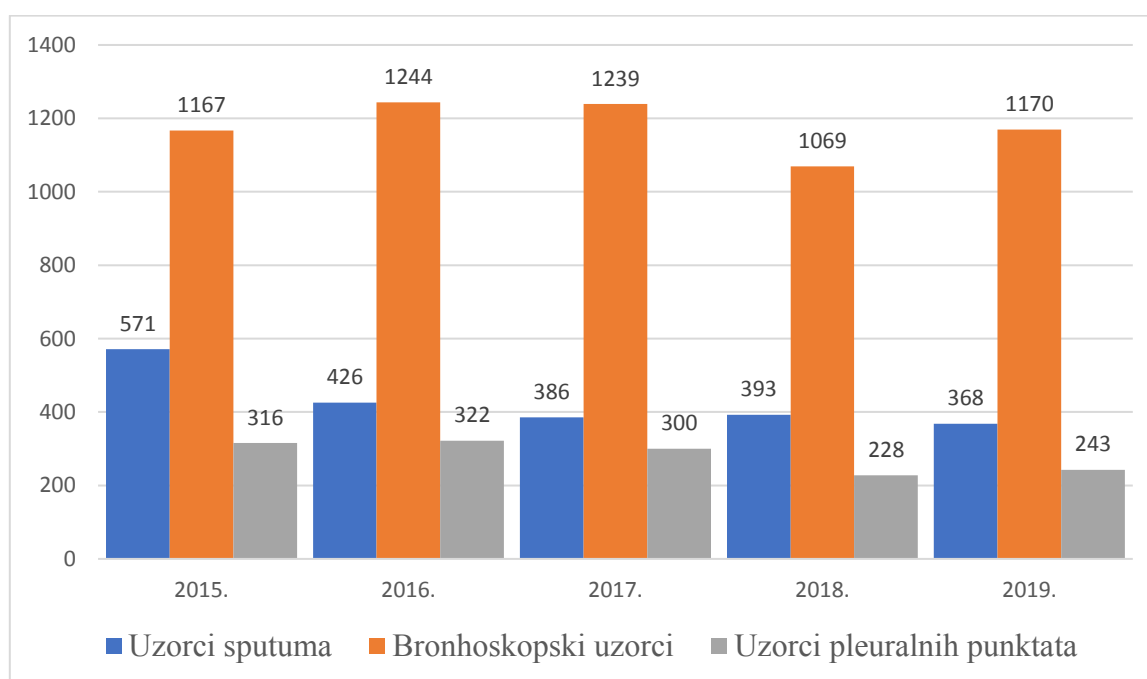
Testiranje osjetljivosti na antituberkulotike napravljeno je za sve izolate *M. tuberculosis* porasle preko krute ili tekuće podloge. Testiranje osjetljivosti napravljeno je metodom proporcije po Canettiju. Testiranje osjetljivosti otkrilo je 4 izolata koja su imala monorezistenciju na izoniazid. Svi su rezistentni sojevi *M. tuberculosis* otkriveni 2015. godine. Najveći je broj uzoraka testiran 2016. godine (N = 73), a najmanji 2017. godine (N = 45) (Tablica 3).

**Tablica 3.** Rezultati testa rezistencije u KBC-u Split po godinama

| Godina | Ukupno uzoraka | Rezistentni | %   |
|--------|----------------|-------------|-----|
| 2015.  | 72             | 4           | 5,6 |
| 2016.  | 73             | 0           | 0,0 |
| 2017.  | 45             | 0           | 0,0 |
| 2018.  | 69             | 0           | 0,0 |
| 2019.  | 66             | 0           | 0,0 |

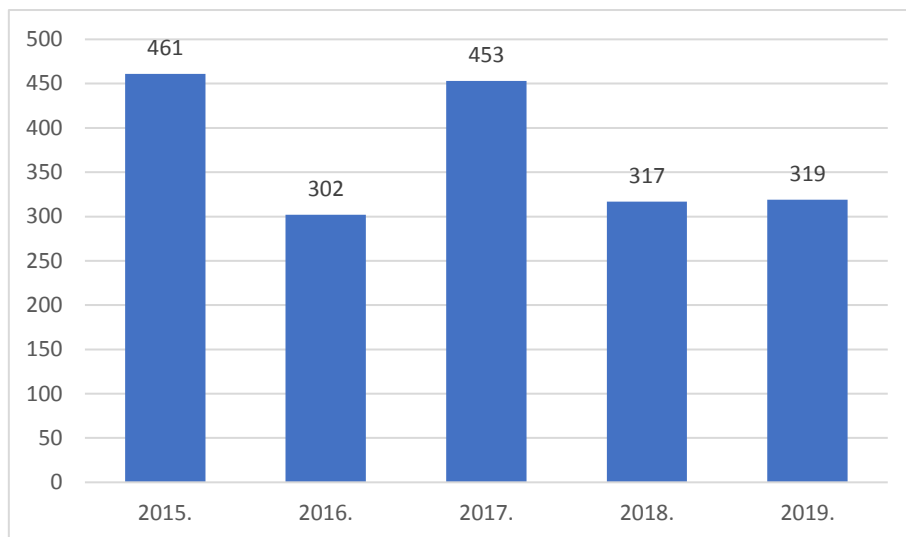
## 4.2. Dijagnostika tuberkuloze s obzirom na vrstu uzorka

Među respiratornim uzorcima, najveći je broj bronhoskopskih uzoraka. 2016. godine testirano je najviše bronhoskopskih uzoraka (N = 1244), dok je najmanji broj testiran 2018. godine (N = 1069). U usporedbi s njima, uzorci sputuma i pleuralnih punktata testirani su u znatno manjem broju. 2015. godine testiran je 571 uzorak sputuma, što je najveći broj uzoraka sputuma testiranih u jednoj godini. Najmanji je broj uzoraka sputuma testiran 2019. godine (N = 368). Najviše uzoraka pleuralnih punktata testirano je 2016. godine (N = 322), a najmanje 2018. godine (N = 228) (Slika 7).



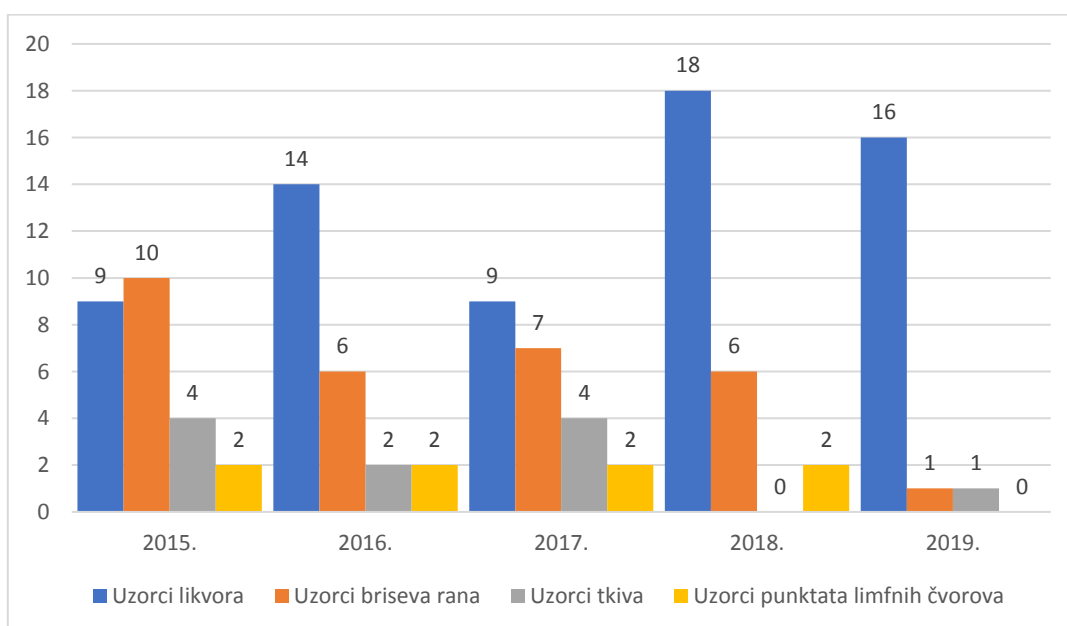
**Slika 7.** Broj uzoraka iz respiratornog sustava testiranih na *M. tuberculosis* u KBC-u Split po godinama

Najviše uzoraka urina testirano je 2015. (N = 461) i 2017. godine (N = 453). Ostalih je godina uključenih u istraživanje broj ispitivanih uzoraka urina približno izjednačen, a najmanji je broj testiran 2016. godine (N = 302) (Slika 8).



**Slika 8.** Uzorci urina testirani na *M. tuberculosis* u KBC-u Split po godinama

Uzorci likvora, punktata limfnih čvorova, tkiva te briseva rana u značajno su manjem broju testirani u odnosu na ostale uzorke koji su dio ovog rada. 2018. godine testirano je najviše uzoraka likvora (N = 18), a značajno manje uzoraka (N = 9) testirano 2015. i 2017. godine. Najveći je broj uzoraka briseva rana testiran 2015. godine (N = 10), a najmanji 2019. godine (N = 1). Jednak broj uzoraka tkiva testiran je 2015. i 2017. godine (N = 4), a 2018. godine nije testiran ni jedan uzorak tkiva. U razdoblju 2015.-2018. godine testirana su 2 uzorka punktata limfnih čvorova godišnje, dok 2019. godine ni jedan uzorak te vrste nije upućen na dijagnostiku *M. tuberculosis* (Slika 9).



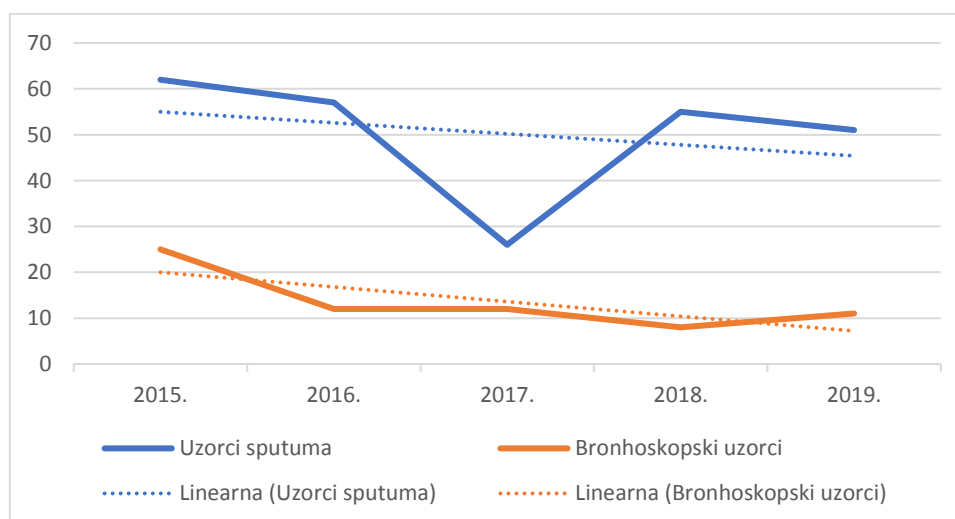
**Slika 9.** Ostali uzorci testirani na *M. tuberculosis* u KBC-u Split po godinama

U Tablici 4 prikazan je odnos mikroskopski pozitivnih respiratornih uzoraka u odnosu na ukupan broj uzoraka. Najveći udio mikroskopski pozitivnih uzoraka *M. tuberculosis* bio je u 2019. godini (10,9 %). 2017. godine mikroskopski je potvrđen manji udio pozitivnih rezultata analize uzoraka sputuma (3,9 %). Bronhoskopski uzorci pokazali su iznimno mali udio pozitivnih rezultata mikroskopske analize, s najvećim udjelom 2015. godine (0,9 %), a najmanjim 2019. godine (0,1 %).

**Tablica 4.** Rezultati mikroskopske analize sputuma i bronhoskopskih uzoraka za *M. tuberculosis* po godinama

| Godina | Uzorci sputuma |      |      |     | Bronhoskopski uzorci |      |     |      |
|--------|----------------|------|------|-----|----------------------|------|-----|------|
|        | Ukupno         | TBC+ | %    | neg | Ukupno               | TBC+ | %   | neg  |
| 2015.  | 571            | 43   | 7,5  | 526 | 1167                 | 10   | 0,9 | 1156 |
| 2016.  | 426            | 40   | 9,4  | 386 | 1244                 | 7    | 0,6 | 1237 |
| 2017.  | 386            | 15   | 3,9  | 370 | 1239                 | 5    | 0,4 | 1234 |
| 2018.  | 393            | 35   | 8,9  | 354 | 1069                 | 3    | 0,3 | 1066 |
| 2019.  | 368            | 40   | 10,9 | 327 | 1170                 | 1    | 0,1 | 1168 |

Prosjek pozitivnih rezultata mikroskopske analize uzoraka sputuma u promatranom razdoblju pokazuje blagi pad, što je slučaj i kod bronhoskopskih uzoraka (Slika 10.).



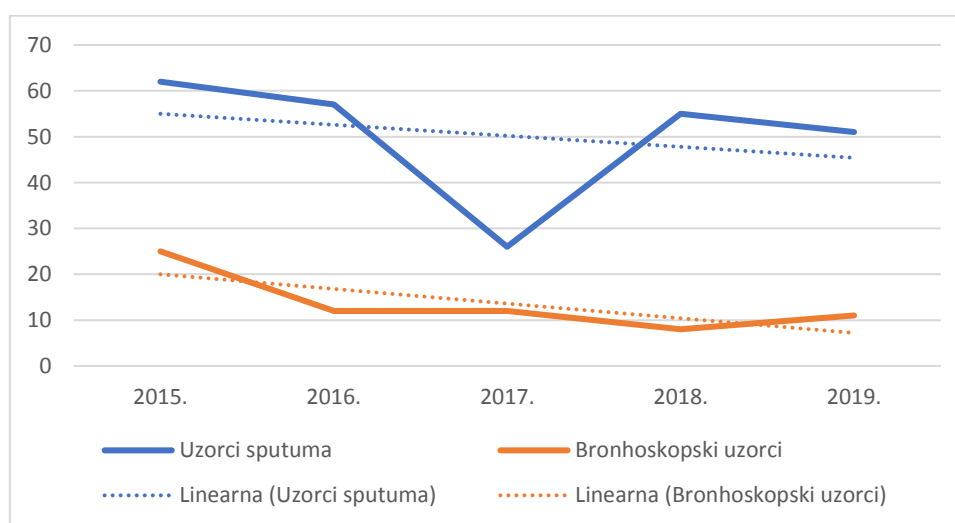
**Slika 10.** Linijski prikaz broja pozitivnih rezultata analize uzoraka sputuma i bronhoskopskih uzoraka ispitivanih metodom direktne mikroskopije u KBC-u Split

Među uzorcima sputuma najviši je udio pozitivnih rezultata analize kultivacijom dobiven 2018. (14,0 %) i 2019. godine (13,9 %), dok je 2017. godine taj udio zamjetno manji i iznosi 6,7 %. 2015. godine potvrđen je najveći udio pozitivnih rezultata kultivacije bronhoskopskih uzoraka (2,1 %), a 2018. godine navedeni udio iznosi 0,7 %, što je najmanji postotak pozitivnih rezultata u promatranom razdoblju (Tablica 5.).

**Tablica 5.** Rezultati analize porasta u kulturi *M tuberculosis* iz sputuma i bronhoskopskih uzoraka

| Godina | Uzorci sputuma |      |      |     | Bronhoskopski uzorci |      |     |      |
|--------|----------------|------|------|-----|----------------------|------|-----|------|
|        | Ukupno         | TBC+ | %    | neg | Ukupno               | TBC+ | %   | neg  |
| 2015.  | 571            | 62   | 10,9 | 507 | 1167                 | 25   | 2,1 | 1140 |
| 2016.  | 426            | 57   | 13,4 | 357 | 1244                 | 12   | 1,0 | 1232 |
| 2017.  | 386            | 26   | 6,7  | 352 | 1239                 | 12   | 1,0 | 1226 |
| 2018.  | 393            | 55   | 14,0 | 332 | 1069                 | 8    | 0,7 | 1061 |
| 2019.  | 368            | 51   | 13,9 | 307 | 1170                 | 11   | 0,9 | 1156 |

Na Slici 11. vidljivo je da, slično kao i kod mikroskopske analize uzoraka, prosjek broja pozitivnih uzoraka sputuma testiranih metodom kultivacije pada tijekom godina, a isto se može primijetiti i kod bronhoskopskih uzoraka.



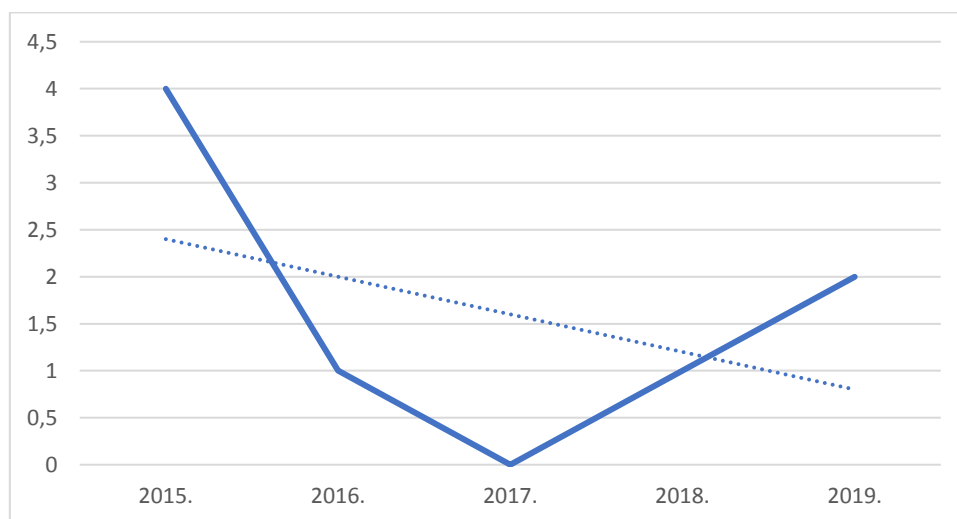
**Slika 11.** Linijski prikaz broja pozitivnih rezultata kultivacije uzoraka sputuma i bronhoskopskih uzoraka u KBC-u Split od 2015. do 2019. godine.

Mikroskopskim ispitivanjem uzoraka pleuralnih punktata nije pronađen niti jedan uzorak direktno pozitivan na *M. tuberculosis*. Metodom kultivacije najveći udio pozitivnih uzoraka potvrđen je 2015. godine (1,3 %), dok 2017. godine nije bio ni jedan uzorak pozitivan u kulturi na *M. tuberculosis* (Tablica 6.).

**Tablica 6.** Rezultati analize porasta u kulturi *M. tuberculosis* iz pleuralnih punktata

| Godina | Uzorci pleuralnih punktata |      |     |     |
|--------|----------------------------|------|-----|-----|
|        | Ukupno                     | TBC+ | %   | neg |
| 2015.  | 316                        | 4    | 1,3 | 312 |
| 2016.  | 322                        | 1    | 0,3 | 321 |
| 2017.  | 300                        | 0    | 0,0 | 300 |
| 2018.  | 228                        | 1    | 0,4 | 227 |
| 2019.  | 243                        | 2    | 0,8 | 241 |

Padajuća crta trenda (crta prosjeka), napravljena na temelju broja pozitivnih rezultata analize, pokazuje da prosjek broja pleuralnih punktata koji su pokazali pozitivan rezultat uporabom kultivacijske metode analize s godinama ima silazni tijek (Slika 12.).



**Slika 12.** Linijski prikaz broja pozitivnih rezultata analize uzoraka pleuralnih punktata uzoraka ispitivanih metodom kultivacije u KBC-u Split

Analizom ostalih uzoraka nisu utvrđeni uzorci pozitivni na *M. tuberculosis*. Jedini izuzetak čini kultivacijska analiza punktata limfnih čvorova, kojom je 2018. godine utvrđen jedan slučaj pozitivnog rezultata nalaza.



## **5. RASPRAVA**

Tuberkuloza je i dalje česta infekcija i važan uzrok pobola i smrtnosti u europskim zemljama. Premda u većini zemalja u padu, godišnje su stope smanjivanja i dalje premale da bi se ta bolest u europskim zemljama niske incidencije eliminirala do 2050. godine (35).

Primarne mjere suzbijanja i sprječavanja tuberkuloze u Hrvatskoj podrazumijevaju rano otkrivanje i liječenje oboljelih od tuberkuloze, zatim prijavu i nadzor u sklopu sustava pojačanog nadzora svih oboljelih, uključujući praćenje ishoda njihova liječenja, prevenciju pobola provođenjem zdravstvenog nadzora nad kontaktima oboljelih s povećanim rizikom od obolijevanja i njihovim preventivnim liječenjem, provedbu cijepljenja protiv tuberkuloze, evaluaciju provedenih mjera i nadzor nad njihovim provođenjem (33).

U Kliničkom zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju KBC Split kao osnova za dijagnostičku potvrdu i liječenje tuberkuloze korištene su mikroskopska metoda analize uzoraka te kultivacija i testiranje osjetljivosti. U petogodišnjem razdoblju od 01.01.2015. do 31.12.2019. godine potvrđen je pad broja testiranih uzoraka, kao i smanjenje broja pozitivnih rezultata mikroskopske pretrage i kultivacije uzoraka.

Tuberkuloza postoji tisućljećima i ostala je veliki globalni zdravstveni problem. Svake godine narušava zdravlje milijuna ljudi, a u razdoblju 2015.-2019. godine ostala je jedan od 10 najvećih uzroka smrti u cijelom svijetu. Nalazi se iznad HIV/AIDS-a kao jedan od vodećih uzroka smrti od zarazne bolesti, unatoč činjenici da uz pravovremenu dijagnozu i ispravan tretman većina ljudi koji razviju tuberkulozu može biti izliječena. Procjenjuje se da je u 2015. u svijetu bilo 10,4 milijuna novih (incidentnih) slučajeva tuberkuloze, od čega 5,9 milijuna (56%) među muškarcima, 3,5 milijuna (34 %) među ženama i 1,0 milijuna (10 %) među djecom. Ljudi zaraženi HIV-om činili su 1,2 milijuna (11 %) svih novih slučajeva tuberkuloze. Procjenjuje se da je 2015. bilo oko 480 000 novih slučajeva multirezistentne tuberkuloze i dodatnih 100 000 ljudi s tuberkulozom rezistentnom na rifampicin (36).

U KBC-u Split u promatranom razdoblju otkriven je mali broj uzoraka koji su sadržavali monorezistentni soj *M. tuberculosis*, s rezistencijom na antituberkulotik izoniazid, i to jedino u 2015. godini.

Unatoč napretku u dijagnostici, znatan udio slučajeva tuberkuloze prijavljenih SZO-u još uvijek je klinički dijagnosticiran, ali ne i bakteriološki potvrđen. U 2016., na primjer, samo 57% slučajeva plućne tuberkuloze prijavljenih SZO-u bakteriološki su potvrđeni. Bez liječenja, stopa smrtnosti od tuberkuloze je visoka. Istraživanja povijesti tuberkulozne bolesti u odsutnosti liječenja antituberkuloznim lijekovima (provedena prije nego što su

farmakoterapijski tretmani postali dostupni) utvrdila su da je oko 70% osoba s plućnom tuberkulozom i mikroskopski direktno pozitivnim nalazom sputuma preminulo u roku od 10 godina od postavljanja dijagnoze, kao i oko 20% ljudi oboljelih od plućne tuberkuloze s pozitivnom kulturom (ali negativnim direktnim mikroskopskim nalazom) (37).

S obzirom na količinu i vrstu analiziranih uzoraka, u KBC-u Split puno je veći broj testiranih invazivnih respiratornih uzoraka, koji uključuju bronhoalveolarni ispirak (BAL), aspirat bronha i pleuralni punkt, u odnosu na uzorke sputuma. Razmazi sputuma izravno pozitivni pod mikroskopom služe kao indikator zaraznosti pacijenata s mikrobiološki dokazanom plućnom ili laringealnom tuberkulozom, a broj potvrđenih pozitivnih rezultata prikupljenih u KBC-u Split tijekom istraživanog perioda pokazuje blagi pad.

Kako bi se stope tuberkuloze dodatno smanjile, velik broj slučajeva latentne tuberkulozne infekcije iz kojih će nastati novi slučajevi aktivne tuberkuloze mora se prioritetno rješavati. Pokazalo se da identificiranje najrizičnijih skupina ljudi i pružanje učinkovitog liječenja dovodi do smanjenja broja slučajeva aktivne tuberkuloze. Daljnja istraživanja u svrhu poboljšanja prediktora reaktivacije i efektivna liječenja kraćeg perioda prijeko su potrebna. Provođenje pojačanog pronalaženja, testiranja i liječenja latentne tuberkulozne infekcije zahtijevat će kontinuirano ulaganje u kapacitete zdravstvene skrbi na više razina (38).

Tuberkuloza otporna na lijekove i dalje predstavlja javnozdravstvenu krizu. Najbolja je procjena da je u svijetu 2017. godine 558 000 ljudi (raspon, 483 000–639 000) razvilo tuberkulozu koja je bila otporna na rifampicin, najučinkovitiji lijek prve linije, a od njih je 82% imalo multirezistentnu tuberkulozu. Procjenjuje se da oko 1,7 milijardi ljudi, što čini 23% svjetske populacije, ima latentnu tuberkuloznu infekciju te su stoga u opasnosti od razvoja aktivne tuberkulozne bolesti tijekom svoga života. Stopa incidencije tuberkuloze u svijetu pada otprilike 2% godišnje. Najbrži regionalni pad od 2013. do 2017. postignut je u Europskoj (5% godišnje) i Afričkoj (4% godišnje) regiji Svjetske zdravstvene organizacije (39).

Globalno gledano, prosječna stopa pada stope incidencije tuberkuloze bila je 1,6% godišnje u razdoblju 2000–2018. i 2,0% između 2017. i 2018. Kumulativno smanjenje između 2015. i 2018. godine iznosilo je samo 6,3%. Globalno smanjenje u broju umrlih od tuberkuloze između 2015. i 2018. godine iznosilo je 11%. Brže smanjenje incidencije tuberkuloze i smrtnosti uzrokovane tuberkulozom zahtijevaju poboljšanja u pristupu dijagnozi

i skrbi unutar konteksta napretka prema univerzalnom zdravstvenom osiguranju, djelovanje na šire determinante incidencije tuberkuloze (npr. pothranjenost, siromaštvo, pušenje i dijabetes) i novi tretman ili cjepivo kako bi se znatno smanjio rizik razvoja tuberkuloze kod ljudi koji boluju od latentne tuberkulozne infekcije (40).

U svijetu je prijavljeno i zabilježeno 7,1 milijun ljudi s novodijagnosticiranom tuberkulozom 2019. godine, u odnosu na 7,0 milijuna u 2018. i veliki porast sa 6,4 milijuna u 2017. godini i 5,7–5,8 milijuna godišnje u razdoblju 2009–2012. Unatoč povećanju broja zabilježenih slučajeva tuberkuloze, i dalje je postojala velika razlika (2,9 milijuna) između broja novodijagnosticiranih i prijavljenih slučajeva i 10 milijuna ljudi za koje se procjenjuje da su razvili tuberkulozu u 2019. godini. Ta je razlika posljedica kombinacije nedovoljnog prijavljivanja osoba s dijagnozom tuberkuloze i nedovoljnih potvrda dijagnoza te bolesti (ako ljudi s bolešću ne mogu pristupiti zdravstvenoj zaštiti ili im bolest nije dijagnosticirana kada jesu). Kumulativno smanjenje incidencije tuberkuloze od 2015. do 2019. iznosilo je 9% (sa 142 na 130 novih slučajeva na 100 000 stanovnika), uključujući smanjenje od 2,3% između 2018. i 2019. godine (41).

## **6. ZAKLJUČAK**

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na kontinuirani pad u broju osoba zaraženih tuberkulozom u Splitsko-dalmatinskoj županiji, kao i u broju dijagnostičkih uzoraka koji su upućeni u Klinički zavod za mikrobiologiju i parazitologiju KBC-a Split. Navedeno saznanje podudara se s hipotezom istraživačkog rada, kao i s padom incidencije tuberkuloze u Republici Hrvatskoj i u svijetu u promatranom vremenskom razdoblju. S obzirom na to da tuberkuloza najčešće zahvaća pluća, opravdana je činjenica da je najveći broj analiziranih uzoraka iz respiratornog sustava. Kod sumnje na plućnu tuberkulozu, najčešće se analizira sputum ispitanika, kao neinvazivni uzorak koji ima i najmanju osjetljivost. U KBC-u Split puno je veći broj testiranih invazivnih respiratornih uzoraka (bronhoalveolarni ispirak (BAL), aspirat bronha i pleuralni punktati) u odnosu na uzorke sputuma. Izravno pozitivni nalazi mikroskopske analize sputuma temelj su za procjenu širenja tuberkuloze u populaciji, a broj takvih nalaza potvrđenih u KBC-u Split tijekom istraživnog perioda pokazuje blagi pad. Standardna mikrobiološka obrada uzoraka za tuberkulozu uključuje i test osjetljivosti na antituberkulotike, kojim je 2015. godine potvrđena monorezistencija na izoniazid u 4 testiranih uzoraka, dok ostalih godina nije potvrđen ni jedan rezistentan soj *M. tuberculosis* u KBC-u Split, što je u skladu sa stanjem u Republici Hrvatskoj u kojoj je u promatranom razdoblju primijećen trend malog broja bolesnika s rezistentnom tuberkulozom.

## **7. LITERATURA**

1. Huang L, Nazarova EV, Russell DG. Mycobacterium tuberculosis: Bacterial fitness within the host macrophage. *Microbiol Spectr*. 2019. doi: 10.1128/microbiolspec.BAI-0001-2019.
2. Jurčev Savičević A, Miše K i sur. Tuberkuloza - stara dama u novom ruhu. Medicinska naklada, Zagreb 2021.
3. Medscape [Internet]. Dayton: Medscape; 2020. Tuberculosis (TB) Etiology [citirano 11. studenog 2021]. Dostupno na: <https://emedicine.medscape.com/article/230802-overview#a5>
4. Gordon SV, Parish T. Microbe Profile: Mycobacterium tuberculosis: Humanity's deadly microbial foe. *Microbiol Spectr*. 2018;164:437–9.
5. Brooks G, Carroll, K, Butel J, Morse S, Mietzner T. Jawetz, Melnick, Adelberg. Medicinska mikrobiologija. Dvadeset šesto američko izdanje, Prvo hrvatsko izdanje. Split: Placebo d.o.o.; 2015.
6. Wolf AJ, Desvignes L, Linas B, Banaiee N, Tamura T, Takatsu K i sur. Initiation of the adaptive immune response to Mycobacterium tuberculosis depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J Exp Med*. 2008;205(1):105–15.
7. Wolf AJ, Linas B, Trevejo-Nuñez GJ, Kincaid E, Tamura T, Takatsu K i sur. Mycobacterium tuberculosis Infects Dendritic Cells with High Frequency and Impairs Their Function In Vivo. *J Immunol*. 2007;179(4):2509-19.
8. Ehrt S, Schnappinger D, Rhee KY. Metabolic principles of persistence and pathogenicity in Mycobacterium tuberculosis. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(8):496–507.
9. Barry CE, Boshoff H, Dartois V, Dick T, Ehrt S, Flynn J i sur. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the goals of prophylaxis. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(12):845–855.
10. Lawn, SD, Zumla A. Tuberculosis. *Lancet*. 2011;378:57–72.
11. Elkington PT, D'Armiento JM, Friedland JS. Tuberculosis Immunopathology: The Neglected Role of Extracellular Matrix Destruction. *Sci Transl Med*. 2011;3(71):71-76.
12. VanderVen BC, Huang L, Rohde KH, Russell DG. The minimal unit of infection: M. tuberculosis in the macrophage. *Microbiol Spectr*. 2016. doi: 10.1128/microbiolspec.TBTB2-0025-2016
13. Ehrt S, Schnappinger D. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: Defense against host stresses. *Cell Microbiol*. 2009;11(8):1170–8.



14. Van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, Van Zon M, Pierson J i sur. M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*. 2007;129(7):1287-98.
15. Simeone R, Bobard A, Lippmann J, Bitter W, Majlessi L, Brosch R i sur. Phagosomal Rupture by Mycobacterium tuberculosis Results in Toxicity and Host Cell Death. *PLoS Pathog*. 2012;8(2):e1002507.
16. Augenstreich J, Briken V. Host Cell Targets of Released Lipid and Secreted Protein Effectors of Mycobacterium tuberculosis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:595029.
17. Alonso S, Pethe K, Russell DG, Purdy GE. Lysosomal killing of Mycobacterium mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(14):6031–6.
18. Li X, Lv X, Lin Y, Zhen J, Ruan C, Duan W i sur. Role of two-component regulatory systems in intracellular survival of Mycobacterium tuberculosis. *J Cell Biochem*. 2019;120(8):12197-207.
19. Ban~uls A, Sanou A, Van Anh NT, Godreuil S. Mycobacterium tuberculosis: ecology and evolution of a human bacterium. *J Med Microbiol*. 2015;64:1261–9.
20. Cardona P. Pathogenesis of tuberculosis and other mycobacteriosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2018;36(1):38-46.
21. Cardona P. Reactivation or reinfection in adult tuberculosis: Is that the question? *Int J Mycobacteriol*. 2016;5(4):400-7.
22. Mainous III AG, Pomeroy C. Management of antimicrobials in infectious diseases: impact of antibiotic resistance. *Drugo izdanje*. Totowa, NJ: Humana Press. 2009. 74. str
23. Reviono R, Saptawati L, Redhono D, Suryawati B. Good Agreement between an Interferon Gamma Release Assay and Tuberculin Skin Tests in Testing for Latent Tuberculosis Infection among HIV-Infected Patients in Indonesia. *J Korean Med Sci*. 2019;34(40):e259.
24. Suárez I, Fünßer SM, Kröger S, Rademacher J, Fätkenheuer G, Rybniker J. The Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. *Dtsch Arztebl Int*. 2019;116(43):729-35.

25. Pfyffer GE. Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. Jedanaesto izdanje. Washington DC: American Society for Microbiology Press. 2007. 543. str.
26. World Health Organization. Treatment of tuberculosis Guidelines. Četvrto izdanje. Geneva: World Health Organization. 2010. 137. str.
27. Tiberi S, Du Plessis N, Walzl G, Vjecha MJ, Rao M, Ntoumi F. Tuberculosis: progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(7):e183-e198.
28. Schaberg T, Bauer T, Brinkmann F, Diel R, Feiterna-Sperling C, Haas W. Tuberculosis Guideline for Adults - Guideline for Diagnosis and Treatment of Tuberculosis including LTBI Testing and Treatment of the German Central Committee (DZK) and the German Respiratory Society (DGP). *Pneumologie.* 2017;71(6):325-97.
29. Sterling TR, Njie G, Zenner D, Cohn DL, Reves R, Ahmed A i sur. Guidelines for the Treatment of Latent Tuberculosis Infection: Recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC, 2020. *MMWR Recomm Rep.* 2020;69(1):1-11.
30. Mathema B, Andrews JR, Cohen T, Borgdorff MW, Behr M, Glynn JR i sur. Drivers of Tuberculosis Transmission. *J Infect Dis.* 2017. doi: 10.1093/infdis/jix354.
31. World Health Organization [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2021. Tuberculosis [citirano 15. studenog 2021]. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
32. World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2006. Prvo izdanje. Geneva: World Health Organization. 2006. 3. str.
33. e-Građani [Internet]. Zagreb: Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske; 2020. Programske smjernice za suzbijanje i sprječavanje tuberkuloze [citirano 15. studenog 2021]. Dostupno na: <https://zdravlje.gov.hr/pristup-informacijama/savjetovanje-s-javnoscju/okoncana-savjetovanja/savjetovanje-u-2020-godini/programske-smjernice-za-suzbijanje-i-sprjecavanje-tuberkuloze-5083/5083>

34. Zavod za javno zdravstvo Međimurske županije [Internet]. Čakovec: Zavod za javno zdravstvo Međimurske županije; 2020. Svjetski dan tuberkuloze [citirano 15. studenog 2021]. Dostupno na: <https://www.zzjz-ck.hr/?task=group&gid=2&aid=972>
35. Hrvatski zavod za javno zdravstvo [Internet]. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2017. Podaci o tuberkulozi u Europi i Hrvatskoj [citirano 26. studenog 2021].
36. World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. Prvo izdanje. Geneva: World Health Organization. 2016. 5. str.
37. World Health Organization. Global tuberculosis report 2017. Prvo izdanje. Geneva: World Health Organization. 2017. 4. str.
38. DiNardo AR, Guy E. Reactivation tuberculosis: role of surveillance. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2016;14(5):501-9.
39. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. Prvo izdanje. Geneva: World Health Organization. 2018. 27. str.
40. World Health Organization. Global tuberculosis report 2019. Prvo izdanje. Geneva: World Health Organization. 2019. 7. str.
41. World Health Organization. Global tuberculosis report 2020. Prvo izdanje. Geneva: World Health Organization. 2020. 14. str.

## **8. SAŽETAK**

**Cilj istraživanja:** Prikaz podataka o broju pozitivnih i negativnih uzoraka prikupljenih u svrhu laboratorijske dijagnostike tuberkuloze u Kliničkom bolničkom centru Split u razdoblju od 01.01.2015. do 31.12.2019. godine.

**Materijali i metode:** U retrospektivnom istraživanju obrađeni su podaci iz arhive Kliničkog zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju KBC-a Split i godišnjih publikacija Registra za tuberkulozu Službe za epidemiologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo koji opisuju uzorke prikupljene i analizirane u KBC-u Split u svrhu dijagnostičke potvrde zaraze *M. tuberculosis*. Obrađeni podaci odnose se na bronhoskopske uzorke, uzorke sputuma, pleuralnih punktata, likvora, urina, punktata limfnih čvorova, tkiva, briseva rana i punktata kosti. Podaci su obrađeni u programskom paketu Office 2016 (Microsoft, Redmond, WA).

**Rezultati:** Od ukupnog broja testiranih uzoraka, najviše je uzoraka testirano 2015. (N = 2608), a najmanje 2018. godine (N = 2104). Najveći je broj pozitivnih rezultata mikroskopije dobiven 2015. (N = 2114), a najmanji 2017. godine (N = 1771). U skladu s time, kultivacijskom je analizom najveći broj pozitivnih rezultata dobiven 2015. (N = 2608), a najmanji 2017. godine (N = 2104). S obzirom na vrstu uzoraka, najveći je broj testiranih bronhoskopskih uzoraka, zatim slijede uzorci sputuma, urina te pleuralnih punktata. Uzorci likvora, punktata limfnih čvorova, tkiva te briseva rana u značajno su manjem broju testirani u odnosu na ostale uzorke. Prosjek pozitivnih rezultata mikroskopske i kultivacijske analize uzoraka sputuma i bronhoskopskih uzoraka, kao i kultivacijske analize pleuralnih punktata, u promatranom razdoblju pokazuje blagi pad. Najveći broj izolata *M. tuberculosis* potvrđen je 2015. (N = 97), a najmanji 2017. godine (N = 45). Testom osjetljivosti na antituberkulotike utvrđena su 4 uzorka s monorezistencijom na izoniazid 2015. godine, dok ostalih godina nisu pronađeni rezistentni uzorci. Rezultati testiranja ukazuju na pad broja oboljelih od tuberkuloze u razdoblju istraživanja.

**Zaključak:** Rezultati istraživanja pokazuju kontinuirani pad u broju osoba zaraženih tuberkulozom u Splitsko-dalmatinskoj županiji tijekom istraživanog razdoblja, kao i u broju dijagnostičkih uzoraka analiziranih u KBC-u Split, što je u skladu s hipotezom istraživačkog rada, kao i s padom incidencije tuberkuloze u Republici Hrvatskoj i u svijetu u promatranom vremenskom razdoblju.

## **9. SUMMARY**

**Diploma thesis title:** Epidemiological and microbiological characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* in the University Hospital of Split in the period 2015-2019.

**Objective:** Review of the data on the number of positive and negative samples collected for the purpose of laboratory diagnosis of tuberculosis in the University Hospital of Split in the period from 01.01.2015. to 31.12.2019.

**Materials and methods:** The retrospective study processed the data from the archives of the Clinical Institute of Microbiology and Parasitology of the University Hospital of Split and annual publications of the Tuberculosis Registry of the Epidemiology Service of the Croatian Institute of Public Health describing samples collected and analyzed at the University Hospital of Split for diagnostic confirmation of *M. tuberculosis*. The processed data refers to bronchoscopic, sputum, pleural puncture, cerebrospinal fluid, urine, lymph node puncture, tissue, wound swab and bone puncture samples. The data was processed in the Office 2016 software package (Microsoft, Redmond, WA).

**Results:** From the total number of tested samples, the most samples were tested in 2015 (N = 2608), and the least in 2018 (N = 2104). The highest number of positive microscopy results was obtained in 2015 (N = 2114), and the lowest in 2017 (N = 1771). Accordingly, the highest number of positive cultivation results was obtained in 2015 (N = 2608) and the lowest in 2017 (N = 2104). Regarding the type of samples, the largest number of tested samples were bronchoscopic samples, followed by samples of sputum, urine and pleural punctures. Samples of cerebrospinal fluid, lymph node punctures, tissues and wound swabs were tested in significantly smaller numbers compared to the other samples. The average of positive results of microscopic and cultivation analysis of sputum samples and bronchoscopic samples, as well as cultivation analysis of pleural punctures, shows a slight decrease in the observed period. The highest number of *M. tuberculosis* isolates was confirmed in 2015 (N = 97), and the lowest in 2017 (N = 45). The antituberculosis susceptibility test identified 4 samples with isoniazid monoresistance in 2015, while no resistant samples were found in the other years. The test results indicate a decrease in the number of tuberculosis patients during the study period.

**Conclusion:** The results of the research show a continuous decrease in the number of persons infected with tuberculosis in Split-Dalmatia County during the research period, as well as in the number of diagnostic samples analyzed in KBC Split, which is in line with the research hypothesis in the observed time period.

## **10. ŽIVOTOPIS**



## **Osobni podaci**

Ime i prezime: Katarina Kovačić

Datum i mjesto rođenja: 11.11.1997., Sisak

Državljanstvo: hrvatsko

E-adresa: katarina.kovacic33@gmail.com

## **Obrazovanje**

2004.-2012. Osnovna škola Galdovo, Sisak

2012.-2016. Opća gimnazija Sisak

2016.-2021. Medicinski i Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacije

## **Ostalo**

2018.-2021. volontiranje u udruzi Mentor, Split

Strani jezici: engleski jezik - aktivno; njemački jezik - pasivno

Vozačka dozvola: B kategorija